НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2305-2066 (Print)
ISSN 2658-5049 (Online)

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК Scopus

WWW.PHARMJOURNAL.RU

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

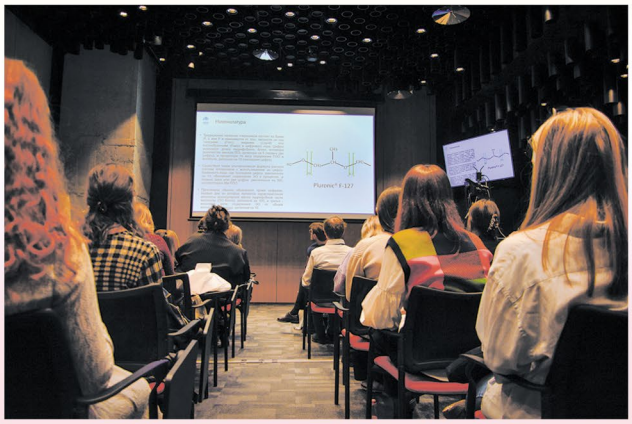
Юбилейный конгресс

«Разработка и регистрация лекарственных средств»

прошел в Москве 2–3 февраля

Стр. 10







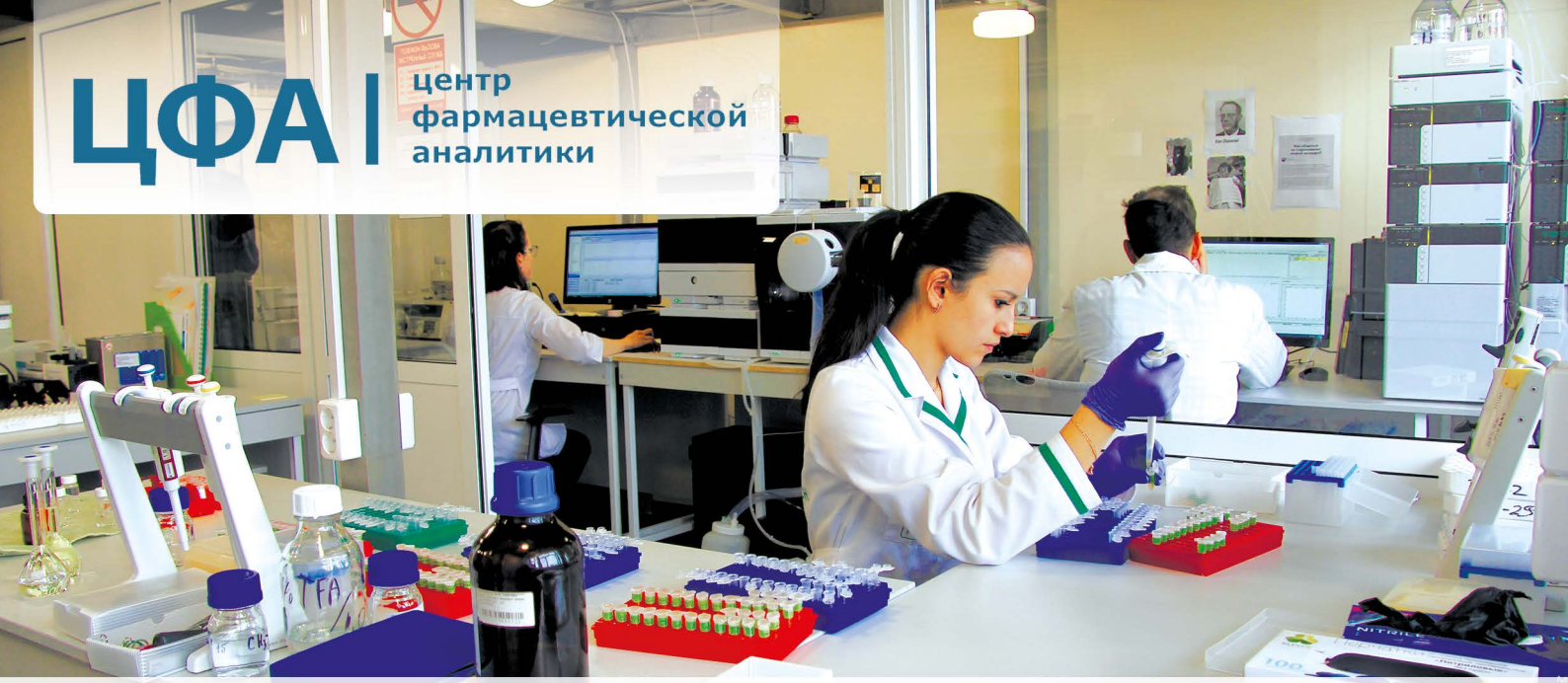




2023. Том 12, № 1 2023. Volume 12, No. 1

18+

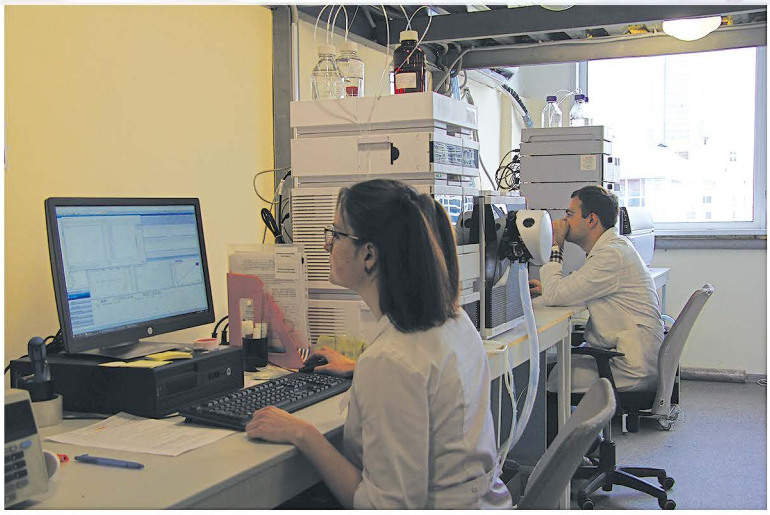
ЦФА | центр фармацевтической аналитики



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, нанопрепаратов и препаратов-биоаналогов;
- сравнительный тест кинетики растворения (моделирование высвобождения лекарственных средств в желудочно-кишечном тракте в условиях *in vitro*);
- статистическая обработка результатов биоаналитических исследований и описание фармакокинетики препаратов;
- разработка, валидация и апробация методик анализа лекарственных средств





Область сертификации:

- научно-исследовательская работа;
- проведение биоаналитических исследований;
- проведение фармакокинетических исследований;
- проведение СТКР (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 СТКР (сравнительного теста кинетики растворения), определение противолекарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.

WWW.PHARMJOURNAL.RU

ISSN 2305-2066 (Print)
ISSN 2658-5049 (Online)

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2023. Том 12, № 1

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2023. Volume 12, No. 1

Цели и задачи журнала

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

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

Второй раздел – фармацевтической технологии и рассматривает научные и практические направления, от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования до создания стандартных и терапевтически эффективных лекарственных препаратов.

Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества.

Четвертый раздел посвящен подходам к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований.

В **пятом разделе** рассматриваются вопросы валидации методик, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP-окружении. Журнал принимает к рассмотрению обзорные и экспериментальные статьи по данной тематике. К публикации в журнале приглашаются как отечественные, так и зарубежные исследователи в области разработки и регистрации лекарственных средств.

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

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 ФБГОУ 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 технологи 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

Тринеева О. В., д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологи 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, 2023
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

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	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia **I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)** Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia **Siberian State Medical University** Address: 2, Moscowskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
Online version founders	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Publisher	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Journal director	Natalia V. Kuldjanova
Managing Editor	Nadezhda S. Mikhaylova
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	**LLC "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, 2023
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Circulation	999 copies
Price	Free

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

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции 10

Поиск и разработка новых лекарственных средств

Противоопухолевая активность видов рода полынь (*Artemisia* L.): современное состояние и перспективы (обзор)
Ю. В. Романтеева, М. А. Березуцкий, М. Н. Курчатова 40

Cytotoxic Effect of 6-Ethyl-Chenodeoxycholic Acid and Cabazitaxel on PC-3 Cells
Munaf H. Zalzala, Wrood S. Al-khfajy, Raghad Abdulsalam Khaleel 52

Фармацевтическая технология

Методология разработки топической трансдермальной системы доставки фукоидана
Е. Д. Облучинская, А. Н. Шиков, О. Н. Пожарицкая 59

Получение водорастворимой формы гидрофобного производного индолокарбазола с использованием комплекса солюбилизаторов
А. П. Колпаксиди, М. В. Дмитриева, Л. Л. Николаева, О. Л. Орлова, И. И. Краснюк 70

Методы анализа лекарственных средств

Разработка и валидация методики определения подлинности и количественного содержания эноксапарина натрия в инъекционных препаратах методом ВЭЖХ
Е. А. Пшеничнов, К. В. Кондрашева 76

Изучение химического состава плодов облепихи крушиновидной, произрастающей на территории Центрального Черноземья
О. В. Тринеева 84

Двойной протеолиз для определения - и О-гликозилирования Fc-гибридного белка этанерцепта методом пептидного картирования
В. Г. Варзиева, Н. В. Месонжник, А. О. Белушенко, Н. Л. Бочкарева, С. А. Апполонова 95

Выделение и идентификация агликонов флавоноидов некоторых видов рода *Astragalus* L. флоры Поволжья
У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова, А. М. Полуянов, Н. В. Бобкова, В. Н. Туренко, В. В. Смирнов, Г. В. Раменская 106

Разработка методики хроматографического анализа вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия
С. В. Антонова, С. В. Колячкина, А. В. Ланцова, Л. Л. Николаева, Е. В. Санарова 115

Стандартизация требований к питательным средам, используемым для оценки качества лекарственных средств (обзор)
С. М. Суханова 123

Сравнительная оценка лекарственных препаратов с МНН «Каптоприл» различных производителей, представленных на рынке РФ, на основании исследований однородности дозирования и теста кинетики растворения
Д. Ю. Гребенкин, А. В. Рябова, А. М. Курамшина, И. В. Кисляков, Е. Д. Жукова 131

Доклинические и клинические исследования

Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата «Эзетимиб + розувастатин» (АО «Санофи-авентис груп», Россия): результаты и опыт применения ферментативного гидролиза при анализе образцов
А. Л. Хохлов, Д. Ю. Гребенкин, Е. К. Фаева, В. И. Казей, А. А. Хохлов, А. Е. Мирошников, О. В. Лебедева 142

Доклинические исследования нового иммуноглобулина для внутривенного введения против COVID-19
А. М. Николаева, А. В. Иванов, Т. И. Смолянова, М. В. Разумихин, О. В. Белякова, Е. Г. Шилова, Н. Р. Селезнева, Т. В. Вязникова, А. И. Семичева, Е. И. Саканян 155

Поведенческая фармакология как основной подход в изучении эффективности потенциальных психотропных средств: анализ современных методов (обзор)
И. И. Семина, А. З. Байчурина, Д. О. Никитин, А. В. Никитина, Р. И. Мустафин, В. В. Хуторянский 161

Новое предназначение старых лекарств (обзор)
И. И. Мирошниченко, Е. А. Вальдман, И. И. Кузьмин 182

Development and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Analysis of Riluzole in Human Plasma and Its Application on a Bioequivalence Study
Sevda Mohammadzadeh, Faranak Salmannejad, Mehdi Mohammadzadeh, ayebeh Ghari, Sima Sadrai, Jalal Zaringhalam 192

Нейробиологические эффекты химических соединений видов рода *Astragalus* L. и перспективы их применения в медицине (обзор)
М. А. Березуцкий, Н. А. Дурнова, У. А. Матвиенко 199

Оценка эффективности мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита: влияние на уровень провоспалительных цитокинов
У. В. Ногаева, В. Е. Кованских, Д. Ю. Ивкин, Е. В. Флисюк, К. Д. Якимов, Е. И. Елецкая, Е. Д. Семивеличенко, В. Г. Антонов 207

Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β-D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС»
Т. Н. Комаров, П. К. Карнакова, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, Н. С. Багаева, И. Е. Шохин, К. Я. Заславская, П. А. Белый 215

Регуляторные вопросы

Об аналитических и технологических причинах результатов Out-of-Specification для тестов оличественное опредение и растворение (обзор)
Н. А. Эпштейн 227

CONTENTS

Introduction 10

Research and development of new drug products

Antitumor Activity of Species of the Genus *Artemisia* L.: Current State and Prospects (Review)
Elena E. Savelyeva, Nadezhda A. Bulgakova, Ekaterina Z. Lapkina, Vita V. Chernaya, Vladimir I. Kurbatsky 40

Cytotoxic Effect of 6-Ethyl-Chenodeoxycholic Acid and Cabazitaxel on PC-3 Cells
Munaf H. Zalzala, Wrood S. Al-khfajy, Raghad Abdulsalam Khaleel 52

Pharmaceutical Technology

Methodology of the Development of a Topical Transdermal Fucoidan Delivery System
Ekaterina D. Obluchinskaya, Alexander N. Shikov, Olga N. Pozharitskaya 59

Obtaining a Water-soluble Form of Hydrophobic Indolelocarbazole Derivative Using Solubilizer Complex
Alexander P. Kolpaksidi, Maria V. Dmitrieva, Lyudmila L. Nikolaeva, Olga L. Orlova, Ivan I. Krasniuk 70

Analytical Methods

Development and Validation of Analytical HPLC Method for Identification and Assay of Enoxaparin Sodium in Injectable Preparations
Egor A. Pshenichnov, Kseniya V. Kondrasheva 76

Study of the Chemical Composition of the Fruits of Sea Buckthorh Rockthroom, Growing in the Territory of the Central Black Earth Region
Olga V. Trineeva 84

Double Proteolysis for N- and O-glycan Analysis of Fc-fusion Protein Etanercept
Valeria G. Varzieva, Natalia V. Mesonzhnik, Anton O. Belushenko, Natalia L. Bochkareva, Svetlana A. Appolonova 95

Isolation and Identification of Aglicones of Flavonoids of Some Species of the Genus *Astragalus* L. of the Volga Region Flora
Uliana A. Matvienko, Natalya A. Durnova, Andrey M. Poluyanov, Natalya V. Bobkova, Vladislav N. Turenko, Valery V. Smirnov, Galina V. Ramenskaya 106

Development of a Technique for Chromatographic Analysis of Excipients in a Liposomal Dosage Form of a Photosensitizer Tetra-3-phenylthio-phthalocyanine Hydroxyaluminium
Svetlana V. Antonova, Svetlana V. Kolyachkina, Anna V. Lantsova, Lyudmila L. Nikolaeva, Ekaterina V. Sanarova 115

Standardization of Requirements for Culture Media Used to Assess the Quality of Drugs (Review)
Svetlana M. Sukhanova 123

Dissolution Profile Study and Uniformity of Dosage Units Test for Various Manufacturers of "Captopril" Drugs from the Russian Market
Dmitrii Yu. Grebenkin, Anastasia V. Ryabova, Adilya M. Kuramshina, Ivan V. Kislyakov, Evgeniya D. Zhukova 131

Preclinical and clinical study

Pharmacokinetic and Bioequivalence Study of the Two-component Drug Product "Ezetimibe + rosuvastatin" (JSC "Sanofi-aventis group", Russia): Resuts and Experience with the Use of Enzymatic Hydrolysis in the Analysis of Samples
Alexander L. Khokhlov, Dmitrii Yu. Grebenkin, Ekaterina K. Faeva, Vasily I. Kazey,Alexander A. Khokhlov, Alexey E. Miroshnikov, Olga V. Lebedeva 142

Preclinical Evaluation of a New Anti-COVID-19 Intravenous Immunoglobulin
Alevtina M. Nikolaeva, Alexander V. Ivanov, Tatiana I. Smolyanova, Mikhail V. Razumikhin, Olga V. Belyakova, Ekaterina G. Shilova1, Natalia R. Selezneva, Tatyana V. Vyaznikova, Anastasiia I. Semicheva, Elena I. Sakanyan 155

Behavioral Pharmacology as the Main Approach to Study the Efficiency of Potential Psychotropic Drugs: Analysis of Modern Methods (Review)
Irina I. Semina, Afrida Z. Baichurina, Dmitry O. Nikitin, Anastasiya V. Nikitina, Rouslan I. Moustafine, Vitaliy V. Khutoryanskiy 161

Old Drugs, New Indications (Review)
Igor I. Miroshnichenko, Elena A. Valdman, Ivan I. Kuz'min 182

Development and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Analysis of Riluzole in Human Plasma and Its Application on a Bioequivalence Study
Sevda Mohammadzadeh, Faranak Salmannejad, Mehdi Mohammadzadeh, Tayebeh Ghari, Sima Sadrai, Jalal Zaringhalam 192

Neurobiological Effects of Chemical Compounds of Species of the Genus *Astragalus* L. and Prospects for Their Use in Medicine (Review)
Mikhail A. Berezutsky, Natalya A. Durnova, Uliana A. Matvienko 199

Evaluation of the Efficiency of a Soft Dosage Form for the Treatment of Osteoarthritis: Influence on the Level of Pro-inflammatory Cytokines
Ulyana V. Nogaeva, Vladislav E. Kovanskov, Dmitry Yu. Ivkin, Elena V. Flisyuk, Kirill D. Yakimov, Elizaveta I. Yeletskaya, Evgeniy D. Semivelichenko, Victor G. Antonov 207

Simultaneous Determination of major molnupiravir metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) and Favipiravir in Human Plasma by HPLC-MS/MS
Timofey N. Komarov, Polina K. Karnakova, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Natalia S. Bagaeva, Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely 215

Regulatory Issues

About Analytical and Technological Reasons of Out-of-Specification Results for Assay and Disolution Tests (Review)
Naum A. Epshtein 227

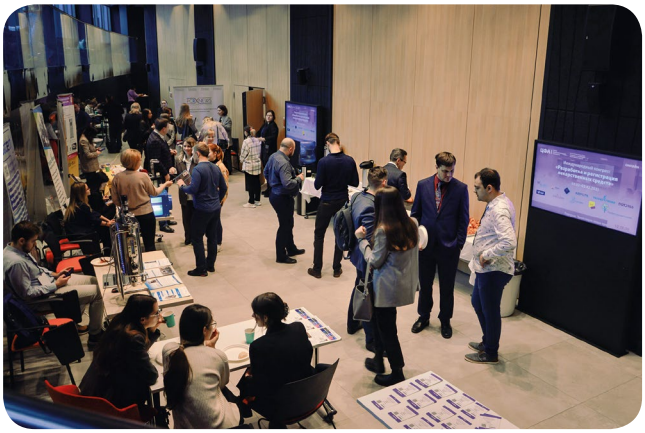
Редакционная статья / Editorial article

Международный двухдневный конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» состоялся в Москве 2–3 февраля 2023 г.

В этом году мероприятие было посвящено 10-летнему юбилею одноименного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Мы переработали и дополнили программу Конгресса в сравнении с мероприятиями прошлых лет, а также добавили новый для нас онлайн-формат участия. В рамках Конгресса мы обсудили вопросы, связанные с разработкой, исследованиями, производством, а также возникающие на этапе регистрации лекарственного препарата.

International Two-day Congress "Drug development & registration" Took Place in Moscow on February 2–3, 2023

This year congress was devoted to the 10th anniversary of the "Drug development and registration magazine". We have changed and supplemented the program of the Congress in comparison with the events of previous years, and also added an online format. During the congress we have discussed such themes as drug development, non-clinical and clinical trials, drug production and registration.





Конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» прошел в Москве, в Технопарк Калибр в гибридном формате (живое участие + онлайн формат). Организаторами конференции традиционно выступают Центр Фармацевтической Аналитики и журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».

В этом году мероприятие было посвящено 10-летнему юбилею одноименного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» и отличалось по формату и содержанию от ранее проводимых мероприятий.

«*Мы переработали и дополнили программу Конгресса в сравнении с мероприятиями прошлых лет, а также добавили новый для нас онлайн-формат участия. Что-то получилось так, как и задумывалось, что-то требует внесения дальнейших корректив, и мы над этим уже работаем. Благодарим слушателей, спикеров и партнеров за Ваше участие. Приятно читать Ваши отзывы и пожелания. Мы рады, что программа Конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» была полезной и интересной для Вас. Спасибо за Ваше доверие и с нетерпением ждем встречи на наших следующих мероприятиях*», – **Наталья Кульджанова, директор журнала «Разработка и регистрация ЛС».**

За два дня Конгресс посетили 157 человек. Очно с нами были 112 человек и 45 человек – онлайн.

Программа мероприятия состояла из нескольких секций. В первый день мы поговорили про «Регуляторные вопросы действующего законодательства ЕАЭС», обсудили «Вопросы фармацевтической разработки оригинальных и воспроизведенных химико-фармацевтических и биологических ЛС», также для наших очных участников представилась возможность посетить круглый стол по вопросам надлежащей публикационной практики.

Открывал мероприятие главный редактор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» **Игорь Шохин.** В приветственной речи к слушателям Игорь Евгеньевич рассказал историю юбиляра: «*За 10 лет своей жизни журнал прошел путь от небольшого рекламного издания до уважаемого научного журнала, входящего в международные базы данных. Это огромная работа всего коллектива журнала и мы не планируем останавливаться на достигнутом. В планах на ближайшее время – войти в топ 100 международных журналов по фармацевтическим наукам*».

Продолжил мероприятие профессор **Виталий Хуторянский из университета Реддинга, Велико-**



Виталий Хуторянский
(Университет Реддинга, Великобритания)

британия. Доклад Виталия вызвал живой интерес у слушателей мероприятия. Спикер поделился успехами своей научной команды в создании новых мукоадгезивных материалов и лекарственных форм. Команда ученых совместно с профессором Хуторянским работает над созданием мукоадгезивных материалов второго поколения на основе специальных модифицированных полимеров, особенностью которых является создание ковалентных связей с муцином, что способствует их лучшему прилипанию к слизистой поверхности. Таким образом, эффективность воздействия лекарственного препарата, созданного с использованием мукоадгезивных материалов, увеличивается.

Секцию, посвященную регуляторным вопросам, открывал доклад **Екатерины Сорокиной (ООО «Статэндокс»)**. В докладе были рассмотрены существующие на сегодня правила регистрации препаратов по требованиям ЕАЭС. Одно из свежих обновлений – это изменение в системе фармаконадзора и во взаимосвязи между системой фармаконадзора и регистрационным досье ЛС. Екатерина в своем докладе призвала собравшихся занимать активную гражданскую позицию и обязательно сообщать о выявленных нежелательных реакциях, связанных с применением того или иного препарата. Продолжил секцию доклад **Евгения Морковина (ООО «Статэндокс»)**, в котором были рассмотрены альтернативные пути регистрации для ускорения вывода препарата на рынок. Доклад **Дмитрия Рождественского (Евразийская экономическая комиссия)** был посвящен исследованиям фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств пролонгированного действия. **Александр Солодовников (ООО «Статэндокс»)**, в своем докладе обратил внимание слушателей на то, что все текущие регистрации в нашей стране осуществляются по требованиям ЕАЭС, за исключением некоторых единичных случаев. Александр рассмотрел наиболее часто встречающиеся проблемы, с которыми заявитель сталкивается при регистрации препарата, и пути их решения. В своем докладе спикер подробно разобрал правила формирования отдельных модулей ОТД, обозначил часто встречающиеся ошибки заявителей и обозначил «узкие» места ОТД, на которые стоить обратить внимание при формировании документа. **Ксения Насонова (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России)** в своем докладе коснулась вопросов патентной стратегии производителей ЛС. В докладе было разобрано текущее состояние патентного рынка в РФ, а также рассмотрены изменения в законодательстве в 2022 году.

Основные выводы:

1. При фармацевтической разработке:
   - Тщательно проверять соединение и состав на патентную чистоту.
   - Тщательно прописывать патентную стратегию по шагам, включая получение патентов в РФ и Евразии.
   - Ориентироваться на инновационные технологии и препараты.
2. Делать поиск на патентную чистоту даже при уже выпущенном продукте.
3. При разработке и патентовании учитывать риски замены реактивов и сырья, изменения в логистике.
4. Отслеживать нарушения своих патентов и привлекать к ответственности нарушителей своевременно.



Дмитрий Рождественский
(Департамент технического регулирования и аккредитации ЕЭК)

Для получения видео-записи Конгресса просьба обращаться к организаторам info@pharmjournal.ru.

Следующая секция была посвящена «Вопросам фармацевтической разработки оригинальных и воспроизведенных химико-фармацевтических и биологических ЛС». Модератором секции выступил **Игорь Макаренко (Герофарм),** сомодератором **– Анатолий Дзюба (АО «ФАРМПРОЕКТ»).**



Игорь Макаренко
(Герофарм)

Спикеры сделали акцент на особую важность преемственности на всех этапах жизненного цикла препаратов – от лабораторной разработки до применения препаратов пациентами. Обсудили как уже на раннем этапе разработки можно спрогнозировать параметры качества препарата и снизить риски для пациентов.

Открывал секцию доклад **Софьи Бронниковой (Sartorius)**. В докладе были рассмотрены инновационные решения концерна для аналитических и R&D лабораторий фармацевтических предприятий.

В рамках выступления Софья представила решения для пробоподготовки методом ВЭЖХ, а именно: системы водоподготовки Arium® Mini UV с ультрафиолетовой лампой и лабораторные весы повышенной точности Cubis® II с фармацевтическим пакетом приложений Pharma QP и термопринтером.

При подготовке чистых проб Sartorius рекомендует шприцевые насадки Minisart® с низкой абсорбцией, установку фильтрации Claristep® для большого количества образцов и системы SartoLab® Multistation, благодаря которым осуществляется фильтрация с использованием вспомогательного фильтрующего средства (кизельгур, диатомит) для осветления клеточной культуры.

Для исключения микробной контаминации при производстве лекарственных средств компания разработала систему Sterisart® для контроля стерильности лекарственных препаратов, состоящую из перистальтического насоса для переноса проб и сред в стерильные канистры. Для количественного определения микоплазмы метом ПЦР предлагаются наборы Microsart® ATMP.

Александр Прокофьев (BIOCAD) поделился опытом компании в разработке генотерапевтических препаратов на основе AAV.

BIOCAD с 2016 г. активно занимается разработкой собственных генотерапевтических препаратов на основе rAAV. В компании созданы все необходимые платформенные технологии для создания подобного класса препаратов. На сегодняшний день в генотерапевтическом пайплайне компании BIOCAD уже есть несколько препаратов, которые уже успешно прошли цикл ранней разработки.

Дарья Кузнецова (Компания «Молбиол») представила уникальное решение – первый российский специализированный маркетплейс товаров для оснащения лабораторий Labstore. Сервис разработан именно для того, чтобы сделать процесс покупки и продажи максимально удобным и прозрачным, а также исключить участие человека.

«*Наша команда профессионалов поставила себе цель полностью автоматизировать все действия от регистрации до оплаты счета, создав интуитивно понятный интерфейс, а также обеспечив множественные возможности для выбора или сравнения характеристик товаров, и гарантии безопасности сделки, как для продавца, так и для покупателя*», – поделилась Дарья.

Labstore – это современная динамично развивающаяся интернет-площадка, при создании которой были учтены основные запросы всех участников рыночных процессов.



Софья Бронникова
(Sartorius)



Александр Прокофьев
(Biocad)



Дарья Кузнецова
(Компания «Молбиол»)

Светлана Закирова (Нанолек) в своем докладе рассказала слушателям об опыте компании в разработке лекарственных препаратов по полному циклу.

В свою очередь **Игорь Макаренко** поделился опытом ГЕРОФАРМ в проведении исследований аналитической сопоставимости с целью доказательства качества биологических лекарственных препаратов.

В рамках первого дня мероприятия состоялся **круглый стол по вопросам надлежащей публикационной практики**. В мероприятии принимали участие члены редколлегии журнала: представители российских и зарубежных вузов, научно-исследовательских и коммерческих организаций, а также молодые ученые и постоянные авторы журнала. Участники поделились идеями о совершенствовании уровня публикаций, в том числе в различных научных направлениях.



Светлана Закирова
(Нанолек)

Второй день Международного Конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» начался с секции по «Доклиническим и клиническим исследованиям оригинальных и воспроизведенных ЛС».

Открыл секцию **директор компании Sciencefiles, к. м. н Андрей Алашеев.** Его доклад содержал уникальную аналитику клинических исследований лекарственных препаратов, одобренных в РФ в 2022 году. Данные были подготовлены с помощью Clinicaltrialsregister.ru – открытого справочного портала, разработанного компанией Sciencefiles.

Яковлев Игорь (ООО «Профессорская клиника», ФГБОУ ВО МарГУ) рассказал о значимости этической экспертизы в клинических исследованиях.

Этике медицинских исследований всегда придавалось большое значение, а сейчас этическая экспертиза фактически включает в себя и фармакологическую, и клинико-фармакологическую, и юридическую, и филологическую оценку. Формат представляемых документов требует от членов комитета по этике не только моральных качеств, но и специализированных знаний. Кто направляет главного исследователя в принятии решений? Кто заметит риски еще до начала работы? Кому можно довериться? Независимый этический комитет организации. Коллективный совет на защите благополучия пациентов и добровольцев, а в конечном итоге – и всей деятельности клинического центра. Именно этический комитет первым рассматривает всю документацию и от качества экспертизы во многом зависит вероятность возможных ошибок.

Секция «Технология получения лекарств (в том числе разработка новых отечественных препаратов из биологического сырья)» была представлена четырьмя докладами. Так, **Елена Бахрушина (Сеченовский университет)** рассказала о текущих реалиях и перспективах применения блок-сополимеров полиоксиэтилена и полиоксипропилена в разработке ЛС.

Александр Митюшкин (АО «Раменский приборостроительный завод») в своем докладе рассказал, как защитить фармацевтическое производство от вирусов, грибов, плесени и других контаминантов, благодаря применению решения ТИОКРАФТ для обеззараживания воздуха. Александр обозначил основные факторы контаминации производств, способы их устранения, а также разобрал недостатки часто используемой HEPA-фильтрации.

Елена Петросян (ООО «Диаэм») рассказала об особенностях выбора климатических камер для исследования стабильности.

В докладе были рассмотрены критерии выбора климатических камер постоянных условий. Мы разобрали почему важно учитывать такие параметры как флуктуация и вариация, а также применимость стандартов ICH при исследовании стабильности фармацевтической субстанций. На примере климатических

камер серии KBF-S, KBF и KMF Binder разобрали варианты рабочих зон камер. Узнали про конструкционные особенности климатических камер, а также про варианты освещения и контроля за ним. Выяснили почему нужно обращать внимание на графики зависимости относительной влажность и температуры в зоне без образования конденсата.

В рамках секции «Актуальные вопросы надлежащих практик GxP в жизненном цикле ЛС» мы обсудили такую важную тему, как качество выпускаемых препаратов. Ввиду ухода с российского рынка некоторых фармацевтических компаний, приостановки КИ, сложностей с поставками расходных материалов и сырья российские производители лекарств испытывают большую нагрузку, что, в свою очередь, может сказаться на качестве выпускаемой продукции. Как этого избежать рассказали наши спикеры **Полина Гремякова (Центр метрологии и консалтинга «Поверие») и Анна Тихонова (Учебный Центр GxP)**. Полина Гремякова в своем докладе представила решение проблемы с точки зрения управления кадрами, ведь компания – это живые люди.



Полина Гремякова
(Центр метрологии и консалтинга «Поверие»)

Продолжая тему кадров, Анна Тихонова рассказала о подготовке Уполномоченного лица производителя ЛС, рассмотрела правила аттестации уполномоченных лиц при внесении в реестр УЛ, а также привела случаи из судебной практики, связанные с оспариваем решения Минздрава о не назначении специалиста в качестве УЛ.

В заключении Конгресса слушателям представилась возможность принять участие в **видео-аудите биоаналитической лаборатории на соответствие требованиями GLP**. Были рассмотрены различные



Анна Тихонова
(Учебный Центр GxP)

объекты аудита, методология аудитирования этих объектов, а также представлены типичные несоответствия, которые могут быть выявлены при проведении аудита. Процедура оценки соответствия лаборатории требованиями GLP проводилась на основании таких документов, как ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского эконо-



Мария Попова
(ООО «ЦФА»)

мического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Для получения видео-записи Конгресса просьба обращаться к организаторам info@pharmjournal.ru.

В рамках конгресса также была организована выставочная экспозиция, где экспоненты смогли наглядно продемонстрировать свои продукты и презентовать оказываемые услуги.





Наша задача – создать площадку для эффективного взаимодействия и обмена опытом специалистов фарм.отрасли, задействованных в сфере обращения ЛС, от разработки и до регистрации.

Ждем Вас на наших последующих мероприятиях!

Посетить сайт Конгресса:

Партнерами международного конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» выступили Химмед, Статэндокс, СПХФУ, Sciencefiles, Учебный центр GxP, Диаэм, Профессорская клиника, ТехноФарм, Сарториус РУС, Аврора, БИОТЕХНО.

Нашими информационными партнерами выступили NPJ, ФамМедПром и Технопарк Санкт-Петербурга.

Благодарим участников, спикеров и партнеров за активное участие в Конгрессе, горячие дискуссии и хорошее настроение!



УДК 615.11

Редакционная статья / Editorial article

Возрождение химической промышленности России в советский период (1917–1927 гг.). Приложения. Декреты, постановления, приказы ЦИК, Высшего совета народного хозяйства, Народных Комиссариатов по военным делам, обороне, труду и образованию РСФСР и СССР

К. С. Гузев✉

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

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

Резюме

В этом разделе представлены приложения к предыдущим 4 частям статьи. Эти приложения важны, так как они документально подтверждают каждый шаг руководства молодой Советский республики, а затем и СССР, по восстановлению отечественной химической промышленности, разрушенной в годы Первой мировой войны и революции. Из содержания приложений, а также из фамилий ответственных сотрудников, подписавших постановления и декреты, становится понятна системность и последовательность всех действий членов правительства, а также актуальность проводимых в стране мероприятий.

Revival of the Russian chemical industry during the Soviet period (1917–1927). Part 4

Konstantin S. Guzev✉

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

✉ **Corresponding author:** Konstantin S. Guzev. **E-mail:** guzev3@yandex.ru

Abstract

This section contains appendices to the previous 4 parts of the article. These applications are important because they document every step taken by the leadership of the young Soviet Republic, and then the USSR, to restore the domestic chemical industry destroyed during the First World War and the revolution. The contents of the appendices, as well as clarify names of the responsible employees who signed the resolutions and decrees, it becomes clear the consistency and consistency of all actions of government members, as well as the relevance of the events held in the country.

ПРИЛОЖЕНИЕ I

Декрет о Высшем совете народного хозяйства[1]

1. При Совете народных комиссаров учреждается Высший совет народного хозяйства.
2. Задачей ВСНХ является организация народного хозяйства и государственных финансов. С этой целью ВСНХ вырабатывает общие нормы и план регулирования экономической жизни страны, согласует и объединяет деятельность центральных и местных регулирующих учреждений (совещание по топливу, металлу, транспорту, центральный продовольственный комитет и пр., соответствующих народных комиссариатов, торговли и промышленности, продовольствия, земледелия, финансов, военно-морского и т. д.), Всероссийского Совета Рабочего Контроля, а также соответственную деятельность фабрично-заводских и профессиональных организаций рабочего класса.
3. ВСНХ предоставляется право конфискации, реквизиции, секвестра, принудительного синдицирования различных отраслей промышленности и торговли и прочих мероприятий в области производства, распределения и государственных финансов.
4. Все существующие учреждения по регулированию хозяйства подчиняются ВСНХ, которому предоставляется право их реформирования.
5. ВСНХ образуется:
   а) из Всероссийского Совета рабочего контроля, состав которого определен декретом от 14 ноября 1917 г.;
   б) из представителей от всех народных комиссариатов;
   в) из сведущих лиц, приглашаемых с совещательным голосом.

[1] Тексты декретов, процитированы по материалам Российского Государственного архива экономики.

6. ВСНХ разбивается на секции и отделы (по топливу, металлу, демобилизации, финансам и проч.), причем количество и сфера деятельности этих отделов и секций определяется общим собранием Высшего совета народного хозяйства.
7. Отделы ВСНХ ведут работу по регулированию отдельных областей народно-хозяйственной жизни, а также подготовляют мероприятия соответствующих Народных комиссариатов.
8. ВСНХ выделяет из своей среды бюро в составе 15 человек для координации текущей работы секций и отделов и выполнения задач, требующих немедленного разрешения.
9. Все законопроекты и крупные мероприятия, имеющие отношение к регулированию народного хозяйства в его целом, вносятся в Совет народных комиссаров через В. С. Н. Х.
10. ВСНХ объединяет и направляет работу местных экономических отделов Советов рабочих, солдатских и крестьянских депутатов, включающих в себя местные органы рабочего контроля, а также местных комиссаров труда, торговли и промышленности, продовольствия и проч.

При отсутствии соответствующих экономических отделов ВСНХ образует свои местные органы.

Для экономических отделов местных советов, являющихся местными органами ВСНХ, обязательны все постановления ВСНХ.

Подписали:

Председатель ЦИК *Я. Свердлов*.

Председатель СНК *Вл. Ульянов (Ленин)*.

Народные комиссары *Л. Троцкий, И. Сталин, Н. Авилов (Н. Глебов)*.

Управляющий делами СНК *Вл. Бонч-Бруевич*.

Секретарь *Н. Горбунов*.

Распубликовано в № 25 «Газета Временного Рабочего и Крестьянского Правительства» от 5 декабря 1917 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

Постановление Высшего совета народного хозяйства и Народного комиссариата по военным делам «О расформировании Химического комитета при Главном артиллерийском управлении и передаче его личного состава, рабочего аппарата и материалов в ведение Высшего совета народного хозяйства»

1. Химический комитет при Главном артиллерийском управлении расформировывается. Его личный состав, рабочий аппарат и материалы переходят в ведение Отдела химической промышленности Высшего совета народного хозяйства.

Примечание. Те составные части Химического Комитета, сохранение коих при Главном артиллерийском управлении является необходимым для чисто-военных целей, образуют отдел при Главном Артиллерийском Управлении.

2. Районные Бюро и уполномоченные Химического комитета остаются на своих местах и, являясь исполнительными органами Отдела химической промышленности, объединяют деятельность техников-контролеров, прикомандированных к заводам. Уполномоченные входят в состав районных Советов народного хозяйства, в их химические отделы.
3. Техники-контролеры, прикомандированные Химическим комитетом Главного артиллерийского управления к фабрикам и заводам, входят в состав местных органов рабочего контроля с правом совещательного голоса. С момента опубликования настоящего постановления они посылают регулярно все те сведения, которые направлялись Химическому комитету при Главном артиллерийском управлении и его органам, в Отдел химической промышленности Высшего совета народного хозяйства и одновременно в соответствующие отделы районных Советов народного хозяйства.
4. В целях проведения в жизнь настоящего постановления образуется комиссия в составе 1 представителя Народного комиссариата по военным делам и 2 представителей Высшего совета народного хозяйства, под наименованием Комиссии по реорганизации Химического комитета при Главном артиллерийском управлении.

Подписали:

Председатель Высшего совета народного хозяйства *Рыков*.

Член Коллегии Народного комиссариата по военным делам *Э. Склянский*.

Распубликовано в № 105 «Известие Всероссийского Центрального Исполнительного Комитета Советов» от 26 (13) мая 1918 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ III

Постановление Высшего совета народного хозяйства «О национализации «Товарищества химических заводов П. К. Ушков и К°»

§ 1. Все предприятия «Товарищества химических заводов П. К Ушков и К°», все недвижимое и движимое имущество Товарищества, как-то: заводы земли, леса, луга, поля, рудники, каменоломни и месторождения полезных ископаемых, торфяники, городские владения с постройками, конторы, склады, речной флот, пристани, вода, как источник энергии и как необходимый для производства фактор, рабочие поселки с необходимыми для сего землями, живой и мертвый инвентарь, – объявляются достоянием Российской Республики, равным образом к Российской Республике переходит весь актив и пассив предприятий Товарищества по балансу в день вступления настоящего постановления в силу.

§ 2. Земли, луга, леса, природные месторождения ископаемых, рудники, торфяники, подсобные промела, водные силы, как принадлежащие на праве собственности, так и находящиеся в пользовании Товарищества остаются в пользовании национализированного предприятия.

§ 3. Указанное в §§ 1 и 2 имущество, движимое и недвижимое становящееся отныне собственностью Российской Республики, не может быть отчуждаемо или самочинно отбираемо в пользование отдельных граждан, обществ, местных Советов рабочих и крестьянских депутатов, или других организаций и учреждений.

§ 4. Весь технический и служебный персонал, в том числе и правление, в том составе, в каком они окажутся в момент объявления этого постановления, остаются на своих местах, выполняют все свои служебные обязанности и сохраняют в полной неприкосновенности все имущество, все дела, торговые книги и документы до организации нового правления.

§ 5. Положение о способе и порядке пользования недвижимостью, находившейся до сего времени в аренде у Товарищества, имеет быть выработано особо Высшим советом народного хозяйства по соглашению с Народным комиссариатом земледелия и другими заинтересованными Народными комиссариатами.

§ 6. Впредь до установления указанного положения арендные договоры, заключенные Товариществом, сохраняют свою силу, поскольку они не противоречат существующим законам.

§ 7. Положение об отведении участка земли, потребного для постепенного и планомерного расширения рабочего поселка, а равно и земли для огородов поселка имеет быть выработано по соглашению с заинтересованными Народными комиссариатами.

§ 8. Все нарушения настоящего постановления караются по всей строгости революционных законов.

Подписал:

Председатель Высшего совета народного хозяйства А. И. Рыков.

Распубликовано в № 124 «Известие Всероссийского Центрального Исполнительного Комитета Советов» от 19 (6) июня 1918 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Декрет Совета народных комиссаров «О национализации нефтяной промышленности»

1. Объявляются государственной собственностью предприятия нефтедобывающие, нефтеперерабатывающие, нефтеторговые, подсобные по бурению и транспортные (цистерны, нефтепроводы, нефтяные склады, доки, пристанские сооружения и проч.) со всем их движимым и недвижимым имуществом, где бы оно ни находилось и в чем бы оно ни заключалось.
2. Мелкие из названных в п. 1 предприятий изъемлются из действия настоящего декрета. Основания и порядок означенного изъятия определяются особыми правилами, выработка которых возлагается на Главный нефтяной комитет.
3. Объявляется государственной монополией торговля нефтью и ее продуктами.
4. Дело управления национализированными предприятиями в целом, а равно и определение порядка осуществления национализации передается в Главный нефтяной комитет при Отделе топлива Высшего совета народного хозяйства (Главнефть). (Собр. Узак. и Расп. Раб. и Кр. Правит., № 36, ст. 476.)
5. Порядок образования местных органов по управлению национализированными предприятиями и предел их компетенции определяются особыми инструкциями Главного нефтяного комитета по утверждении их Президиумом Высшего совета народного хозяйства.
6. Впредь до принятия национализируемых предприятий в целом в управление Главным нефтяным комитетом, прежние правления названных предприятий обязаны продолжать свою работу в полном объеме, принимая все меры к охране национального достояния и безостановочному ходу операций.
7. Прежнее правление каждого предприятия должно составить отчет за весь 1917 год и за первое полугодие 1918 г., а также баланс предприятия на 20 июня, по каковому балансу новое правление производит проверку и фактический прием предприятия.
8. Главный нефтяной комитет имеет право, не ожидая представления балансов и до полной передачи национализированных предприятий в управление органов Советской власти, посылать своих комиссаров во все правления нефтяных предприятий и во все центры добычи, производства, транспорта и торговли нефтью, причем Главный нефтяной комитет может передоверить полномочия своим комиссарам.
9. Все права и обязанности Советов съездов нефтепромышленников передаются соответствующим местным органам по управлению национализированной нефтяной промышленностью.
10. Всем служащим предприятий и учреждений, переходящих в ведение Главного нефтяного комитета, предписывается оставаться па своих местах, не прерывая возложенных на них работ.
11. Впредь до издания Главным нефтяным комитетом предусмотренных в декрете инструкций, распоряжений и правил, – местным Советам народного хозяйства, а где таковых нет и другим местным органам Советской власти предоставляется право издавать их для своего района.

Подписали:

Председатель Совета народных комиссаров *В. Ульянов (Ленин)*.

Управляющий делами Совета народных комиссаров *В. Бонч-Бруевич*.

20 (7) июня 1918 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ V

Постановление Высшего совета народного хозяйства «*О национализации винокуренных и спиртоочистительных заводов*»

1. Все винокуренные и спиртоочистительные заводы и предприятия со всеми их строениями, оборудованием, живым и мертвым инвентарем и вообще со всеми их имуществами и капиталами, в чем бы таковые ни состояли и где бы ни находились, объявляются собственностью Российской Социалистической Федеративной Советской Республики и поступают в ведение Отдела химической промышленности Высшего совета народного хозяйства.
2. Администрация винокуренных и спиртоочистительных заводов и предприятий, весь технический персонал и служащие, где таковые имеются на заводах и в предприятиях, остаются на своих местах в том составе, в котором находились ко времени опубликования настоящего постановления, продолжают выполнять свои обязанности и заботятся о сохранности всех дел, книг и документов.
3. Разработка и осуществление мероприятий, направленных к организации винокуренного производства, непосредственное руководство, направление деятельности и управление всеми национализированными и спиртоочистительными заводами и предприятиями и распоряжение вырабатываемым на винокуренных и спиртоочистительных заводах спиртом возлагается на утверждаемое при Высшем совете народного хозяйства Центральное управление государственным винокурением и спиртоочищением через подчиненные ему районные и местные Управления и другие его органы. Состав, права, обязанности и круг ведения означенных Центрального, районных и местных Управлений и других его органов, а также и управлений отдельными винокуренными заводами и другими предприятиями этой отрасли промышленности определяются Высшим советом народного хозяйства и его подлежащими органами, в соответствии с существующими законоположениями Рабоче-Крестьянского Правительства и его органов.
4. Винокуренные и спиртоочистительные заводы, признанные Центральным управлением по местным условиям или состоянию оборудования непригодными для возобновления на них винокурения, оставляются на учете и под охраной Губернских советов народного хозяйства.
5. Все местные Советы рабочих и крестьянских депутатов, Советы народного хозяйства, Земельные комитеты, Правительственные и Общественные учреждения и организации обязаны руководствоваться всеми указаниями и распоряжениями Центрального управления государственным винокурением и спиртоочищением по всем делам, касающимся винокуренной промышленности, распределения передвижения и отпусков спирта.
6. Действующие постановления Уставов об акцизных сборах, касающиеся порядка и условий производства винокурения и ее промышленности и определяющие в отношении этого производства и винокуренной промышленности права и обязанности акцизного надзора, не отмененные особыми законодательными актами Советской власти, – остаются в силе.
7. Виновные в неисполнении пп. 2 и 5 настоящего постановления подлежат привлечению к законной ответственности на основании существующих законоположений.

Подписали:

Председатель Высшего совета народного хозяйства *А. И. Рыков*.

Члены Президиума Высшего совета народного хозяйства *А. Ломов, Л. Карпов*.

26 октября 1918 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ VI

Декрет Совета народных комиссаров «*О передаче Центральной научно-технической лаборатории Военного ведомства в ведение Научно-технического отдела Высшего совета народного хозяйства*»

1. Передать Центральную научно-техническую лабораторию Военного ведомства в ведение Научно-технического отдела, с наименованием «Центрально-Научная Техническая Лаборатория РСФСР». Передаче подлежат личный состав, имущество и кредиты Центральной научно-технической лаборатории Военного ведомства.
2. В видах наиболее полного обеспечения потребностей Военного ведомства в области приложения научно-технических знаний в области военного дела, Центральная научно-техническая лаборатория РСФСР обязана по заданиям Военного ведомства исполнять поручения Военного ведомства в первую очередь, привлекая к участию в работах представителей Ведомства, если последнее признает это необходимым.
3. Служащие Центральной научно-технической лаборатории сохраняют за собой права и обязанности службы в Военном ведомстве. Призыв в Красную армию происходит на одинаковых со всеми служащими учреждений Военного комиссариата основаниях.

Подписали:

Председатель Совета народных комиссаров *В. Ульянов (Ленин)*.

Управляющий Делами *Влад. Бонч-Бруевич*.

Секретарь *Л. Фотиева*.

14 февраля 1919 года

ПРИЛОЖЕНИЕ VII

Постановление Высшего совета народного хозяйства «О национализации основной химической промышленности и об утверждении «Центрального правления государственных заводов основной химической промышленности»

На основании постановления Президиума Высшего совета народного хозяйства от 28 января 1919 года, нижеследующие предприятия Основной Химической промышленности, вырабатывающие минеральные кислоты, щелочи и соли, национализированы, т. е. объявлены собственностью РСФСР со всеми их имуществами и капиталами, в чем бы таковые ни заключались и где бы они ни находились.

Северный район

1. Тентелеевский химический завод. Петроград, ст. «Пущино», Портовая ветвь, Николаевской ж. д.
2. Чудовский химический завод. Акционерного Общества «Дембар», ст. Чудово, Николаевской ж. д.
3. Ирининский химический завод. Ст. «Ириновка», Ирининской ж. д.

Центральный район

1. Химические заводы т/д. Н. В. Лепешкина сыновья: а) «Московский», Москва, Мытная ул., 25; б) «Дегунинский», Московской губ. и уезда, с. Дегунино; в) «Иваново-Вознесенский», гор. Иваново-Вознссенск.
2. Товарищество Докторовского химического завода бл. ст. «Кудиново», Московко-Николаевской ж. д.
3. «Скоропусковский» химический завод. Т/д. А. Афанасьева Сыновья, бл. ст. «Сергиево», Северной ж. д.
4. Акционерное Общество Жилевского завода химических производств. Ст. «Жилево», Рязанско-Уральской ж. д.;
5. Акционерное обшество Московского электролитического завода. Бл. деревни «Верхние Котлы», Московского уезда.
6. Химический завод Товарищество мануфактур «Людвиг Рабенек». Ст. «Щелково», Северной ж. д.
7. Российское Акционерное общество химических заводов (бывш. Рихард Макер). Москва, Дорогомилово, Бережковская наб.
8. Химический завод Карл Блеш. Москва, Рогожская, ул., Курский пер., 17.
9. Владыкинский завод А. И. Иванова. Москва, Дмитровское шоссе, с. д.
10. Химический завод Ф. И. Куликова. Москва, за Серпуховской заставой «Нижние Котлы».
11. Химический завод Сикачева. Павловский Посад, Богородского уезда, Московской губ.
12. Химический завод Т. В. Забродина. Павловский Посад, Богородского уезда, Московской губ.
13. Царицынский химический завод. ст. «Царицыно», М.-Курской ж. д.
14. Химический завод Товарищества Гиль. Ст. «Щекино», Московско-Курской ж. д.
15. Колыберевский химический завод. Бл. ст. «Коломна», Московско-Казанской ж. д.
16. Рейке (бывш. Ясинского). Москва, Шаболовка, бывш. Михайлова.
17. Повало-Швойковский. Москва, Благуша, Измайловское шоссе, 4.
18. Бровкин. Москва, Благуша, Михайловская ул.
19. Козлов В. И. Москва, Благуша, Михайловская ул.
20. Поляков. Москва, Благуша, Измайловское шоссе.
21. Бывш. Виленское Товарищество. Москва, Симоновская слобода, с. д. 4.
22. Лиснер. уг. Кузнецкой и Климептовской.

Верхне-Волжский район

1. Химические заводы т/д. Бурнаева-Курочкиина Сыновья: а) Кинешемская, бл. г. Кинешмы, Костромской губ.; б) Романово-Борисоглебский, Романово-Борисоглебского уезда, Ярославской губ.
2. Химический завод Приволжско-Паточно-Химическом заводе Торгово-Промышленного Товарищества Никиты Понизовкина Сыновья. д. Гущино, Ярославской губ., Даниловский уезд., Здоровской вол.
3. Нескучный химический завод Кокушкина. Плес, Костромской губ.

I

Равным образом, согласно того же постановления Президиума Высшего совета народного хозяйства, национализированы нижеследующие предприятия, являющиеся подсобными по снабжению кислотных заводов огнеупорными изделиями (посудой и кирпичом): керамические заводы Агапова в Кинешме и Кочинкина – дер. Фенино, ст. Фрязево, Люберцо-Арзамасской ж. д.

II

Все дела, документы, капиталы и имущества, где бы они ни находились и в чем бы ни состояли, относящиеся к поименованным ст. 1 настоящего постановления предприятиям, поступают в полное ведение Республики, в лице Отдела химической промышленности Высшего совета народного хозяйства.

III

Управление всеми делами, капиталами и имуществами поименованных; в ст. 1 настоящего постановления предприятий возлагается на «Центральное

Правление Государственных Заводов Основной Химической Промышленности», организуемое при Отделе химической промышленности Высшего совета народного хозяйства, непосредственно ему подведомственное и утвержденное Президиумом Высшего совета.

IV

В целях объединения Управления всей Государственной основной химической промышленностью, национализированные ранее предприятия, вошедшие в группу Государственных Волжско-Камских химических заводов и находящиеся в Управлении «Центрального Правления Государственных Волжско-Камских Химических Заводов», также переходят наравне с поименованными в статье 1 настоящего постановления предприятиями, в Управление «Центрального Правления Государственных Заводов Основной Химической Промышленности», которое и сосредоточит в своих руках исключительное Управление и распоряжение делами, имуществами и капиталами всех Государственных предприятий Основной химической промышленности. «Центральное Правление Государственных Волжско-Камских Химических Заводов» настоящего состава продолжает сохранять свои полномочия впредь до окончательной сдачи дел «Центральному Правлению Государственных Заводов Основной Химической Промышленности».

V

Все обязательства организаций, учреждений и частных лиц перед владельцами и местными центральными органами Управления предприятий, поименованных в ст. 1 настоящего постановления, до перехода их в ведение Республики, сохраняют свою силу и после перехода их в ее ведение, причем права по этим обязательствам владельцев и органов Управления предприятий переходят к «Центральному Управлению Государственных Заводов Основной Химической Промышленности» и его центральным и местным органам соответственно.

VI

Ныне действующие Правления и прочие органы Управления указанных в ст. I и IV настоящего положения предприятий обязываются сдать в полном порядке «Центральному Правлению Государственных Заводов Основной Химической Промышленности» все дела, документы, капиталы и имущества, принадлежащие вышеуказанным предприятиям.

VII

Весь административный, технический и служебный персонал, занятый в указанных в ст. I и IV настоящего постановления предприятиях, должен продолжать исполнение своих обязанностей и выполнять поручения новых органов и их представителей.

Виновные в отказе от передачи дел и документов или в сохранении имуществ и капиталов, принадлежащих вышеуказанным предприятиям, несут ответственность перед судом Республики.

Подписали:

Председатель Высшего совета народного хозяйства А. И. Рыков.

Члены Президиума Л. Карпов, А. Ломов.

ПРИЛОЖЕНИЕ VIII

Постановление Высшего совета народного хозяйства «О переходе в ведение Республики складов и предприятий, торгующих химическими продуктами»

1. Все склады и вообще предприятия, торгующие химическими продуктами оптом и в розницу, находящиеся в пределах РСФСР и принадлежащие частным лицам и обществам, поступают со всеми наличными товарами и капиталами, помещениями и оборудованием в ведение и распоряжение Отдела химической промышленности Высшего совета народного хозяйства. Служебный персонал предприятий остается па своих местах, считаясь на службе тех местных учреждений по Отделу химической промышленности Высшего совета народного хозяйства, в заведывание которых поступают эти предприятия.
2. На текущие счета владельцев указанных предприятий накладывается арест впредь до выяснения отношения этих счетов к оборотным средствам этих предприятий.
3. Заведывание предприятиями под общим управлением Отдела химической промышленности Высшего совета народного хозяйства поручается:
    1. Местным органам Отдела химической промышленности Высшего совета народного хозяйства при Губернских советах народного хозяйства или экономических Отделах советов депутатов: а) предприятиями исключительно торгового характера, которые ни с какими производственными предприятиями общим управлением не связаны и б) торговыми предприятиями, связанными с такими производственными предприятиями, которые не входят в групповые объединения отдельной отрасли химической промышленности, управляемые Центральными или Районными производственными правлениями.
    2. Центральным или Районным производственным правлениям теми торговыми предприятиями, которые связаны общим управлением с производственными предприятиями, управляемыми теми же Производственными правлениями, а также складами смешанного характера.

4. Отпуск товаров из складов и магазинов производится по разрешениям:
   1. Для производственного потребления фабрик, заводов и вообще производственных предприятий, входящих в групповые объединения отдельной отрасли промышленности соответствующих Центральных (или Районных, если Центральных не образовано) производственных правлений, на основании плановых нарядов Отдела химической промышленности Высшего совета народного хозяйства его местным органам, а до получения таких нарядов по разрешениям Центральных (или Районных, если Центральных не образовано) производственных правлений, подтвержденным Отделом химической промышленности Высшего совета народного хозяйства.
   2. Для производственного потребления фабрик, заводов и т. п., не входящих в групповые объединения – по разрешениям местных Советов народного хозяйства или экономических Отделов Губернских советов депутатов в пределах нормы, утвержденной Отделом химической промышленности.
   3. Для непроизводственного потребления населения и домашнего хозяйства по разрешениям Главного управления продукторараспределения (Главпродукта) и местных органов Народного комиссариата по продовольствию в пределах нормы, устанавливаемой Отделом химической промышленности Высшего совета народного хозяйства, и утверждаемой Комиссией использования.
   4. Для медицинского потребления – по разрешениям Народного комиссариата Здравоохранения и его местных органов в пределах нормы, установленной Отделом химической промышленности Высшего совета народного хозяйства по соглашению с Комиссариатом здравоохранения.

Плановые наряды выдаются и потребительские нормы устанавливаются Отделом химической промышленности Высшего совета народного хозяйства по представлению Центральными производственными правлениями, местными Советами народного хозяйства, Главпродуктом и Комиссариатом здравоохранения своих трехмесячных потребностей.

5. Отпуск товаров производится по ценам, устанавливаемым местными учреждениями Отдела химической промышленности Высшего совета наводного хозяйства, в заведывание которых поступают торговые предприятия, и утверждаемым Отделом химической промышленности Высшего совета народного хозяйства.
6. В пределах г. Москвы заведывание всеми предприятиями, торгующими оптом и в розницу химическими продуктами, поручается под управлением Отдела химической промышленности Высшего совета народного хозяйства химическому отделу Московского городского совета народного хозяйства.

В пределах г. Петербурга заведывание такими предприятиями поручается Химической секции Совета народного хозяйства Северного района.

7. Настоящее постановление входит в силу для г. Москвы и Петербурга со дня его опубликования, а для всех остальных местностей РСФСР с 15 марта 1919 года.

Подписали:

Председатель Высшего совета народного хозяйства *А. И. Рыков*.

Члены Президиума *Л. Карпов*, *А. Ломов*.

1 марта 1919 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ IX

Постановление Совета труда и обороны «Основные положения о мерах к восстановлению крупной промышленности и поднятию» и развитию производства

Совет труда и обороны постановляет:

1. Наиболее крупные, технически оборудованные, целесообразно организованные и соответственно расположенные предприятия в данной отрасли промышленности могут быть соединены в порядке ст. VIII настоящего Положения в особое объединение, организуемое на началах хозяйственного расчета. На тех же началах могут быть выделены и отделены предприятия.
2. Правление такого рода объединений (и предприятий) организуется в составе или соответственного Главного управления или при Высшем совете народного хозяйства, в зависимости от размера и характера объединения (предприятия). Форма взаимоотношений между Правлением объединений (предприятий) и Главным управлением или Губернским советом народного хозяйства по принадлежности, порядок контроля и степень самостоятельности определяются особой инструкцией Президиума Высшего совета народного хозяйства. Правление Объединения (предприятия) назначается для центра Президиумом Высшего совета народного хозяйства по представлению Главного управления и соответствующего Центрального комитета Профессионального союза и Президиумом Губернского совета народного хозяйства с Губернскими советами профессиональных союзов для мест.
3. Правлению объединения (предприятия) передаются в заведывание соответственные предприятия со всем их оборудованием, материалами, запасами, топливом и сырьем, полуфабрикатами, с необходимыми подсобными предприятиями (Советскими хозяйствами, сельскохозяйственными угодьями, разработками и т. д.), причем всему передаваемому имуществу составляется опись по оценке, производимой согласно специальной инструкции, утверждаемой Советом труда и обороны.

Вся продукция объединения (предприятия), за покрытием расходов по производству, поступает в общий государственный фонд.

Примечание. В основу оценки кладется стоимость зданий, оборудований и прочего инвентаря в золотой валюте, исходя из инвентарных описей с поправкой на износ, материалы и сырье расцениваются применительно к средним ценам западно-европейского рынка (в частности Лондонского).

4. Правление объединения (предприятия) представляет в высший руководящий орган по принадлежности проект производственного плана с соответствующей денежной и материальной сметой в общеустановленном порядке.

В целях обеспечения работы объединения (предприятия) денежными знаками, продовольствием, сырьем, топливом и т. д. государство отпускает в пределах плана использования в распоряжение Правления объединения (предприятия) определенные фонды, эквивалируя их частью продукции; для пополнения недостающих ресурсов Правлению объединения (предприятия) предоставляется право самостоятельной заготовки за счет своей продукции продовольствия, сырья, топлива, материалов и т. д. согласно норм, утверждаемых Советом труда и обороны.

Примечание. Для наибольшего достижения хозяйственных мероприятий, предприятиям и группам предприятий не только однородной отрасли промышленности, но и различных производств, предоставляется право объединения по вопросам заготовок топлива, продовольствия, материалов, обработки Советских хозяйств и т. п.

5. V. Для улучшения техники производства, покупки машин, вспомогательных материалов и в экстренных случаях для закупки продовольствия и одежды Правлению объединения (предприятия) предоставляется право закупок за границей с обращением на это части своей продукции или за наличный расчет на основании особых соглашений Высшего совета народного хозяйства и Народного комиссариата внешней торговли и с утверждением Совета труда и обороны.
6. <Печатается в редакции, установленной дополнительным постановлением Совета труда и обороны от 17 августа>. Порядок приема и увольнения, а также норма выработки и условия оплаты труда разрабатываются Правлением объединения (предприятия) по соглашению с соответствующим Профессиональным союзом и отделом труда по принадлежности. Оплата труда должна быть не ниже ставок, установленных производственным союзом для соответствующей категории трудящихся.
<*> П. 6.
7. Правление объединения (предприятия) находится под контролем соответственного высшего органа и несет полную ответственность за выполнение производственного плана, качество выпускаемых изделий, сохранность имущества, состояние хозяйства и отвечает за свои действия не только в административном порядке, но также и по суду.

Примечание. Порядок отчуждения или сдачи в аренду принадлежащих объединению (предприятию) земель, угодий, зданий, оборудования и т. п. устанавливается Высшим советом народного хозяйства.

8. На основании настоящего положения Президиуму Высшего совета народного хозяйства предоставляется право по соглашению с Президиумом Всероссийского центрального совета профессиональных союзов утверждать положения о выделении как целых групп промышленных предприятий, так и отдельных предприятий для управления ими на вышеизложенных началах.

Подписали:

Председатель Совета труда и обороны В. Ульянов (Ленин).

Секретарь Совета труда и обороны Л. Фотиева.
12 августа 1921 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ X

Совет народных комиссаров СССР декрет от 17 июля 1923 года «О государственных промышленных предприятиях, действующих на началах коммерческого расчета (трестах), находящихся в управлении местных органов»

I. Общие положения

1. Трестами местного значения признаются подведомственные Губернским и Областным советам народного хозяйства, а также советам народного хозяйства автономных республик государственные промышленные предприятия, которым предоставляется самостоятельность в производстве их операций согласно утвержденному для каждого из них уставу и которые действуют на началах коммерческого расчета с целью извлечения прибыли.

Означенные тресты организуются Губернскими советами народного хозяйства (Областными советами народного хозяйства), находятся в их ведении и несут ответственность по своим обязательствам в пределах состоящего в их распоряжении имущества (ст. 15).

Государственная казна, а равно и соответствующие губернские исполнительные комитеты за долги трестов не отвечают.

2. Государственный трест со дня его регистрации приобретает права юридического лица (Гражданский кодекс, ст. 13 и 1-я часть ст. 19).
3. Каждый трест является единым предприятием, в состав которого входят несколько производственных единиц (заведений), как то: фабрик, заводов, промыслов, отделений, магазинов и т. п., перечисленных в его уставе.

Примечание. Настоящий декрет может быть применяем и к предприятиям, в состав которых входит лишь одна производственная единица.

4. Трест владеет, пользуется и распоряжается предоставленным ему государственным имуществом, а равно производит свои операции на общем основании гражданских законов с теми изъятиями, которые установлены или будут установлены в особых законах. Равным образом, на основании гражданских законов (ст. 21 Гражданского кодекса) земля, ее недра, воды и леса предоставляются трестам на праве пользования.
5. Отношение трестов к профессиональным союзам регулируется действующими, специально на этот предмет издаваемыми постановлениями.

II. Учреждение и регистрация

6. При учреждении каждого треста Губернским советом народного хозяйства (областным советом народного хозяйства) составляется особый устав с точным обозначением:
   а) наименования (фирмы) треста, местонахождения его правления, а равно перечня заведений треста и их местонахождения;
   б) предмета предприятия;
   в) срока действия, если таковой установлен;
   г) размера предоставляемого тресту при его основании уставного капитала (ст. 13), выраженного в золотых рублях;
   д) численного состава и полномочий правления.

   В означенный устав могут быть включаемы и другие, не противоречащие законам постановления.
7. Губернский совет народного хозяйства (областной совет народного хозяйства) определяет состав имущества (уставного капитала), предназначенного для передачи тресту, и составляет этому имуществу инвентарную опись и оценку по существующим рыночным ценам с переводом на золотые рубли.

   Примечание. Общий порядок составления инвентарных описей и оценки определяется особой инструкцией Совета труда и обороны.
8. Губернский совет народного хозяйства (областной совет народного хозяйства) представляет устав треста на утверждение Губернского экономического совещания по соглашению с Промышленным бюро, а где таковых нет – высшего совета народного хозяйства данной союзной республики.

   Примечание. Разногласия между Губернским экономическим совещанием и Промышленным бюро по поводу утверждения устава треста разрешаются подлежащими областными экономическими совещаниями; аналогичные разногласия между Губернским экономическим совещанием и Высшим советом народного хозяйства разрешаются экономическим совещанием данной союзной республики.
9. По утверждении устава Губернский совет народного хозяйства (Областной совет народного хозяйства) назначает правление треста (ст. 27) и передает ему по особому акту все имущество треста, согласно вышеуказанной описи и оценке.

   Правление проверяет опись и оценку и составляет вступительный баланс, который проверяется ревизионной комиссией, о чем составляется протокол.
10. В двухнедельный срок после приемки имущества по заявлению правления производится регистрация треста в областном Экономическом совещании, где они есть; там же, где нет областного Экономического совещания, регистрация производится тем же учреждением и порядком, какие установлены для регистрации смешанных акционерных обществ, причем правление представляет в заверенных копиях:
    а) утвержденный устав треста в трех экземплярах;
    б) постановление Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства) о назначении членов правления;
    в) опись и оценку принятого имущества;
    г) вступительный баланс;
    д) протокол ревизионной комиссии о проверке вступительного баланса.
11. Учреждение, производящее регистрацию, после совершения таковой производит за счет треста публикацию в официальном областном органе, а если такового нет, то в газете «Экономическая Жизнь», о состоявшейся регистрации треста; в публикации означаются:
    а) фирма треста и местонахождение его правления;
    б) указанный в уставе треста предмет предприятия;
    в) вступительный баланс.

    Примечание. Учреждение, производящее регистрацию, посылает по одному экземпляру устава в Высший совет народного хозяйства и совет труда и обороны Союза ССР.
12. Последующие изменения в уставе треста или его уставном капитале, или в личном составе его правления утверждаются, регистрируются и публикуются тем же порядком.

III. Имущество и порядок ответственности треста

13. Капитал, передаваемый государством тресту и фиксированный в уставе последнего, является уставным капиталом треста.

    Уставный капитал выражается в золотых рублях.

    Примечание. Земля, ее недра, воды и леса в состав капитала треста не включаются и по балансу не проводятся. Однако в уставе треста, его отчете и публикуемых балансах обязательно показывается особой внебалансовой статьей количество десятин земли и леса, коими трест пользуется, со справкой об

их средних довоенных ценах в золотых рублях, а равно и связанная с пользованием землей, ее недрами и лесами рента.

14. Уставный капитал треста распадается на:
    а) основной;
    б) оборотный. Под основным капиталом понимается все имущество, которое не уничтожается целиком в одном акте производства, как то: фабричные и другие строения, машины, оборудования, инструменты, живой и мертвый инвентарь и т. п. Под оборотным капиталом понимаются деньги, ценные бумаги, продукция, а равно все предметы, которые могут быть только однажды использованы в процессе производства, как то: топливо, сырье, разные материалы и т. п.
15. При обращении взыскания на имущество треста соблюдаются следующие правила:
    а) на имущество, относящееся по роду своему согласно ст. 15 к оборотному капиталу, взыскание обращается таким же порядком, как на имущество частных лиц.

Примечание. Споры о принадлежности имущества к оборотному или основному капиталу, возникающие при производстве взысканий, разрешаются подлежащим судом по месту нахождения спорного имущества;

    б) на имущество, относящееся к основному капиталу, как переданному тресту при его учреждении, так и приобретенному им впоследствии, взыскание может быть обращено лишь с соблюдением ст. 22 и примечания к ней Гражданского кодекса и ст. 26 п. «а» настоящего декрета.

IV. Финансы местных трестов и распределение прибыли

16. Финансирование трестов государством совершается, как правило, в порядке предоставления трестам соответствующих денежных средств. Замена денежных средств иными ценностями может совершаться лишь по соглашению с трестами и с обязательным выражением этих ценностей в денежной форме.
17. Все денежные и материальные средства, предоставляемые государством тресту до утверждения его устава в порядке, установленном настоящим декретом, и находящиеся к моменту утверждения устава в распоряжении треста, подлежат оценке и внесению в уставный капитал треста с единовременным особым учетом в губернском финансовом отделе, если средства эти не получены трестом в порядке ссуды.
18. Все местные тресты в порядке и в сроки, установленные правилами составления и исполнения местного губернского бюджета, представляют в Губернские советы народного хозяйства (Областные советы народного хозяйства) свои финансовые и производственные сметы на предстоящий бюджетный год, а равно и балансы и отчеты за истекший год; Губернские советы народного хозяйства представляют все перечисленные материалы со своим заключением на рассмотрение и утверждение Губернских экономических совещаний.

Утвержденные Губернскими экономическими совещаниями программы и сметы Губернские советы народного хозяйства представляют в недельный срок в соответствующие Промышленные бюро, а где таковых нет – в Высший совет народного хозяйства данной союзной республики. В случае несогласия с утвержденными программами и планами Высший совет народного хозяйства или Промышленное бюро в месячный срок со дня получения программы и планов имеют право опротестовать их: Высший совет народного хозяйства в Экономическое совещание данной союзной республики, Промышленное бюро – в Областное экономическое совещание. Непринесение протеста в указанный срок рассматривается как согласие Высшего совета народного хозяйства и Промышленного бюро с утвержденными программами и планами.

19. В составе местного бюджета образуется для финансирования местной промышленности специальный промышленный фонд, составляемый из процентных отчислений:
    а) от прибыли местных промышленных предприятий;
    б) от сумм, вырученных при продаже старого промышленного имущества, а также мелких промышленных предприятий, поскольку таковая продажа допускается законом;
    в) от арендной платы за сданные в аренду предприятия, подведомственные Губернскому совету народного хозяйства (Областному совету народного хозяйства).

Примечание. Размер подлежащего отчислению в промышленный фонд процента от прибыли промышленных предприятий ежегодно определяется Губернским экономическим совещанием по представлению Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства), согласованному с Губернским финансовым отделом, и по утверждении Народного комиссариата финансов по соглашению с высшим советом народного хозяйства. Процент отчисления от продажи старого имущества и мелко-промышленных предприятий от арендной платы определяется инструкцией Народного комиссариата финансов и Высшего совета народного хозяйства Союза ССР, утвержденной Советом труда и обороны.

Порядок и правила расходования промышленного фонда определяются специальной инструкцией, вырабатываемой Народным комиссариатом финансов и Высшим советом народного хозяйства Союза ССР, утверждаемой Советом труда и обороны.

20. Вся прибыль треста вносится в общие ресурсы местного губернского бюджета, за исключением:
    а) отчисления не менее 20 % в резервный капитал треста, пока последний не достигнет половины уставного капитала;

б) отчислений в промышленный фонд;
в) отчислений на выдачу тантьем членам правления и наградных рабочим и служащим. Размер отчисления в резервный капитал треста и размер отчислений на выдачу тантьем и наградных определяется Губернским советом народного хозяйства (областным советом народного хозяйства) и утверждается Губернским экономическим совещанием (Областным экономическим совещанием).

21. Прибыль местных промышленных предприятий включается в местный бюджет по каждому объединению промышленных предприятий (тресту) в отдельности, а при наличии отдельных промышленных предприятий – по отраслям промышленности.

Примечание. В отдельных случаях по постановлениям Губернского экономического совещания, утвержденным Народным комиссариатом финансов и Высшим советом народного хозяйства по соглашению, в местный Губернский бюджет включается сальдо всей местной промышленности в целом.

22. Дефицитное сальдо промышленных предприятий может вноситься в местный бюджет лишь в случае возможности его покрытия за счет промышленного фонда, который может расходоваться только по специальным постановлениям Губернских экономических совещаний и лишь в отношении предприятий, имеющих особо важное значение для данного района, и при условии возможности безубыточной эксплоатации этих предприятий в дальнейшем.
23. Тресты могут получать краткосрочные ссуды как от государственных, так и не от государственных кредитных учреждений на общем для частных предприятий основании, с обязательным проведением по своему балансу соответствующих статей по каждому виду кредита отдельно.
24. Привлечение других государственных предприятий и кооперации, а также частного капитала к участию в капитале треста может производиться не иначе, как путем реорганизации треста в смешанное акционерное общество, утверждаемое в установленном порядке.

V. Органы управления и ревизии

25. Органами управления и ревизии треста являются:
а) Губернский совет народного хозяйства (Областной совет народного хозяйства);
б) правление или единоличный управляющий;
в) ревизионная комиссия.

A. Губернский совет народного хозяйства

26. Все права по управлению трестами местного значения принадлежат Губернскому совету народного хозяйства (Областному совету народного хозяйства), поскольку права эти не ограничены уставом треста, но непременному ведению Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства) подлежат:
а) разрешение на приобретение и отдачу в аренду (с соблюдением правил, указанных ст. ст. 152–179 Гражданского кодекса) строений и других частей основного капитала, а равно расширение предприятий с определением порядка погашения затрат, связанных с приобретением строений и расширением предприятий; на отдачу в аренду предприятий на срок свыше шести лет и взятие в аренду предприятий, а также на отчуждение и залог тех частей основного капитала, которые не запрещены к отчуждению и закладу (ст. 22 Гражданского кодекса).

Примечание. Означенные в настоящем пункте обязанности Губернский совет народного хозяйства (Областной совет народного хозяйства) осуществляет с утверждения и по соглашению с Промышленным бюро (а где их нет – Высшим советом народного хозяйства) и Губернским экономическим совещанием. Разногласия между Промышленным бюро и Губернским экономическим совещанием разрешаются Областным экономическим совещанием, между Высшим советом народного хозяйства и Губернским экономическим совещанием – экономическим совещанием данной союзной республики;

б) разрешение на отдачу в аренду предприятий на срок до шести лет и на снятие в аренду подсобных предприятий;
в) назначение и смещение членов правления, ревизионной и ликвидационной комиссии с соблюдением ст. ст. 27, 39 и 48;
г) утверждение избранного правления, директора-распорядителя, если таковая должность будет установлена, а равно утверждение представления правления о назначении и смещении главного бухгалтера;
д) утверждение и изменение инструкции правлению, директору-распорядителю и главному бухгалтеру в пределах действующих законов, положений и устава данного треста;
е) рассмотрение для представления на утверждение согласно ст. 18 смет и плана действий на наступающий год на основе утвержденного производственного плана по данной отрасли промышленности (ст. 18), а также отчетов и балансов за истекший год;
ж) составление плана распределения прибыли за истекший год с соблюдением правил ст. 20 раздела IV;
з) разрешение вопросов об изменении устава и размера уставного капитала и ликвидации треста с соблюдением ст. 12 и 48 настоящего декрета;
и) разрешение расходования резервного капитала;

к) разрешение с утверждения Губернского экономического совещания правлению вносить существенные изменения в утвержденный производственный план;

л) разрешение на поступление в синдикаты и с утверждения Губернского экономического совещания иные торгово-промышленные объединения.

Примечание. Местные и центральные государственные органы не имеют права вмешиваться в текущую административную операционную работу правления треста, однако в уставе треста могут быть указаны конкретно определенные предметы, помимо указанных в настоящей статье, подведомственные Губернскому совету народного хозяйства (Областному совету народного хозяйства), исключаемые тем самым из компетенции правления данного треста.

Б. Правление

27. Правление треста в количестве трех членов либо единоличный управляющий и его заместитель назначается Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства) на один год.

По заключении отчетного года и представлении баланса Губернский совет народного хозяйства (Областной совет народного хозяйства) пересматривает состав правления и определяет его состав на следующий операционный год. Тем же порядком пересматривается вопрос о продлении полномочий и единоличному управляющему. В течение операционного года председатель правления или единоличный управляющий может быть смещен Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства) лишь по обнаружении ревизионной комиссией или судебными властями несоответствия возложенных на него обязанностей, бесхозяйственности и других преступных деяний.

Члены правления могут быть смещены при тех же условиях, а также по соглашению Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства) с председателем правления и по другим соображениям.

Размер и форма вознаграждения председателю и членам правления и в подлежащих случаях единоличному управляющему и его заместителю определяются Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства).

Из числа членов правления или же посторонних лиц может быть назначаем правлением с утверждения Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства) директор-распорядитель, вознаграждение которому определяется правлением и утверждается Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства).

28. Председатель и члены правления при исполнении своих обязанностей должны проявлять предусмотрительность заботливого хозяина и несут дисциплинарную, уголовную и гражданскую ответственность как за целость вверенного им имущества, так и за хозяйственное ведение дела.
29. Для действительности решений в заседании правления должно присутствовать большинство членов.

Решение правления постановляется простым большинством голосов присутствующих членов; в случае разделения голосов поровну голос председателя дает перевес. Принятые постановления вступают в силу немедленно.

Примечание. В случае разногласия между председателем и большинством правления председатель имеет право проводить свое решение в жизнь с немедленным доведением о существе разногласия и принятых им мерах до сведения Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства), который имеет право отменить решение председателя.

30. Заседанием правления ведутся журналы, которые подписываются председателем правления и утверждаются правлением в его ближайшем заседании.
31. Обязанности правления и пределы его прав должны быть точно установлены в уставе треста. В своей практической деятельности правление руководствуется инструкцией, утверждаемой и изменяемой Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства) (ст. 26).
32. Правление руководит всеми операциями треста, управляет делами и находящимся в распоряжении треста имуществом и является представителем треста на суде и вне суда.

Правление заключает все сделки, входящие в круг операций треста, в том числе сдает подряды и поставки и принимает их на себя, испрашивая предварительное разрешение Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства) лишь в тех случаях, которые точно указаны в настоящем декрете, в уставе треста и инструкции, утвержденной высшим советом народного хозяйства.

Для третьих лиц имеют силу лишь те ограничения полномочий правления по заключению сделок, которые установлены в законе и уставе треста. Ограничения же, установленные в инструкциях Высшего совета народного хозяйства и Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства), обязательны для третьих лиц только в тех случаях, если они были или должны были быть им известны.

В частности, к ведению правления относятся:

а) организация производства и руководства деятельностью всех входящих в состав треста производственных единиц (заведений);

б) устройство кассы и делопроизводства, ведение отчетности по системе двойной бухгалтерии, а равно составление отчета, баланса, сметы, производственного плана и плана действий;

в) прием и увольнение служащих и рабочих;
г) покупка и продажа имущества как за наличные деньги, так и в кредит с соблюдением ст. 26 сего декрета;
д) наем складов и помещений;
е) страхование имущества треста;
ж) выдача и принятие к платежу векселей и других срочных обязательств;
з) дисконт векселей, поступающих на имя треста;
и) выдача доверенностей;
к) совершение законных (ст. 22 Гражданского кодекса) актов на приобретение, отчуждение, отдачу в аренду и залог строений с соблюдением п. «а» ст. 26 сего декрета;
л) участие в съездах и бюро съездов, синдикатах и разного рода торговых и промышленных объединениях с соблюдением п. «л» ст. 26 сего декрета;
м) прием заказов;
н) другие дела, поскольку они не входят по уставу треста в компетенцию Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства).

33. В уставе треста указывается, кем совершаются сделки и юридические действия от имени правления треста.

Распределение работ между членами правления производится постановлениями правления.

34. Правление производит расходы по сметам, утвержденным согласно ст. 26 п. «е».

Правление может производить расходы сверхсметного назначения в случаях, не терпящих отлагательств, с ответственностью правления перед Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства) за необходимость и последствия сего расхода. О каждом таком расходе должно быть в трехдневный срок сообщено Губернскому совету народного хозяйства (Областному совету народного хозяйства).

Примечание. Все права и обязанности правления треста, предусмотренные ст. 28, 31, 32 и 34 относятся и к единоличному управляющему.

35. Операционный год устанавливается с 1 октября по 30 сентября. Если трест образован до 1 июля, то первый отчет составляется за период до 1 октября того же года; если трест образован после 1 июля, то первый отчет составляется за операционный период с момента возникновения трестов до 1 октября следующего года.

Отчет составляется правлением не позднее трех месяцев по окончании операционного года и представляется с заключением ревизионной комиссии на рассмотрение Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства) (ст. 26 п. «е»).

По утверждении отчета (ст. 18), которое должно последовать не позднее как через три месяца по окончании операционного года, баланс и счета прибылей и убытков одновременно публикуются в официальных областных или губернских органах и сообщаются в учреждение, в котором зарегистрирован трест.

36. При составлении годового отчета обязательно производится инвентарная опись с оценкой всего имущества, выраженная в золотых рублях, и составляется баланс также в золотых рублях.

Примечание 1. Единообразное для всех трестов правило пересчета на золотые рубли устанавливается особой инструкцией Совета труда и обороны.

Примечание 2. Правила производства инвентарной описи определяются Высшим советом народного хозяйства в инструкции главному бухгалтеру.

37. При составлении баланса должны быть соблюдаемы в особенности следующие правила:
а) ценные бумаги и товары, имеющие биржевую или рыночную ценность, показываются в балансе не выше биржевой или рыночной цены того момента, на который составляется баланс; если, однако, эта цена превышает покупную или заготовительную цены, то не выше этой последней;
б) имущество, не имеющее биржевой или рыночной цены, показывается не свыше покупательной или заготовительной цены;
в) имущество, входящее в состав основного капитала, несмотря на постепенное уменьшение его стоимости, показывается по покупательной или заготовительной цене, а в надлежащих случаях – по цене, по которой оно было принято трестом при его образовании, с тем, однако, условием, что уменьшение его стоимости вследствие изнашивания показывается путем ежегодного отчисления процента его стоимости в капитал погашения имущества;
г) сомнительные требования показываются по вероятной их стоимости, а безденежные списываются в убыток и не включаются в актив;
д) расходы по организации и управлению не могут быть показаны в активе баланса и списываются в убыток;
е) уставный капитал, резервный капитал, капитал погашения имущества, а также все специальные капиталы, предусмотренные уставом треста, а равно все долги треста должны быть показаны в пассиве;
ж) оказавшиеся из сравнения всего актива и пассива прибыли и убытки показываются отдельно в конце баланса.

38. Управление отдельными производственными единицами (заведениями), входящими в состав треста, поручается директорам и заведующим, назначаемым и увольняемым правлением треста и действующим на началах единоличия в пределах полномочий, предоставленных им правлением.

В. Ревизионная комиссия

39. Для ревизии местных трестов Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства) организуется одна или в случае

необходимости несколько ревизионных комиссий. Состав ревизионной комиссии определяется в три человека: председатель и один член назначаются Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства), а другой член делегируется Губернским советом профессиональных союзов.

Вознаграждение всем членам ревизионной комиссии и смета ее расходов определяются Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства) и оплачиваются правлением соответствующих трестов.

40. В обязанности ревизионной комиссии входит: проверка периодических отчетов и балансов, предусмотренная уставом треста, дача заключений по проектам сметы и плану работ, а равно по годовому отчету в целом.

Для осуществления этих задач члены ревизионной комиссии вправе требовать предъявления книг, оправдательных документов, договоров, переписки, проверять наличность кассы и опрашивать членов правления и служащих предприятий по возникающим при рассмотрении отчетов и документов вопросам.

По поручению Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства) и по своей инициативе ревизионная комиссия производит внезапные ревизии и обследования.

Ревизионная комиссия не вправе ни производить предварительный контроль, ни давать правлению по его запросам или без запроса предварительные заключения по отдельным мероприятиям и предложениям правления.

Ревизионная комиссия может приглашать для осуществления своих задач сведующих лиц.

Члены ревизионной комиссии несут дисциплинарную и уголовную ответственность за неправильные действия и упущения при исполнении своих обязанностей, в частности при даче заключений по отчетам и балансам.

VI. Амортизация, резервный капитал

41. В каждом тресте ежегодно производится амортизация имущества, входящего в его основной капитал, путем определенного в уставе треста процентного отчисления с первоначальной стоимости этого имущества в капитал погашения имущества, согласно особой инструкции Высшего совета народного хозяйства.
42. Резервный капитал служит как для покрытия убытков, так и для расширения предприятий.

По достижении резервным капиталом половины уставного капитала Губернский совет народного хозяйства (Областной совет народного хозяйства) может возбудить в порядке изменения устава (ст. 12) вопрос об увеличении уставного капитала путем перечисления в него части резервного.

VII. Налоги, цены, занаряживания

43. Тресты облагаются всеми видами налогов, в том числе и подоходным, наравне с частными предприятиями, поскольку иное не установлено в законе.
44. Все тресты обязаны состоять членами биржи и регистрировать свои оптовые сделки. Продукция трестов реализуется по ценам, назначаемым по соглашению с покупщиком. Обязательные для треста отпускные цены на товары, предназначенные для свободной продажи, могут быть устанавливаемы в необходимых случаях лишь согласованными с Губернским экономическим совещанием постановлениями Высшего совета народного хозяйства или постановлениями экономического совещания данной союзной республики, или постановлениями Совета труда и обороны Союза ССР.
45. Допускается занаряживание постановлениями Совета труда и обороны (или экономического совещания данной союзной республики) через Высший совет народного хозяйства продукции треста по ценам ниже рыночных, но не ниже себестоимости с начислением средней прибыли.

Занаряживание производится путем обязания треста заключить соответствующий договор с органом, в интересах которого дан наряд, причем в случае невыполнения государственным органом денежных обязательств по такому договору ответственной является государственная казна в целом.

В случае, если тресту, отпускающему свою продукцию в порядке занаряживания, не будет произведен какой-либо платеж в один из установленных по данному договору сроков, то тресту предоставляется право отказаться от дальнейшей поставки и взыскивать свои убытки на общем основании.

Примечание 1. В исключительных случаях предусмотренное настоящей статьей право занаряживания предоставляется Губернскому экономическому совещанию, но обязательно с согласия промышленного бюро, а где его нет – Высшего совета народного хозяйства.

Примечание 2. Поскольку сделки совершаются между трестами и государственными учреждениями, занаряживание может происходить лишь в пределах бюджетных назначений.

Примечание 3. Одновременно с занаряживанием платеж может быть особым постановлением Совета труда и обороны или экономического совещания данной союзной республики отсрочен, но не далее конца операционного года, когда и производится окончательный расчет треста с казной.

46. При покупках и продажах тресты обязаны при прочих равных условиях оказывать преимущество государственным органам и кооперативным объединениями, выступившим в качестве контрагентов.

VIII. Ликвидация

47. Трест обращается к ликвидации по постановлению Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства), утверждаемому по соглашению с Губернским экономическим совещанием и Промышленным бюро, а где его нет – Высшим советом народного хозяйства. Разногласия между Губернским экономическим совещанием и Промышленным бюро разрешаются Областным экономическим совещанием, между Губернским экономическим совещанием и Высшим советом народного хозяйства – экономическим совещанием данной союзной республики.
Ликвидация производится в случаях:
а) уменьшения уставного капитала на две пятых, если не будет признано необходимым пополнение капитала из других источников или соответствующее уменьшение уставного капитала с соблюдением ст. 12;
б) недостаточности оборотных средств треста для покрытия долгов, предъявленных ко взысканию;
в) признания нецелесообразности дальнейшего существования данного треста.
48. Ликвидация производится назначаемой Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства) ликвидационной комиссией с участием представителя соответствующего профессионального союза и губернского финансового отдела в срок, определяемый Губернским советом народного хозяйства (Областным советом народного хозяйства) с утверждения Губернского экономического совещания, но не далее полугода со дня публикации. Постановления о ликвидации и назначении ликвидационной комиссии публикуются в установленном порядке. Оставшееся по ликвидации имущество поступает в распоряжение Губернского совета народного хозяйства (Областного совета народного хозяйства) и на учет губернского финансового отдела.

Примечание. При ликвидации треста по п. «б» ст. 47 губернский суд по просьбе кредиторов по месту нахождения правления треста может назначить представителя их интересов и ликвидационную комиссию.

IX. О введении в действие настоящего декрета

49. Настоящий декрет вводится в действие со дня его опубликования, причем с момента опубликования ни один местный трест не может быть организован иначе, как по правилам настоящего декрета. Все существующие местные тресты должны быть не позднее четырех месяцев со дня опубликования сего декрета зарегистрированы, а действующие положения о них должны быть заменены утвержденными согласно с настоящим законом уставами. В отдельных случаях Высший совет народного хозяйства может особым постановлением продлить указанный срок еще на два месяца.

Подписали:

Заместитель председателя Совета народных комиссаров Л. Каменев.

Управляющий делами Совета народных комиссаров Н. Горбунов.

Секретарь Совета народных комиссаров Л. Фотиева.

ПРИЛОЖЕНИЕ XI

Постановление ЦИК (12 ноября 1923 г.) «О порядке управления промышленными предприятиями, имеющими общесоюзное значение и находящимися в ведении Высших советов народного хозяйства»

На основании п. «з» ст. I «Основного Закона Союза ССР», в целях точного определения отдельных отраслей промышленности и отдельных промышленных предприятий, имеющих общесоюзное значение, а равно для точного разграничения прав я обязанностей ВСНХ Союза ССР в ВСНХ Союзных Республик по управлению предприятиями общесоюзного значения, Центральный исполнительный комитет Союза ССР постановляет:

1. Признать имеющими общесоюзное значение поименованные в прилагаемом при сем списке государственные предприятия, в виду их первостепенного значения для обороны союза, для охраны его интересов на мировом рынке я для проведения в общесоюзном масштабе единого плана восстановления промышленности я транспорта.
2. Указанные в ст. 1 настоящего постановления предприятия передать в непосредственное ведение ВСНХ Союза ССР, возложив на него осуществление прав я выполнение обязанностей ВСНХ, предусмотренных декретом о государственных промышленных предприятиях, действующих на началах коммерческого расчета – трестах (Собр. Узак. РСФСР 1923 г. № 29, ст. 336), а равно и другими узаконениями о государственной промышленности.
3. В порядке руководства промышленными предприятиями общесоюзного значения ВСНХ Союза ССР запрашивают заключения ВСНХ подлежащих республик при рассмотрения:
а) проектов уставов предприятий и их последующих изменений;
б) перспективных производственных планов, годовых программ и смет;
в) годовых отчетов и заключительных годовых балансов;
г) общих планов финансирования, специального кредитования общесоюзных предприятий, а также вопросов привлечения частных капиталов;
д) личного состава ревизионных комиссий.

4. Правления общесоюзных предприятий обязаны одновременно с представлением своих производственных планов, смет, отчетов я балансов ВСНХ Союза ССР, сообщать их в копия ВСНХ соответствующей Союзной Республики.
5. Постановления, вынесенные ВСНХ соответствующей Союзной Республики, при рассмотрении представленных ему, на основании ст. 4 настоящего декрета, правлениями общесоюзных предприятий материалов, сообщаются ВСНХ Союза ССР и приводятся в исполнение лишь по утверждении последним.
6. ВСНХ Союза может передавать Высшим советам народного хозяйства Союзных Республик полностью или в определенной части свои права по управлению находящимися в ведении ВСНХ Союза предприятиями, в пределах декрета о государственных промышленных предприятиях (трестах) и на основе особого каждый раз соглашения утверждаемого Совнаркомом Союза ССР.

Подписали:

Председатель Центрального исполнительного комитета Союза ССР А. Червяков.

Секретарь Центрального исполнительного комитета Союза ССР А. Енукидзе.

12 ноября 1923 г. Москва, Кремль.

С подлинным верно: Н-к п/о Приказов Упр. Дел ВСНХ (М. Дзиомко).

Список предприятий, имеющих общесоюзное значение

VI. Химическая промышленность

1. Резинотрест.
2. Бондюжское объединение.
3. Анилтрест.
4. Фарматрест.
5. Коксобензол.
6. Лакокраска.
7. Ацетометил.
8. Сантонинный завод.

ПРИЛОЖЕНИЕ XII

Постановление Народного комиссара труда «Об использовании знаний и опыта высшего технического, коммерческого, ученого и врачебного персонала в свободное от занятий время (Положение)»

1. В целях поднятия производительных сил страны и наибольшего использования знании и опыта высшего технического, коммерческого, учебного и врачебного персонала в свободное от занятий время в том учреждении или предприятии, где они получают основной оклад, допускается приглашать указанных выше лиц в другие учреждения и предприятия, по особому постановлению их руководящих Коллегий, но с согласия учреждения, где данные лица получают основное вознаграждение, – для консультации, экспертизы, а равно для выполнения определенных работ и заданий.
2. За исполнение этой работы устанавливается особое дополнительное вознаграждение почасно, пожетонно или в форме премий, причем общий размер такового в месяц не должен превышать 50 % предельного оклада в 3 000 рублей.
3. Если оклад, получаемый по основной и сверхурочной работе превышает 3 000 рублей, таковой должен согласно ст. 1, п. «б» декрета о повышении заработной платы от 21 февраля 1919 года (Собр. Узак. 1919, № 5, ст. 52) получить утверждение Совета народных комиссаров с уведомлением об этом Всероссийского центрального исполнительного комитета Советов.
4. Указанным выше лицам ведется точная регистрация при Тарифном отделе Народного комиссариата труда.

Подписал:

Народный комиссар труда В. Шмидт.

20 марта 1919 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ XIII

Декрет Совета народных комиссаров «Общие экономические и юридические условия концессий»

Совет народных комиссаров более года тому назад поставил на очередь, как практическую проблему, привлечение технических сил и материальных средств промышленно развитых государств как и целях восстановления в России одной из основных баз сырья для всего мирового хозяйства, так и для развития производительных сих ее вообще, подорванных мировой войной.

Несмотря на необходимость вести в течение трех лет вооруженную борьбу со своими врагами, Советская Республика достигла за три года значительных результатов в деле восстановления разрушенного народного хозяйства собственными усилиями и средствами. Но этот процесс восстановления производительных сил России, а вместе с тем и всего мирового хозяйства, может быть ускорен во много раз путем привлечения иностранных государственных и коммунальных учреждений, частных предприятий, акционерных обществ, кооперативов и рабочих организаций других государств к делу добывания и переработки природных богатств России. Острый недостаток в сырье и избыток свободных капиталов в некоторых Европейских странах, особенно же в Соединенных Штатах Америки, настоятельно побуждал иностранный капитал обращаться к Правительству Советской Республики с конкретными предложениями применения на тех или иных условиях иностран-

ного капитала для использования естественных богатств обширных областей РСФСР.

В настоящее время советское правительство располагает целым рядом конкретных предложений о предоставлении концессий как по разработке лесных и земельных богатств России (каковы, например, предложения предоставить свободные пахотные земли для тракторной обработки), так и по организации отдельных предприятий промышленности.

В целях широкого применения этого способа восстановления и усиления производительных сил Республики и всего мирового хозяйства, Совет народных комиссаров постановил опубликовать следующие общие экономические и юридические условия концессий, а также перечесть объекты концессий, которые могут быть заключены с солидными, заслуживающими доверие, иностранными промышленными обществами и организациями:

1. Концессионеру будет предоставляться вознаграждение долей продукта, обусловленной в договоре, с правом вывоза за границу.
2. В случае применения особых технических усовершенствований в крупных размерах, концессионеру будут предоставляться торговые преимущества (как-то: заготовка машин, специальные договоры на крупные заказы и т. д.).
3. В зависимости от характера и условий концессии будут предоставляться продолжительные сроки концессии для обеспечения полного возмещения концессионера за риск и вложенные в концессию технические средства.
4. Правительство РСФСР гарантирует, что вложенное в предприятие, имущество концессионера не будет подвергаться ни национализации, ни конфискации, ни реквизиции.
5. Концессионеру будет предоставляться право найма рабочих и служащих для своих предприятий на территории РСФСР с соблюдением Кодекса законов о труде или специального договора, гарантирующего соблюдение по отношению к ним определенных условий труда, ограждающих их жизнь и здоровье.
6. Правительство РСФСР гарантирует концессионеру недопустимость одностороннего изменения какими-либо распоряжениями или декретами Правительства условий Концессионного договора.

Подписали:

Председатель Совета народных комиссаров *В. Ульянов (Ленин)*.

Управляющий делами Совета народных комиссаров *В. Бонч-Бруевич*.

Секретарь *Л. Фотиева*.

23 ноября 1920 года.

Распубликован в № 265 «Известие Всероссийского Центрального Исполнительного Комитета Советов» от 25 ноября 1920 года.

ПРИЛОЖЕНИЕ XIV

Временное соглашение между Российской Социалистической Советской Республикой и Германией, заключенное в Берлине 6 мая 1921 года

Российская Социалистическая Федеративная Советская Республика, представленная г. Ароном Шейнман, и Германское правительство, представленное:

1) директором в Министерстве иностранных дел г. Густавом Берендт,
2) действительным легационным советником в Министерстве иностранных дел бароном Аго-фон-Мальцан,
3) действительным легационным советником в Министерстве иностранных дел г. дром прав Фридрихом Гауз.

Воодушевленные желанием служить делу мира между Россией и Германией и способствовать на основах взаимного благожелательства процветанию обоих народов, заключают следующее временное соглашение:

Статья I

Круг деятельности существующих уже делегаций обоих государств для попечения о военнопленных расширяется таким образом, что им поручается защита интересов граждан их стран. К делегациям присоединяются торговые представительства для развития экономических сношений между обеими странами. До полного восстановления нормальных сношений делегации именуются: «Представительство Российской Социалистической Федеративной Советской Республики в Германии» и «Германское Представительство в России». Место пребывания представительств – Москва и Берлин.

Представительство РСФСР в Германии признается единственным представительством Российского государства в Германии.

Статья II

Руководитель представительства пользуется преимуществами и льготами глав аккредитованных миссий. Преимуществами и льготами членов аккредитованных миссий пользуются пока, впредь до заключения особого соглашения, также семь членов представительств, поскольку они не являются подданными государства, где пребывает данное представительство.

Относительно лиц, занятых в представительствах, которые не являются подданными страны, где пребывает представительство, оба правительства обязуются принять необходимые административные меры для того, чтобы:

1) обыски производились у них лишь с уведомлением о том Центрального ведомства иностранных дел той страны, в которой пребывает представи-

тельство, а также поскольку замедление не сопряжено с опасностью, в присутствии уполномоченного этого ведомства и уполномоченного данного представительства;

2) о задержании и аресте было немедленно сообщено Центральному ведомству иностранных дел страны пребывания правительства, причем Центральное ведомство иностранных дел с своей стороны сообщает о случившемся руководителю представительства не позже, чем через 24 часа после задержания или ареста;
3) эти лица, равно как члены их семейств, освобождаются от общественно-правовых и трудовых повинностей всякого рода, а равно как от воинских и военных тягот.

Статья III

Каждое правительство заботится о предоставлении представительству другой страны подходящих помещений для его учреждения и квартиры для руководителя и персонала представительства. Оно обязуется далее оказывать всяческое содействие в получении материалов, необходимых для ведения дел.

Статья IV

Германское Представительство в России вправе ввозить без оплаты пошлинами и налогами материалы, необходимые для ведения своих дел и для содержания своих помещений, а также необходимые для немецкого персонала жизненные припасы и предметы потребления в количестве до 40 кило на каждого человека в месяц.

Разрешение на ввоз будет выдаваться Российским представительством в стране, из которой указанные предметы вывозятся, при предъявлении списка содержимого, который в Германии должен быть удостоверен Министерством иностранных дел, а в других странах – местными германскими представителями.

Статья V

Руководители представительств аккредитованы при Центральном ведомстве иностранных дел страны пребывания представительства. Представительства сносятся с этим ведомством, а по торговым делам и с другими центральными ведомствами непосредственно.

Статья VI

Представительства получают следующие консульские полномочия:

1) защиту интересов своих граждан согласно нормам международного права;
2) выдачу паспортов, удостоверений личности и виз;
3) составление, легализацию и удостоверение документов.

Обе договаривающиеся стороны обязуются немедленно вступить в переговоры о заключении соглашения, касающегося удостоверения актов гражданского состояния и касающегося заключения браков.

Статья VII

Каждое представительство имеет право пользоваться радиостанциями и публичными почтовыми учреждениями для беспрепятственных официальных сношений со своим правительством и представительствами своего правительства в других странах открыто или с применением шифра, также посылать курьеров на основании особого соглашения.

Статья VIII

До заключения договора, устанавливающего принципиально право граждан обоих государств, действуют следующие постановления:

1. Для русских военнопленных и гражданских интернированных, находящихся в Германии, остаются в силе постановления соглашения от 19 апреля 1920 года, дополнительного соглашения от 7 июля 1920 года и дополнительного соглашения от сего числа. Впрочем, к русским гражданам, находящимся в Германии, в отношении их личности и имущества применяются постановления международного права и общих германских законов.
2. Германские граждане, находящиеся в момент заключения настоящего соглашения на территории РСФСР, сохраняют за собой в качестве бывших военнопленных или гражданских интернированных права, вытекающие из дополнительного соглашения от сегодняшнего дня.
3. Германским гражданам, которые по торговым делам, на основании сего соглашения и с соблюдением паспортных правил, отправляются на территорию другой договаривающейся страны, РСФСР гарантирует неприкосновенность всего привезенного ими с собой или приобретенного в России имущества, поскольку приобретение его и употребление его будет соответствовать особым соглашениям, заключенным с подлежащими органами РСФСР. Неприкосновенность этого имущества обеспечивается особыми охранными грамотами РСФСР, поскольку к владельцу охранной грамоты не предъявлены претензии, вытекающие из правовых сделок, совершенных им в РСФСР после заключения настоящего соглашения.

Статья IX

Российское правительство разрешает выезд лицам, находившимся в германском подданстве, но утратившим таковое, а также их женам и детям, если при этом будет удостоверено, что их выезд совершается для переселения в Германию.

Статья X

В своих территориальных водах и портах Российское Правительство гарантирует германским судам, а Германское Правительство русским – обращение, согласное международному праву. Если русским судам, плавающим с торговой целью, в отношении судовых пошлин, будут, как государственным судам, предоставлены какие-либо особые преимущества, то и Российское Правительство гарантирует германским судам равные преимущества.

Во всяком случае, однако, судно одной из договаривающихся сторон может быть подвергнуто ответственности в портах другой стороны по денежным претензиям, находящимся в непосредственной связи с данным судном, как, например, по требованиям об уплате портовых сборов, расходов по ремонту, претензий по возмещению убытков, вытекающих от столкновения судов.

Статья XI

Оба правительства немедленно принимают все меры к скорому возобновлению нормальных почтовых, телеграфных и радиотелеграфных сношений и обеспечению этих сношений на основе особых соглашений.

Статья XII

Российское торговое представительство в Германии, в качестве государственного торгового учреждения, является законным представительством Российского Правительства, для правовых деяний на германской территории. Российское Правительство признает для себя обязательным все правовые акты, совершенные руководителем представительства или руководителем торгового представительства или, наконец, уполномоченными одного из этих двух лиц.

Германское представительство в России защищает через свое торговое представительство экономические интересы германского государства и германских граждан.

Статья XIII

Российское Правительство обязуется совершать с германскими гражданами, германскими фирмами и германскими юридическими лицами правовые сделки на территории РСФСР и на территории одного из государств, объединенных с ней общим государственным планом ввоза и вывоза, только с оговоркой о применении третейского разбирательства. В отношении правовых сделок, заключенных в Германии, и их экономического результата, Российское Правительство подчиняется германским законам; в вопросах частноправовых обязательств, однако, оно подчиняется германскому судопроизводству и германскому порядку принудительного приведения судебных приговоров в исполнение, лишь поскольку это касается обязательств, вытекающих из правовых сделок с германскими гражданами, германскими фирмами и германскими юридическими лицами, которые будут совершены после заключения настоящего соглашения. Право Российского Правительства включать и в заключенные в Германии правовые сделки оговорку о применении третейского разбирательства остается неприкосновенным.

Впрочем, имущество Российского Правительства в Германии пользуется общей защитой согласно международного права. В частности, оно, за исключением случаев, предусмотренных первым абзацем настоящей статьи, не подлежат германскому судопроизводству и германскому порядку принудительного-приведения судебных приговоров в исполнение.

Статья XIV

Представительства обеих сторон вправе привлекать дли осуществлении своих хозяйственных задач необходимых сведущих лиц.

Предложения о допущении сведущих лиц должны быть с подробной мотивировкой заявлены центральным ведомством представительству другой страны и подлежат рассмотрению в спешном порядке.

Статья XV

Представительства обеих сторон и занятые в этих представительствах лица в своей деятельности обязаны строго ограничиваться задачами, поставленными им в настоящем соглашении. В особенности они обязаны воздерживаться от всякой агитации или пропаганды против правительства или государственных учреждений страны, в которой они находятся.

Статья XVI

До заключения будущего торгового договора настоящее соглашение должно служить основой хозяйственных отношений обеих сторон и толковаться в духе взаимного благожелательства, направленного к укреплению экономических отношений.

Статья XVII

Настоящее соглашение вступает в силу со дня его подписания.

Каждая сторона вправе отказаться от этого соглашения, предупредив об этом за три месяца вперед.

Если одна из сторон откажется от соглашения, и это соглашение не будет заменено новым, то каждая из договаривающихся сторон вправе по истечении указанного для отказа срока учредить комиссию из пяти членов для ликвидации уже начатых торговых сделок. Члены комиссии считаются агентами, не носящими дипломатического характера, и должны закончить ликвидацию дел не позже, чем через шесть месяцев по прекращении действия настоящего соглашения.

Подписали:

Шейнман. Густав Берендт.

Шейнман. Аго фон Мальцан.

Шейнман. Гауз.

Берлин, 6 мая 1921 года.

Рекламная статья / Sponsored article

Высокоэффективный жидкостный хроматограф LicArt 62 – новый прибор компании «Лабконцепт»

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке ООО «Лабконцепт»

ООО «Лабконцепт» – официальный дистрибьютор ведущих производителей аналитического и общелабораторного оборудования. Помимо этого, компания занимается развитием собственного OEM-бренда аналитического оборудования – SILab. Под данной торговой маркой уже предлагается ряд приборов: атомно-абсорбционные спектрофотометры, ИК-фурье-спектрометры, УФ-Вид-спектрофотометры, ТОС-анализаторы и ионные хроматографы. LicArt 62 – новый продукт ООО «Лабконцепт». Это модульный жидкостный хроматограф, с широким выбором детекторов и несколькими вариантами исполнения насосов. Узловая сборка и настройка блоков хроматографа осуществляется на производственной площадке в Санкт-Петербурге, после чего все изделия проходят тщательную проверку в отделе технического контроля. При этом по техническим характеристикам системы LicArt 62 сопоставимы или превосходят жидкостные хроматографы ведущих мировых производителей, покинувших Российский рынок.

Labconcept Company's New HPLC System LicArt 62

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

Labconcept Ltd. company is the official distributor of the world`s leading analytical and laboratory equipment producing companies. In addition to that, Labconcept company has developed its own analytical equipment OEM-brand SILab. Various instruments under that trademark are already available on the Russian market: atomic absorption spectrophotometers, FTIR and UV-Vis spectrophotometers, TOC analyzers and ion-exchange liquid chromatography systems. LicArt 62 is a new product of Labconcept company. It is an HPLC system with modular design and with a wide range of detectors and several pump modifications available. Main blocks of LicArt 62 HPLC systems are assembled and tuned-up in Saint-Petersburg . After that all assembled instruments are thoroughly tested at the company`s Technical Control Department. Technical parameters of LicArt 62 HPLC systems perform technical parameters comparable or even superior to those of the world`s leading HPLC systems that are no longer available on the Russian market.

ООО «Лабконцепт» изначально создавалось на базе профессионального и опытного коллектива одной из крупнейших в стране компаний-поставщиков аналитического оборудования**.** Предвидя возможное развитие событий политико-экономического толка в мире, инвесторы и руководство нового предприятия сразу же с момента его образования распределили усилия сотрудников и значительный объем вложенных ресурсов так, что в самые сжатые сроки были сформированы и начали работу: центральный офис компании в Санкт-Петербурге, четыре представительства в других регионах РФ (в т. ч. и в Москве)**,** большой склад готовой продукции, крупнейшая в стране сервисная служба (18 квалифицированных сервисных инженеров, собственное сборочное производство жидкостных хроматографов и аналитическая лаборатория, сотрудники которой имеют большой опыт разработки и внедрения методик, необходимых заказчикам, а также способны проводить обучение персонала заказчиков).

Именно наличие собственной лаборатории и развитой сервисной службы позволило в обстановке, продиктованной вызовами современной действительности, быстро сфокусироваться на развитии собственного OEM-бренда аналитического оборудования – SILab. Под данной торговой маркой уже предлагаются и успешно эксплуатируются на предприятиях целый ряд приборов: атомно-абсорбционные спектрофотометры, ИК-Фурье спектрометры, УФ-Вид-спектрофотометры, анализаторы общего органического углерода, ионные хроматографы.

Но все же главным достижением компании по праву можно назвать модульный жидкостный хроматограф LicArt 62 (рисунок 1)**.**

Высокоэффективный жидкостный хроматограф LicArt 62 был разработан с применением передовых технологий, обеспечивающих длительную, надежную и эффективную работу.

При проектировании прибора мы опирались на опыт и наработки своей команды специали-



Рисунок 1. Высокоэффективный жидкостный хроматограф LicArt 62

Figure 1. LicArt 62 High-Performance Liquid Chromatography System

стов (методисты лаборатории, сервисные инженеры и специалисты по продукту), которые долгое время работали с производителем, являющимся одним из мировых лидеров в области ВЭЖХ, компанией Shimadzu. Благодаря этому у нас есть глубокое понимание требований, предъявляемых современными аналитическими лабораториями к высокотехнологичному оборудованию. Именно поэтому нам удалось создать продукт с превосходными техническими характеристиками, удобный в эксплуатации, способный бесперебойно работать в режиме 24/7 и при этом обеспечивающий низкие затраты на периодическое обслуживание.

Все компоненты для сборки системы ВЭЖХ были тщательно подобраны с учетом их технических и эксплуатационных характеристик и поставляются по максимально безопасным логистическим маршрутам, что в конечном итоге обеспечивает стабильность поставок продаваемых приборов и возможность проведения оперативного технического обслуживания, а также позволяет нам не зависеть от внешнеполитической конъюнктуры.

Основные критические узлы хроматографа включают комплектующие от ряда известных и признанных в мире производителей: Rheodyne (дозирующие краны), Hamamatsu (лампы для детекторов), Systec (насосы и камеры дегазаторов), SGE (дозирующие шприцы), Ceramaret (сапфировые плунжеры), Horiba (оптические элементы фотометрических детекторов), PSI (уплотнения плунжеров). Узловая сборка и настройка блоков хроматографа LicArt 62 осуществляется на производственной площадке в Санкт-Петербурге, после чего все изделия проходят тщательную проверку в отделе технического контроля (ОТК) на соответствие метрологическим и техническим характеристикам согласно методике поверки и внутреннему техническому регламенту предприятия. Только после успешного прохождения всех тестов приборы отгружаются конечному пользователю.

Для обеспечения бесперебойного процесса сборки нашего хроматографа мы поддерживаем на складе большое количество комплектующих и расходных материалов, а также достаточное количество готовых модулей для оперативного обеспечения наших пользователей.

Жидкостные хроматографы LicArt 62 имеют модульную компоновку, с широким выбором детекторов и несколькими вариантами исполнения насосов, благодаря чему прибор может быть укомплектован для решения абсолютного большинства актуальных аналитических задач. При этом, по техническим характеристикам системы LicArt 62 сопоставимы с жидкостными хроматографами ведущих мировых производителей, покинувших Российский рынок.

Удобство и безопасность эксплуатации наших хроматографов обеспечивают следующие технические решения:

- датчики течи в насосе, автодозаторе, термостате колонок, а также детекторах;
- защита от превышения максимального рабочего давления и возможность задания минимально допустимого рабочего давления;
- сенсор открытой двери в термостате;
- сенсор «отсутствующей виалы» в автодозаторе;
- автоматическая коррекция длины волны в фотометрических детекторах
- защита от перегрева термостата колонок и камер с источниками излучения фотометрических детекторов;
- ПО отслеживает ресурс основных расходных материалов.

Простота проведения пользовательских операций по обслуживанию LicArt 62 обеспечивается его конструкцией: все основные обслуживаемые узлы специально вынесены ближе к передней панели модулей хроматографа.

ОСОБЕННОСТИ ОСНОВНЫХ МОДУЛЕЙ ВЭЖХ LICART 62

Максимальное рабочее давление 62 МПа позволяет использовать LicArt 62 как в рамках традиционной хроматографии на колонках зернением 5 мкм, так и работать в области высоких давлений в режиме быстрой хроматографии, с возможностью работы с колонками зернением около 1,7–2,0 мкм. При этом приборы могут быть укомплектованы для работы в изократическом и градиентном режимах; градиент доступен как на стороне высокого, так и на стороне низкого давления.

Также в отличие от ряда отечественных и зарубежных систем других производителей, ВЭЖХ LicArt 62 может работать во всем диапазоне pH (1–14), тем самым расширяя доступные области применения приборов.

Удобной в работе особенностью бинарного и изократического насосов является встроенный кран выбора растворителя в стандартной комплектации. Кроме того, все типы насосов оснащены встроенными дегазаторами мембранного типа.

Двухплунжерный последовательный механизм, динамический алгоритм подавления флуктуаций давления и самосмазывающийся механизм привода плунжеров гарантируют низкие пульсации, обеспечивают высокую точность подачи элюента и поддерживают высочайшую воспроизводимость скорости потока подвижной фазы 0,06 % RSD. Ранее такой показатель воспроизводимости был только у двух производителей из «большой четверки» (Shimadzu, Thermo Fisher Scientific, Agilent Technologies, Waters Corporation).

Также насосы систем LicArt 62 (рисунок 2) оснащены встроенным механизмом динамической промывки плунжерного пространства (автоматическая промывка в течение 5 секунд каждые 35 секунд работы) и имеют возможность промывки жидкостных линий, которая доступна как с передней панели прибора, так и в качестве функции ПО. Эти особенности качественно выделяют прибор среди доступных на рынке жидкостных хроматографов, поскольку позволяют работать с буферными растворами без опасности выпадения кристаллов и нарастания микроорганизмов на поверхностях плунжеров и уплотнений, а также продлевают общий срок службы плунжеров и уплотнений, экономя ваше время и деньги на проведение периодического ТО.



Рисунок 2. **Четырехканальный градиентный насос QP-62d**

Figure 2. **QP-62d Quarternary Pump**

Приборы могут быть оснащены вместительным автодозатором с функцией охлаждения проб на 108 стандартных виал объемом 2 мл, а также имеют возможность работы с 96-тилуночными планшетами. Особая конструкция иглы и точный шприцевой насос обеспечивают высокую воспроизводимость и точность объема дозирования при широком диапазоне объемов дозируемой пробы – от 0,1 до 500 мкл.

Уникальное преимущество нашего продукта – ультранизкий уровень перекрестного загрязнения (0,003 %). Ранее близкий показатель имели только мировые лидеры в области ВЭЖХ, теперь он доступен и для пользователей систем LicArt 62. Столь низкая величина перекрестного загрязнения обеспечивается особым исполнением иглы автодозатора: ее внешняя поверхность тщательно отполирована, а внутренняя – пассивирована, кроме того предусмотрена промывка внешней и внутренней поверхности иглы (рисунок 3).



Рисунок 3. **Автодозатор S-42dc**

Figure 3. **S-42dc Autosampler**

Хроматографы LicArt 62 имеют вместительный термостат колонок воздушно-циркуляционного типа (на основе элементов Пельтье), доступно исполнение с возможностью охлаждения колонок. Термостат способен вмещать 4 колонки длиной до 250 мм и стабильно поддерживать температуру (±0,1 °C).

Также в первой половине 2023 года запланирован запуск производства нового варианта термостата с увеличенной вместимостью – он позволит размещать внутри колонки длиной до 350 мм и переключающий кран, а также расширит возможности применения ВЭЖХ LicArt 62 для задач гель-проникающей хроматографии (ГПХ) и для создания многомерных хроматографических систем, требующих работы с несколькими колонками одновременно.

В состав хроматографов LicArt 62 могут быть включены спектрофотометрический или диодно-матричный детекторы (с многоволновым режимом), а также рефрактометрический, спектрофлуориметрический или испарительный детектор по светорассеянию. Также при необходимости к приборам LicArt 62 при помощи прецизионного АЦП возможно подключить и осуществлять работу с детекторами других производителей (Waters Corporation, Agilent Technologies, Shimadzu и др.).

Все детекторы LicArt 62 соответствуют техническому уровню блоков ведущих мировых производителей. Так, например, спектрофотометрический и диодно-матричный детекторы, в отличие от других доступных на Российском рынке моделей, имеют высокую частоту опроса сигнала (100 Гц и 125 Гц соответственно), обеспечивающую их комфортное применение для быстрой хроматографии при повышенном давлении с колонками с мелким зернением, а также прекрасные показатели шума и дрейфа, не уступающие ушедшим западным производителям (рисунок 4).



Рисунок 4. Спектрофотометрический детектор UV-62

Figure 4. UV-62 Detector

Программное обеспечение LicArt 62 имеет интуитивно-понятный дружелюбный интерфейс, оснащено системой хранения, построенной на базах данных. Также ПО полностью соответствует требованиям целостности и прослеживаемости данных (21 CFR part 11, GMP/GLP): ведутся журналы аудита, возможна настройка прав пользователей, хроматографические расчеты производятся в соответствии с USP и EP. Воозможно проведение валидации (IQ/OQ) с предоставлением пользователю соответствующих протоколов.

Помимо вышесказанного, на данный момент уже начата разработка клиент-серверного ПО. Сетевое ПО будет поддерживать LicArt 62, приборы марки SILab (кроме того планируется поддержка большей части модельного ряда приборов марок Agilent и Shimadzu).

Базовым подходом нашей компании к осуществлению любого проекта является обеспечение полноценного жизненного цикла работы поставляемого оборудования, что никоим образом не представляется возможным без правильной подготовки исследуемых образцов и использования качественных расходных материалов. Исходя из этого, специалисты нашей компании всегда готовы помочь не только с комплектацией прибора под любую аналитическую задачу, но и с подбором оборудования для пробоподготовки и расходных материалов, в том числе реактивов и хроматографических колонок. Так, например, нам удалось найти достойную замену колонкам для ВЭЖХ западных производителей – аналитические колонки производства компании Dikma Technologies Inc. (ООО «Лабконцепт» является эксклюзивным дистрибьютором продукции Dikma Technologies Inc. на территории РФ) (рисунок 5).

DiKMA®
A reliable partner for your lab



Рисунок 5. Колонки для жидкостной хроматографии Dikma Technologies Inc.

Figure 5. HPLC columns (Dikma Technologies Inc.)

Компания Dikma имеет более чем 15-летний опыт разработки и производства колонок для жидкостной хроматографии. Колонки прошли многочисленные испытания в нашей лаборатории: их отличает высокая эффективность и надежность, что полностью удовлетворяет требованиям современных аналитических методик.

Лабконцепт

ПРОДУМАННЫЕ РЕШЕНИЯ
для аналитической лаборатории



Компания Лабконцепт — официальный дистрибьютор зарубежных и российских производителей аналитического и общелабораторного оборудования, мебели и расходных материалов, а также производитель оборудования для пробоподготовки и высокоточной весоизмерительной техники

Manon

SILAB
Simply Intelligent

LICART
art of chromatography







- **Оснащение лабораторий аналитическим оборудованием, расходными материалами и мебелью.**
- **Быстрые сроки поставки.**
  Широкая номенклатура товаров на собственном складе в Санкт-Петербурге
- **Собственное производство высокоточных весов и оборудования для пробоподготовки (полный производственный цикл).**
  Сборочное производство хроматографического оборудования
- **Собственная аналитическая лаборатория.**
  Оснащенная современным оборудованием, позволяющая проводить полное предпродажное тестирование приборов, оперативно работать с клиентскими и разрабатывать собственные методики, а также организовывать практическое обучение любой сложности
- **Возможности по доработке и адаптации приборов.**
  В том числе приборов сторонних производителей под специализированные задачи заказчиков

8 (812) 327-37-00
lc@labconcept.ru
labconcept.ru

Санкт-Петербург, Москва, Казань, Нижний Новгород, Уфа

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-40-51
УДК 615.322:635.718:615.277.3:58.08(048.8)

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Противоопухолевая активность видов рода полынь (*Artemisia* L.): современное состояние и перспективы (обзор)

Ю. В. Романтеева✉, М. А. Березуцкий, М. Н. Курчатова

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

✉ **Контактное лицо:** Романтеева Юлия Викторовна. **E-mail:** yuliyarom81@mail.ru

ORCID: Ю. В. Романтеева – https://orcid.org/0000-0002-0048-9630; М. А. Березуцкий – https://orcid.org/0000-0003-0433-8247;
М. Н. Курчатова – https://orcid.org/0000-0003-4432-5555.

Статья поступила: 16.02.2022 **Статья принята в печать:** 09.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. В последнее время активно изучается противораковая активность представителей рода *Artemisia* L., и большая часть исследований посвящена *Artemisia annua* L., которая издревле применялась в традиционной медицине ряда стран как противомалярийное и противораковое средство. Сходство химического состава предопределяет изучение противораковой активности других видов рода *Artemisia* L. Информация об этом еще недостаточно полно представлена в научных публикациях, весьма разнородна и иногда даже противоречива. Актуальным является обзор современных исследований о противораковой активности видов рода *Artemisia* L., обобщение имеющихся данных и предоставление информации для будущих исследований.

Текст. В статье представлен обзор экспериментальных данных по исследованию противораковой активности представителей рода *Artemisia* L. Отмечается, что основной механизм такой активности – апоптоз. Апоптоз запускается за счет повышения активных форм кислорода (АФК) внутри раковых клеток, снижения мембранного потенциала митохондрий, активации проапоптотических и, наоборот, ингибирования антиапоптотических белков, а также за счет образования мембранных пузырьков, сжатия клеток и посредством активации каспаз.

Заключение. В представленном обзоре охвачено около 30 видов рода *Artemisia* L. При представленной степени изученности данного направления остается нерешенным ряд вопросов. Наиболее изучены в отношении цитотоксической активности *Artemisia absinthium* L. и *Artemisia vulgaris* L. В этом аспекте перспективно исследование других близкородственных видов рода *Artemisia* L. Также актуальным является изучение цитотоксичности представителей рода полынь на нормальные культуры клеток и в сравнении с положительным контролем. Кроме того, значимым остается детальное изучение пула вторичных метаболитов различных видов рода *Artemisia* L. с целью достоверного определения компонентов, отвечающих за проявление противоракового действия. Выраженная эффективность представителей рода *Artemisia* L. в отношении раковых клеток и одновременно слабое воздействие на здоровые клетки открывает перспективу их применения в качестве источников препаратов-партнеров, обладающих синергетическим эффектом, и как средств аугментации противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: *Artemisia*, противораковое действие, цитотоксическое действие, апоптоз, сесквитерпеновые лактоны, эфирное масло, фенольные соединения, флавоноиды

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

Вклад авторов. Ю. В. Романтеева осуществила концепцию, сбор литературных данных, написание, редактирование обзора. М. А. Березуцкий произвел обсуждение, редактирование статьи. М. Н. Курчатова осуществила сбор материала, написание и обсуждение статьи.

Для цитирования: Романтеева Ю. В., Березуцкий М. А., Курчатова М. Н. Противоопухолевая активность видов рода полынь (*Artemisia* L.): современное состояние и перспективы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):40–51. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-40-51

Antitumor Activity of Species of the Genus *Artemisia* L.: Current State and Prospects (Review)

Yuliya V. Romanteeva✉, Mikhail A. Berezutsky, Mariia N. Kurchatova

Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, 112, Bolshaya Kazachya str., Saratov, 410012, Russia

✉ **Corresponding author:** Yuliya V. Romanteeva. **E-mail:** yuliyarom81@mail.ru

ORCID: Yuliya V. Romanteeva – https://orcid.org/0000-0002-0048-9630; Mikhail A. Berezutsky – https://orcid.org/0000-0003-0433-8247;
Mariia N. Kurchatova – https://orcid.org/0000-0003-4432-5555.

Received: 16.02.2022 **Revised:** 09.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Recently, the anticancer activity of representatives of the genus *Artemisia* L. has been actively studied, and most studies are devoted to *Artemisia annua* L., which has been used since ancient times in the folk medicine of several countries as an antimalarial and anticancer agent. The similarity of the chemical composition predetermines the study of the anticancer activity of other species of the genus

© Романтеева Ю. В., Березуцкий М. А., Курчатова М. Н., 2023
© Romanteeva Yu. V., Berezutsky M. A., Kurchatova M. N., 2023

Artemisia L. The information about this is still not fully presented in scientific publications, is very diverse and sometimes even contradictory. Review of modern studies of anticancer activity of species of the genus *Artemisia* L., generalization of available data and providing information for future research is relevant.

Text. The article presents a review of experimental data on the study of anticancer activity of representatives of the genus *Artemisia* L. It is noted that the main mechanism of such activity is apoptosis. Apoptosis is triggered by the increase of reactive oxygen species (ROS) inside cancer cells, reduction of mitochondrial membrane potential, activation of pro-apoptotic and, on the contrary, inhibition of anti-apoptotic proteins, as well as by formation of membrane bubbles, cell compression and by activation caspase.

Conclusion. In the presented review, about 30 species of the genus *Artemisia* L. With the presented degree of study of this area, a number of questions remain unresolved. The most studied with respect to cytotoxic activity are *Artemisia absinthium* L. and *Artemisia vulgaris* L. In this aspect, the study of other closely related species of the genus *Artemisia* L. Also relevant is the study of cytotoxicity of representatives of the genus *Artemisia* L. on normal cell cultures and in comparison with positive control. In addition, a detailed study of the pool of secondary metabolites of different species of the genus *Artemisia* L. remains significant in order to reliably determine the components responsible for the manifestation of anticancer action. The pronounced effectiveness against cancer cells and, at the same time, a weak effect on healthy cells of the body of representatives of the genus *Artemisia* L. opens up the prospect of their use as sources of partner drugs with a synergistic effect and means of augmentation of antitumor therapy.

Keywords: *Artemisia* L., anticancer activity, cytotoxic effect, apoptosis, sesquiterpene lactones, essential oil, phenolic compounds, 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. Yuliya V. Romanteeva carried out the concept, collection of literature data, writing, editing the review. Mikhail A. Berezutsky discussed and edited the article. Mariia N. Kurchatova collected material, wrote and discussed the article.

For citation: Romanteeva Yu. V., Berezutsky M. A., Kurchatova M. N. Antitumor activity of species of the genus *Artemisia* L.: current state and prospects. *Drug development & registration*. 2023;12(1):40–51. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-40-51

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на растущее понимание механизмов канцерогенеза, по-прежнему существует острая потребность в новых и эффективных фармакологических стратегиях вмешательства в этот патологический процесс. Фармакологические агенты, вызывающие апоптоз, могут быть эффективными в отношении многих видов рака [1, 2]. Одним из распространенных и перспективных направлений в разработке новых химиотерапевтических средств является изучение растительных метаболитов. Среди терапевтических средств растительного происхождения известны винбластин, винкристин, этопозид, тенипозид, паклитаксел, доцетаксел, таксол и камптотецин [3, 4]. Биологическая активность вторичных природных метаболитов активно использовалась в народной медицине. Одним из растительных объектов, вызывающих интерес ученых, являются представители рода полынь (*Artemisia* L.), которые в последнее время стали активно и разнонаправленно изучаться. В результате таких исследований появляются публикации различного характера, в которых отражена информация о химическом составе, методах анализа, видах биологического действия видов рода полынь. Род *Artemisia* L. имеет долгую историю применения в народной, традиционной медицине и характеризуются достаточно широким ареалом распространения, разнообразным химическим составом и разноплановым спектром биологического действия. Виды, принадлежащие роду *Artemisia* L., применяются во всем мире. В мировой флоре насчитывается порядка 800 видов полыни [5, 6], некоторые из них популярны в традиционной медицине Китая и других азиатских стран для лечения различных заболеваний, таких как малярия, гепатит, рак, а также вирусных, бактериальных и грибковых инфекций [5].

Полынь горькая и другие растения рода *Artemisia* L. интересны для изучения, в частности, за счет содержания сесквитерпеновых лактонов [6, 7]. К настоящему времени из различных растительных источников выделено более 1200 лактонов различных типов. Из полыней разных видов выделены следующие лактоны – артемизинин, арглабин, артабсин, абсинтин, анабсин, анабсинтин, сиверсинин и др. [8–11].

Данный класс соединений активно изучается в настоящее время благодаря широкому спектру их биологического действия – противопаразитарного, противовоспалительного, противогрибкового, противовирусного, противомалярийного, противоракового [7, 9–12].

Интерес к этим соединениям возрос благодаря открытию артемизинина, доминирующего в траве *Artemisia annua* L., которую применяют в традиционной медицине Африки и Азии, как противомалярийное и противораковое средства [12, 13]. Артемизинин, выделенный из полыни однолетней, показал противоопухолевый эффект. Предположительный механизм действия этого соединения объясняется наличием в его структуре эндопероксидного «мостика», который может реагировать с железом с образованием цитотоксических свободных радикалов. Рако-

вые клетки содержат значительно больше внутриклеточного свободного железа, чем нормальные клетки, и было обнаружено, что артемизинин и его аналоги избирательно вызывают апоптоз во многих линиях раковых клеток. Кроме того, было установлено, что производные артемизинина обладают противовоспалительным, антиангиогенным, антиметастатическим действием и эффектом ингибирования роста. Эти свойства делают производные артемизинина привлекательным кандидатом в качестве химиотерапевтических препаратов для лечения рака [14]. Одним из актуальных направлений изучения растительных компонентов является определение их защитного действия против ксенобиотиков, что включает в себя изучение их противораковых свойств. В настоящее время уже имеются некоторые данные о вышеуказанной активности разных видов полыни.

Схожесть в химическом составе представителей рода *Artemisia L.* предопределяет изучение их противораковой активности. Информация об этом еще недостаточно полно представлена в научных публикациях, весьма разнородна и иногда даже противоречива. Вместе с тем сравнение, систематизация результатов экспериментов необходимы для направленного проведения последующих исследований и понимания механизмов антиканцерогенного действия видов рода *Artemisia L.* В данной статье представлены данные исследований противораковой активности различных видов рода полынь, кроме того, приведены их механизмы действия.

Цель работы – обзор последних исследований о противораковой активности видов рода *Artemisia* L., обобщение имеющихся данных и предоставление информации для будущих исследований. Сбор и анализ сведений проводился с использованием научных баз данных, таких как PubMed, Scopus, Web of Science, Science Direct, Google Scholar и др. доступных ресурсов за 2011–2021 гг.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ современных научных публикаций, в которых рассматриваются представители рода *Artemisia* L., позволяет сделать вывод, что в них рассмотрены около 30 видов.

Результаты испытаний на наличие антиканцерогенного действия были получены преимущественно при изучении эфирных масел, экстрактов, полученных из разных морфологических групп растительного сырья и с помощью различных технологических приемов разнополярными растворителями, и их компонентов. В экспериментах цитотоксичность тестируемых образцов определяли, в основном, с помощью метода MTT и его модификаций, реже применяли WST-1 метод, анализ SRB, измерение электрического импенданса, оценку активности LDG, Alamar Blue-тест. Апоптотический эффект оценивали с помощью проточной цитометрии, фазово-контрастной микроскопии после окраски специальными красителями (аннексин V, пропидия йодид, родамин 123), вестерн-блоттинга, анализа клеточного цикла, анализа каспазы-3, qRT-PCR, ELISA. В результате испытаний выявлены разнообразные механизмы апоптоза – увеличение АФК внутри клетки, митохондриальный путь, повышение экспрессии проапоптотических белков, и, наоборот, снижение ее для антиапоптотических, конденсация хроматина и образование цитоплазматических пузырьков, активация сигнального пути TGF-β, регуляция пути PI3K/AKT, повышение чувствительности клеток рака к апоптозиндуцирующему лиганду. В ряде публикаций приводится информация о том, за счет каких вторичных метаболитов проявляют антиканцерогенную активность представители рода *Artemisia* L. В большинстве случаев в этом аспекте приводят различные группы фенольных соединений, в частности, флавоноиды, оксикоричные кислоты, сесквитерпеновые лактоны, реже – представители класса терпенов, входящие в состав эфирных масел.

ОБЗОР ВИДОВ РОДА *ARTEMISIA* L.

Artemisia absinthium L.

Метанольный экстракт *A. absinthium* был протестирован в отношении его воздействия на культуры раковых клеток толстой кишки (DLD-1) и эндометрия (ECC-1), а также эмбриональных клеток почек человека (HEK-293), которые явились контрольной группой [15]. В результате исследования выявлена его цитотоксическая активность в отношении клеточных линий рака, в то время как на контрольную группу экстракт практически не оказал влияния. Установлено, что растительный экстракт оказал более высокий цитотоксический эффект на раковые клетки толстой кишки DLD-1 в низкой концентрации (3,92 мг/мл) сопоставимый с препаратом сравнения фторурацилом. В высокой концентрации (652,7 мг/мл) было отмечено воздействие на нормальные клетки (эмбриональные клетки почек), т. е. имеет место так называемое, терапевтическое (фармацевтическое) окно. Авторы отмечают, что увеличение внутриклеточного количества свободных радикалов в раковых клетках происходит за счет возникновения окислительного стресса в клетках, что, впоследствии, приводит к повреждению ДНК, которое индуцирует апоптоз раковых клеток. Такой эффект связывают с содержанием хлорогеновой кислоты в растительном экстракте, относящейся к группе фенольных соединений, которые, как известно, обладают высокой антиоксидантной активностью, что имеет важное значение в лечении рака [15]. Таким образом, экстракт может применяться в низких концентрациях, не повреждая нормальные клетки организма, одновременно эффективно запуская гибель раковых клеток.

В другом исследовании водный экстракт из листьев *A. absinthium* индуцировал апоптоз клеток хронического лимфоцитарного лейкоза B, выделенных у больных лейкемией [16]. Многими работами под-

тверждено губительное действие экстрактов *A. absinthium* на клетки рака молочной железы [17–22]. Эффективность растительные экстракты показали в различных концентрациях: 20–25 мкг/мл [20], 80,96 мкг/мл [22], 270 мкг/мл [17], 221 мкг/мл [18], 491,19 мкг/мкл [19], 4 мг/мл [21], что обусловлено как технологией изготовления этих извлечений, так и их химическим составом. Антиканцерогенная активность растительного этанольного экстракта *A. absinthium* связана с антипролиферативным действием на раковые клетки и запуском апоптоза посредством модуляции белков [21]. Выявлено также, что цитотоксическое действие метанольных экстрактов полыни в отношении клеточной линии рака молочной железы MCF-7 связано с содержанием артемизинина [23]. Причем, выраженность воздействия прямо пропорциональна высоте произрастания растения над уровнем моря, т. к. данный фактор влияет на накопление этого лактона в полыни [18].

В другом исследовании этанольный экстракт *A. absinthium* проявил цитотоксическую активность в отношении клеток линии Huh7 (рак печени), не оказав влияния на клеточную линию Vero, взятых в эксперимент в качестве контроля [24]. Установлено, метанольный экстракт *A. absinthium* подавлял жизнеспособность клеток линии колоректального рака человека (HCT-116) и индуцировал апоптоз в клетках HCT-116, активируя митохондриальный путь [25].

Кроме антиканцерогенной активности для метанольных экстрактов *A. absinthium* было выявлено и генопротекторное действие с помощью метода защиты ДНК плазмиды pBR322 после обработки H_2O_2. Данный эффект обусловлен соединениями фенольной природы, содержащихся в извлечении, которые, как известно, являются природными антиоксидантами и связывают свободные радикалы [26]. ДНК-защитный потенциал экстрактов можно использовать с целью синергии противоопухолевой терапии.

Цитотоксическое действие в отношении различных видов рака было выявлено для эфирного масла (ЭМ) *A. absinthium* [27]. Наиболее чувствительными линиями клеток для тестируемых фракций эфирного масла оказались SK-MEL-5 (меланома), HCT-116 (колоректальная аденокарцинома), A549 и NCI-H292 (аденокарцинома и плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого), менее чувствительной – MCF-7 (аденокарцинома молочной железы). Также замечено, что фракции эфирного масла практически не оказали воздействия на неопухолевые клетки HS5, что свидетельствует об их избирательной цитотоксической активности. Таким образом, экстракт *A. absinthium* по сравнению с эфирным маслом этого вида более эффективен в отношении опухоли молочной железы.

Artemisia vulgaris L.

В недавних исследованиях, проведенных на различных моделях рака [28], водные экстракты *A. vulgaris* продемонстрировали свою высокую противоопухолевую активность. Выявлено, что метанольный экстракт листьев *A. vulgaris* существенно снижал жизнеспособность клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) за счет активации апоптоза. Данный процесс обусловлен аутофагической гибелью, к которой привели конденсация хроматина и образование цитоплазматических пузырьков [29]. Известно также, что различные виды экстрактов *A. vulgaris* индуцировали апоптоз в клеточных линиях рака простаты, молочной железы, толстой кишки [23, 28, 30, 31], что обусловлено рядом факторов: индукции аутофагии, возрастания концентрации внутриклеточных АФК в совокупности с понижением потенциала митохондриальных мембран [30], кроме того, повышалась чувствительность клеток рака к TRAIL, лиганду, индуцирующему апоптоз [31].

Метанольный экстракт *A. vulgaris* был протестирован с целью определения его цитотоксического воздействия на линии раковых клеток человека: аденокарциномы молочной железы (MCF-7), немелкоклеточного рака легкого (A549), рака шейки матки (HeLa), нормальных гладкомышечных клеток сосудов (A7R5) и клеток почки эмбриона человека (293T) [17]. Экстракт *A. vulgaris* проявил ингибирующую активность в различных концентрациях в отношении всех клеточных линий рака, взятых в эксперимент, кроме A549, наряду с минимальным воздействием на клетки линии 293T. Таким образом, экстракты *A. vulgaris* и *A. absinthium* могут быть эффективны при применении против опухоли молочной железы, что требует дальнейшего изучения на доклиническом и клиническом уровнях.

Также было оценено воздействие этанольного экстракта *A. vulgaris* в отношении клеточных линий лейкоза человека [32]. В результате эксперимента было выявлено, что испытуемый образец подавил рост всех клеточных линий лейкоза человека. Данная активность обусловлена сжатием клеток и образованием мембранных пузырьков, вызванных воздействием растительных экстрактов, что в совокупности и индуцировало апоптоз.

Изучено влияние метанольных экстрактов *A. vulgaris* и *A. alba* на клетки периферической крови с помощью микроядерного теста, на культуры клеток рака прямой кишки (SW-480) и стволовых клетках периодонтальной связки человека (PDLSC) [33]. Все концентрации экстрактов (*A. vulgaris* или *A. alba*) снижали частоту увеличения микроядер в лимфоцитах периферической крови, и дозозависимо снижали повреждение хромосом, вызванные воздействием митомицина С по сравнению с клетками положительного контроля. Кроме того, экстракт *A. vulgaris* проявил цитотоксическую активность в отношении культуры клеток рака прямой кишки (SW-480) при совместной обработке с мутагеном митомицином С после длительного воздействия за счет некроза. Экстракт *A. alba* индуцировал в клетках SW-480 апоптоз. Такая активность исследуемых экстрактов в отношении кле-

ток рака опосредована флавоноидами и гидроксикоричными кислотами, присутствующими в растениях. Оба образца не оказывали значительного влияния на жизнеспособность стволовых клеток периодонтальной связки человека [33].

Впервые установлено, что низкие дозы ЭМ *A. vulgaris* индуцируют апоптоз в различных линиях раковых клеток человека (HL-60, K562, MCF-7, HepG2, PC-3 и HeLa), но не обладают значительной цитотоксичностью в отношении нормальных клеток млекопитающих, таких как фибробласты кожи человека BJ, эмбриональных клетки почек HEK-293 и клетки легких китайского хомячка V79-4. Отмечено, что апоптотический эффект эфирного масла в клетках HL-60 проявляется через митохондрии и механизмы, зависящие от каспаз [34].

Artemisia abrotanum L.

Противоопухолевую активность эфирного масла, полученного из травы *A. abrotanum*, тестировали на клеточной линии рабдомиосаркомы (RD). Результаты исследования доказывают, что эфирное масло *A. abrotanum* оказывает противоопухолевое действие сопоставимое с метотрексатом, благодаря наличию таких соединений, как: борнеол, цимол, камфора, терпинеол, 1,8-цинеол и аромадендрен [35]. В другой работе были протестированы метанольные экстракты листьев *A. abrotanum* на следующих клеточных линиях: лимфобластоподобные Т-клетки (Jurkat), аденокарцинома груди (MCF-7), аденокарцинома шейки матки (HeLa), аденокарцинома толстой кишки (HT-29) и клетки нормальной эмбриональной почки человека (HEK-293) [36]. Отмечено, что экстракт *A. abrotanum* обладает антипролиферативной и цитотоксической активностью в отношении всех раковых клеток, взятых в эксперимент, не оказывая влияния на нормальные клетки HEK-293. Выявленные эффекты опосредованы присутствием флавоноидов и гидроксикоричных кислот в растительном экстракте [36].

Artemisia campestris L.

В исследовании влияния на клеточные линии эстроген-зависимой аденокарциномы молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака шейки матки наименьшую цитотоксическую активность в сравнении с *A. arborescens, A. absinthium, A. vulgaris, A. scoparia*, *A. santonicum* проявил экстракт *A. campestris* [17]. Выявлена цитотоксическая активность против клеток рака толстой кишки (HT-29) у эфирного масла и различных экстрактов *A. campestris*. Данное действие эфирного масла обусловлено за счет высокого содержания α-пинена, β-пинена и лимонена, у экстрактов – за счет веществ фенольной природы [37]. Также было замечено, что эфирное масло *A. campestris* проявило выраженный антипролиферативный эффект в отношении клеточных линий MCF-7 и RKO по сравнению с известным химиотерапевтическим средством доксорубицином. Такая активность эфирного масла связана с повышенной экспрессией p21 и индукцией апоптоза. Кроме того, эфирное масло имело сниженный цитотоксический эффект на HEK-293 T по сравнению с наблюдаемым эффектом в линиях раковых клеток, что указывает на потенциальное терапевтическое окно между обработанными ЭМ раковыми и нормальными клетками [38].

Artemisia capillaris Thunb.

Цитотоксичность этанольного экстракта листьев *A. capillaris* была проверена в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы (Huh7 и HepG2). Выявлено, что экстракт подавлял рост опухоли в модели *ex vivo*, а также в ксенотрансплантате мыши *in vivo*, ингибируя пролиферацию опухолевых клеток и индуцируя апоптоз за счет регуляции пути PI3K/AKT [39].

Интерлейкин-6 (IL-6)/преобразователь сигнала и активатор сигнального пути транскрипции 3 (STAT3) играет решающую роль в развитии и прогрессировании гепатоцеллюлярной карциномы (HCC). Экстракт *A. capillaris* значительно подавлял рост и образование колоний клеток HCC. Кроме того, он ингибировал активацию STAT3 с помощью IL-6 и значительно подавлял миграцию клеток. В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что спиртовой экстракт *A. capillaris* способен оказывать различные противоопухолевые эффекты в отношении HCC посредством модуляции пути IL-6/STAT3. Но еще предстоит идентифицировать компоненты, ответственные за ингибирование STAT3, и раскрыть основной молекулярный механизм [40]. В другом эксперименте с той же клеточной линией рака выявлено, что этилацетатная фракция *A. capillaris* значительно ингибировала рост опухоли в модели ксенотрансплантата мышей HCC за счет подавления сигнального пути PI3K/AKT [41].

В обзоре 2017 г., посвященном биологической активности эфирных масел, отмечено, что эфирное масло *A. capillaris* проявило цитотоксическое действие и индуцировало апоптоз в клетках эпидермоидной карциномы ротовой полости человека (KB). Данный эффект прямо пропорционален времени экспозиции. Предполагается, что механизм гибели клеток связан с 38/ядерным фактором каппаβ (NF-κβ) и JNK/Bcl-2-опосредованными путями, активацией каспазы [42].

Artemisia herba-alba Asso

Метанольные экстракты *Artemisia herba-alba* были протестированы в отношении нескольких клеточных линий: карциномы мочевого пузыря человека RT-112 [43], карциномы гортани человека Hep2 [43, 44], миелогенной лейкемии человека K562 [43], гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2), рака легкого (A549) [44]. В качестве контроля использова-

лись мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) [43], нормальные клетки печени (THLE2) и нормальные клетки легких [44]. Замечено, что экстракты *A. herba-laba* проявили сильное цитотоксическое и антипролиферативное действия на раковые клетки человека, взятые в эксперимент. Напротив, нормальные клетки печени (THLE2), а также нормальные клетки легких показали очень низкую чувствительность к тестируемым экстрактам. Выявлена корреляционная зависимость между противоопухолевой активностью на клетки Hep2, RT-112 и K562 и содержанием дубильных веществ на клетках, тогда как содержание флавоноидов коррелирует только с противоопухолевой активностью в отношении клеток линии K562 [43]. Апоптотический эффект испытуемых образцов в отношении клеток HepG2 обусловлен активацией p53 и Bax и снижением уровня экспрессии Bcl-2. Тем не менее, цитотоксического эффекта при воздействии растительных экстрактов на нормальные клеточные линии не зарегистрировано [44]. В другой работе [45] был отмечен цитотоксический дозозависимый эффект ЭМ *A. herba-alba* на линию раковых клеток CEM.

Artemisia nilagirica (C.B.Clarke) Pamp.

В работе [46] было изучено влияние этанольных экстрактов *A. nilagirica* на различные клеточные культуры рака: толстой кишки (DLD-1), легких (A-549), молочной железы (MCF-7) и нормальные клетки VERO, выбранные в качестве контроля. В ходе эксперимента наблюдали сильную цитотоксичность в отношении тестируемых культур рака сопоставимую с доксорубицином, наряду с умеренным воздействием на нормальные клетки. Причем, наиболее выраженные цитотоксические эффекты установлены в отношении DLD-1, что указывает на селективность испытуемых экстрактов *A. nilagirica* [46]. В другом исследовании [47] в качестве модельной системы была выбрана клеточная культура (MDA-MB-231), поскольку метастазирование является основной причиной смертности при раке молочной железы, а в качестве контроля использовали необработанные растительным экстрактом клетки MDA-MB-231. В результате эксперимента идентифицировали активацию сигнального пути (TGF-β), который как известно, активирует путь апоптоза на ранних стадиях роста опухоли.

Artemisia princeps Pampanini cv. Sajabal

В эксперименте протестирован этанольный экстракт травы *A. princeps* Pamp. в отношении клеток рака толстой кишки [48]. Выявлено, что испытуемый образец способствует апоптозу посредством ослабления продукции провоспалительных цитокинов за счет инактивации транскрипционного фактора NF-κB, и снижения патологической инфильтрации иммунных клеток. В результате останавливается повреждение ткани толстой кишки, вызванное воспалением, и, как следствие, подавляется канцерогенез. Исследуемый экстракт ингибирует экспрессию антиапоптотического белка посредством инактивации NF-κB в раковых клетках толстой кишки через каспазозависимый механизм [48]. В исследовании [49] было оценено воздействие активной флавоноидсодержащей фракции *A. princeps* на культуру клеток рака шейки матки. Выявлено, что данная фракция индуцирует апоптоз клеток HeLa, и ингибирует рост опухоли *in vivo* у мышей с ксенотрансплантатом за счет митохондриальной гибели опосредованной каспазой. Такие эффекты связаны с содержанием флавоноидов, сесквитерпеновых лактонов в исследуемых растительных экстрактах.

Метанольный экстракт *A. princeps* оказал антипролиферативный эффект за счет остановки клеточного цикла и подавления роста клеток гепатоциллюлярной карциномы. Кроме того, апоптотическое действие испытуемого образца обусловлено снижением экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и повышением концентрации проапоптотического белка Bax [50].

Artemisia turanica Krasch.

В исследовании определены цитотоксические эффекты различных экстрактов *A. turanica* на две линии лейкозных раковых клеток человека (K562 и HL-60) и на нормальные клетки J774 [51]. Экстракты *A. turanica* оказали наиболее выраженное антипролиферативное действие на раковые клетки, в то время как нормальные клетки не были подвержены их воздействию [51]. Цитотоксическая активность масла *A. turanica* была проверена на лимфоцитах и клетках HeLa [52]. Масло инактивировало клетки HeLa, не оказав существенного влияния на лимфоциты.

Мало изученные виды рода Artemisia L.

Gordanian с соавторами [23] изучал влияние метанольных экстрактов *Artemisia incana* (L.) Druce, *Artemisia spicigera* C. Koch и *Artemisia fragrans* Willd. на клетки линии рака молочной железы (MCF7). Установлена цитотоксическая активность экстракта листьев A. *incana* в отличие от экстрактов *A. spicigera* и *A. fragrans*, которые не только не оказали цитотоксический эффект, но и способствовали увеличению количества раковых клеток.

Ряд работ посвящен изучению воздействия метанольных экстрактов *Artemisia arborescens* L., *Artemisia scoparia* Waldst. & Kit., *Artemisia santonicum* L. на различные линии раковых клеток человека [17]. Среди исследуемых образцов экстракт *A. scoparia* оказал сильное влияние на клетки лейкемии человека (THP1) [53], рака молочной железы (MCF7) и шейки матки (HeLa), наряду с умеренным воздействием на клетки рака легкого (A549) и нормальные клетки человека [17]. Такая активность экстракта обусловлена фенольными соединениями и сесквитерпеновыми лактонами [53]. Экстракты *A. santonicum* и *A. arbo-*

rescens не проявили активности в отношении A549, но оказали слабое воздействие на другие клеточные линии [17]. Кроме того, метанольный экстракт *A. scoparia* оказал генопротекторное действие после воздействия четыреххлористого углерода (CCl_4), провоцирующего повреждения ДНК. Введение крысам экстракта в дозе 300 мг/кг значительно уменьшило повреждения ДНК [54].

В другом исследовании [55] оценивали антипролиферативную активность на клеточные линии рака молочной железы человека T47D и HS578T, после обработки метанольными экстрактами некоторых видов полыни (*Artemisia stolonifera* (Maxim.) Kom., *Artemisia selengensis* Turcz. ex Besser, *Artemisia japonica* Thunb., *Artemisia Montana* (Nakai) Pamp., *Artemisia sylvatica* Maxim., *Artemisia keiskeana* Miq., *A. capillaris* и *A. scoparia*). Выявлено, что все экстракты показали одинаковую антипролиферативную активность в зависимости от дозы и времени в клетках HS578T. Хотя экстракты в более низких концентрациях и за более короткое время стимулировали рост клеток T47D, антипролиферативное же действие экстрактов на клетки T47D при более высоких концентрациях (>100 мг/мл) было значительно выше, чем у клеток HS578T [55]. В другой работе было изучено воздействие экстрактов этих же видов полыней [56], но уже в отношении другой клеточной культуры рака – MCF-7. Наблюдался двухфазный эффект: экстракты ингибировали пролиферацию при высоких концентрациях и стимулировали ее при низких. Тем не менее, все испытуемые экстракты индуцировали апоптоз при высокой концентрации (200 мкг/мл).

Выявлена цитотоксическая активность эфирных масел *Artemisia lavandulifolia* DC., *Artemisia aucheri* Boiss. и *Artemisia ciniformis* Krasch. & Popov ex Poljakov в отношении клеточной линии рака матки (HeLa) [57–59], при минимальном влиянии на лимфоциты человека [58, 59]. Отмечено, что ЭМ листьев *A. lavandulifolia* приводит к гибели раковые клетки путем апоптоза, опосредованным каспазой-3-PARP [57]. Экстракт *A. aucheri* показал цитотоксическое действие на клетки нейробластомы (SKNMC) за счет апоптоза, вызванного нарушением митохондриального мембранного потенциала, активации каспаз и увеличения проапоптотических генов [60]. Различные экстракты *A. ciniformis* показали высокие антипролиферативные эффекты на клеточные линии HL-60 и K562. Данный эффект опосредован повреждением ДНК и увеличением количества проапоптотического белка Bax. Отмечено также, что экстракты не оказали влияния на макрофаги (J774) [61]. На такие же миелоидные клеточные линии (HL-60 и K562) действовали различными экстрактами другого вида – *Artemisia armeniaca* Lam., с целью исследования их цитотоксического и апоптотического действий. В качестве контроля использовали клетки J774 [62]. Результаты подтверждают цитотоксические и апоптотические эффекты испытуемых образцов на линии раковых клеток K562 и HL-60, без воздействия на клетк J774.

Изучено влияние различных экстрактов *Artemisia dracunculus* L. в отношении лимфобластомы L5178Y *in vivo* на лабораторных животных и *in vitro* [63]. Испытуемые экстракты полыни эстрагон подавляли рост опухолевых клеток, что обусловлено содержанием в них полифенольных соединений и алкамидов. В другой работе [64] изучена противоопухолевая эффективность этанольного экстракта *A. dracunculus*, а также соединений, выделенных из него, на культивируемые клетки плоскоклеточного рака пищевода EC-109 (ESCC). Выявлена апоптотическая активность экстракта за счет повреждения ДНК и снижения мембранного потенциала митохондрий в клетках EC-109 [64]. Аналогичный механизм апоптоза выявлен и для этилацетатного экстракта другого вида полыни – *Artemisia indica* Willd. в эксперименте с клеточными линиями MCF-7, BHY, MiaPaCa-2, Colo-205 и A-549 [65]. В результате исследования выявлено сильное ингибирующее действие у тестируемого экстракта в отношении взятых в эксперимент линий раковых клеток [65]. В данном исследовании [66] оценивали цитотоксическую и апоптотическую активности этанольных экстрактов *Artemisia kopetdaghensis* Krasch. & Poljakov на клеточную линию ПКР (ACHN). Жизнеспособность клеток снижалась под действием всех растительных экстрактов в клетках ACHN по сравнению с контролем. Результаты показали, что тестируемые экстракты ингибируют рост клеток ACHN в зависимости от концентрации и времени. Кроме того, в качестве возможного механизма действия предлагается апоптоз [66]. В недавней работе [67] было изучено воздействие спиртового экстракта *Artemisia macrocephala* Jacq. на клеточную культуру гепатомы человека HepG2. Испытуемый образец продемонстрировал сильное антипролиферативное действие в отношении линии клеток рака печени человека HepG2 [67]. У этанольного экстракта *Artemisia quettensis* Podlech. было отмечено цитотоксическое действие на клеточную линию HT29 [68].

Изучена цитотоксическая активность спиртового экстракта *Artemisia marschalliana* Sprengel. в отношении карциномы желудка человека (AGS) и линий клеток фибробластов мышей L929, взятых в качестве контроля [69]. Губительное действие испытуемый экстракт оказал на культуру клеток AGS в концентрации 60 мг/мл, практически не оказав влияния на нормальные клетки [69]. В другом исследовании было выявлено цитотоксическое действие эфирного масла *A. marschalliana* на клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7). Такой эффект ученые связывают с синергетическим действием терпеноидов, входящих в состав эфирного масла *A. marschalliana* [70].

В следующей работе [71] было изучено влияние этанольного экстракта *Artemisia monosperma* Delile в отношении различных клеточных культур рака (LNCaP,

Colo-205, HEC-1A, OVCAR-3, HepG2, MCF-7, 293, Karpas 299, A549, SU-DHL-1, YC, OSTRA, HUT-102, T24P). В качестве контроля использовались нормальные лимфобластные клетки человека. Установлено, что экстракт *A. monosperma* проявил способность, зависимую от дозы и времени, уничтожать различные гематологические и солидные опухолевые клеточные линии человека. Данная активность опосредована апоптозом, индуцированным растительным экстрактом. Лизинговая активность экстракта специфична по отношению к опухолевым клеткам, так как растительные экстракты не оказали воздействия на первичные культуры здоровых клеток человека [71].

Для оценки цитотоксического потенциала различных экстрактов *Artemisia rupestris* L. *in vitro* использовались линии клеток лимфоцитарного лейкоза мышей (L1210) и моноцитарного лейкоза человека (THP-1) [72]. У экстрактов *A. rupestris* было выявлено цитотоксическое действие на клеточную линию THP-1 наряду с минимальным воздействием на клетки L1210. Данный результат обусловлен различной чувствительностью взятых в эксперимент линий клеток лейкоза к одному или нескольким биологически активным соединениям тестируемых экстрактов.

В недавнем исследовании [73] была проведена оценка этанольного экстракта *Artemisia santolinifolia* Turcz. ex Besser на его способность к химиосенсибилизации в сочетании с противоопухолевым препаратом доцетакселом (DTX) против немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). Установлено, что экстракт *A. santolinifolia* синергетически усиливал цитотоксический эффект DTX, индуцируя апоптоз в клетках H23 через каспазозависимый путь, тогда как в клетках A549 избирательно увеличивал популяцию некротических клеток после снижения уровня GPX4 и активации АФК. Способность экстракта *A. santolinifolia* к химиосенсибилизации в сочетании с DTX тесно связана с синергическим ингибированием сигнальной молекулы онкогенеза STAT3 в обеих клеточных линиях и одновременным подавлением белка сурвивина, который является ингибитором апоптоза. Выявлено, что экстракт *A. santolinifolia* может усиливать апоптоз раковых клеток, индуцированный DTX, подавляя экспрессию антиапоптотических белков, и запуская различные пути гибели раковых клеток.

В данном исследовании [74] были протестированы различные клеточные культуры рака человека: HT-29 (рак толстой кишки), BGC-823 (рак желудка) и HepG-2 (гепатоцеллюлярный рак) после обработки водными экстрактами *Artemisia selengensis* Turcz. Экстракты проявили противораковую активность в отношении HT-29, BGC823 и противоопухолевую активность в отношении HepG-2. Кроме того, испытуемые образцы в наибольшей степени ингибировали клетки карциномы толстой кишки HT-29. Такую активность ученые связывают с полисахаридами, содержащимися в испытуемых экстрактах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре представлена информация об исследованиях противораковой активности видов рода *Artemisia* L. Растения рода *Artemisia* L. способны оказывать цитостатическое и цитотоксическое действие на различные линии раковых клеток. Наиболее часто использовались в исследованиях линии MCF-7, HeLa, HepG-2 и HL. При этом большая часть испытуемых видов полыней показали свою эффективность именно в отношении клеток линии рака молочной железы MCF-7. Несмотря на представленную степень изученности данного направления, остается нерешенным ряд вопросов. Наиболее исследованы в отношении цитотоксической активности *A. absinthium* и *A. vulgaris,* поэтому в этом аспекте перспективно изучение и других близкородственных видов рода *Artemisia* L. Кроме того, перспективным направлением является изучение влияния на нормальные культуры клеток и в сравнении с положительным контролем. Недостаточно еще изучена информация об активных компонентах исследуемых представителей рода полынь, отвечающих за противоопухолевый эффект. В связи с этим, актуальным остается детальное изучение пула вторичных метаболитов различных видов рода *Artemisia* L. с целью достоверного определения компонентов, отвечающих за проявление противоракового действия. Кроме того, необходимы доклинические исследования *in vivo* и клинические испытания для подтверждения выявленной в экспериментах противоопухолевой активности различных экстрактов, эфирных масел полыней. К тому же, актуальными будут исследования в рамках разработки, стандартизации эффективных лекарственных препаратов на основе видов рода *Artemisia* L.

Выраженная специфическая цитотоксичность в отношении раковых клеток и одновременно слабое повреждающее воздействие видов рода *Artemisia* L. на здоровые клетки организма открывают перспективу их применения в качестве потенциальных препаратов-партнеров, обладающих синергетическим эффектом, как средств аугментации противоопухолевой терапии, с целью оптимизации их воздействия, а также нивелирования их токсического влияния на нормальные клетки организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pfeffer C. M., Singh A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):448. DOI: 10.3390/IJMS19020448.
2. An W., Lai H., Zhang Y., Liu M., Lin X., Cao S. Apoptotic Pathway as the Therapeutic Target for Anticancer Traditional Chinese Medicines. *Front Pharmacol.* 2019;10:758. DOI: 10.3389/fphar.2019.00758.
3. Rajandeep K., Karan K., Harpreet K. Plants as a source of anticancer agents. *J Nat Pro. Plant.* 2011;1(1):119–124.
4. Стуков А. Н., Бланк М. А., Семиглазова Т. Ю., Беляев А. М., ред. Фармакотерапия опухолей. Посвящается памяти Михаила Лазаревича Гершановича. СПб: Вопросы онкологии; 2017. 512 с.
5. Bora K. S., Sharma A. The genus Artemisia: a comprehensive review. *Pharm. Biol.* 2011;49(1):101–109. DOI: 10.3109/13880209.2010.497815.

6. Буданцев А. Л., ред. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Семейство *Asteraceae* (*Compositae*). Роды Achillea–Doronicum. СПб, М.: Товарищество научных изданий КМК; 2012. Т. 5. Ч. 1. 320 с.
7. Ivanescu B., Miron A., Corciova A. Sesquiterpene Lactones from Artemisia Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *J Anal Methods Chem*. 2015;2015:247685. DOI: 10.1155/2015/247685.
8. Рандалова Т. Э. Сесквитерпеновые лактоны растений рода *Artemisia* L. *Вестник Бурятского государственного университета. Медицина и фармация.* 2019;64(4):3–9. DOI: 10.18101/2306-1995-2019-4-3-9.
9. Bailén M., Julio L. F., Diaz C. E., Sanz J., Martínez-Díaz R. A., Cabrera R., Burillo J., Gonzalez-Coloma A. Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions. *Ind Crop Prod.* 2013;49:102–107. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.04.055.
10. Haider S. Z., Andola H. C., Mohan M. Constituents of *Artemisia gmelinii* Weber ex Stechm. from Uttarakhand Himalaya: A Source of Artemisia Ketone. *Indian J Pharm Sci.* 2012;74(3):265–267. DOI: 10.4103/0250-474X.106074.
11. Wang X., Zhao X., Bin Y., Dong H., Liu D., Huang L. Combination of ultrasonic–assisted extraction with RRLC–QQQ method for the determination of artemisinin in the Chinese herb *Artemisia annua* L. *Phytochem Anal.* 2011;22(3):280–284. DOI: 10.1002/pca.1277.
12. Suberu J. O., Romero-Canelón I., Sullivan N., Lapkin A. A., Barker G. C. Comparative cytotoxicity of artemisinin and cisplatin and their interactions with chlorogenic acids in MCF7 breast cancer cells. *Chem Med Chem*. 2014;9(12):2791–2797. DOI: 10.1002/cmdc.201402285.
13. Feng X., Cao S., Qiu F., Zhang B. Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. *Pharmacol Ther.* 2020;216:107650. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107650.
14. Lai H. C., Singh N. P., Sasaki T. Development of artemisinin compounds for cancer treatment. *Invest New Drugs*. 2013;31(1):230–246. DOI: 10.1007/s10637-012-9873-z.
15. Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2018;64(3):25–34. DOI: 10.14715/cmb/2018.64.3.5.
16. Mirkin V., Berrebi A., Rakhman I., Haran M., Shvidel L. The role of the plant artemisia in survival and induction of apoptosis of b cells in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Harefuah*. 2017;156(2):86–88.
17. Erel B., Aydin F., Ballar P. In vitro cytotoxic properties of six *Artemisia* L. species. *Turk J Pharm Sci*. 2011;8(3):247–252.
18. Gordanian B., Behbahani M., Carapetian J., Fazilati M. I. Cytotoxic effect of *Artemisia absinthium* L. grown at two different altitudes on human breast cancer cell line MCF7. *Research in Medicine*. 2012;36(3):124–131.
19. Mughees M., Samim M., Ahmad S., Wajid S. Comparative analysis of the cytotoxic activity of extracts from different parts of *A. absinthium* L. on breast cancer cell lines and correlation with active compounds concentration. *Plant Biosyst.* 2018;153(4):569–579. DOI: 10.1080/11263504.2018.1527792.
20. Shafi G., Hasan T. N., Syed N. A., Al-Hazzani A. A., Alshatwi A. A., Jyothi A., Munshi A. *Artemisia absinthium* (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2012;39(7):7373–7379. DOI: 10.1007/s11033-012-1569-0.
21. Uğur D., Güneş H., Güneş F., Mammadov R. Cytotoxic activities of certain medicinal plants on different cancer cell lines. *Turkish J Pharm Sci*. 2017;14:222–230. DOI: 10.4274/tjps.80299.
22. Sultan M. H., Zuwaiel A. A., Moni S. S., Alshahrani S., Alqahtani S. S., Madkhali O., Elmobark M. E. Bioactive Principles and Potentiality of Hot Methanolic Extract ofthe Leaves from *Artemisia absinthium* L. "in vitro" Cytotoxicity Against Human MCF-7 Breast Cancer Cells, Antibacterial Study and Wound Healing Activity". *Curr Pharm Biotechnol.* 2020;21(15):1711–1721. DOI: 10.2174/1389201021666200928150519.
23. Gordanian B., Behbahani M., Carapetian J., Fazilati M. In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five Artemisia species. *Res Pharm Sci*. 2014;9(2):91–96.
24. Ali M., Iqbal R., Safdar M., Murtaza S., Mustafa G., Sajjad M., Bukhari S. A., Huma T. Antioxidant and antibacterial activities of Artemisia absinthium and Citrus paradisi extracts repress viability of aggressive liver cancer cell line. *Mol Biol Rep.* 2022;49(4):3367–3367. DOI: 10.1007/s11033-021-07103-4.
25. Nazeri M., Mirzaie-Asl A., Saidijam M., Moradi M. Methanolic extract of Artemisia absinthium prompts apoptosis, enhancing expression of Bax/Bcl-2 ratio,cell cycle arrest, caspase-3 activation and mitochondrial membrane potential destruction in human colorectal cancer HCT-116 cells. *Mol Biol Rep.* 2020;47(11):8831–8840. DOI: 10.1007/s11033-020-05933-2.
26. Ali A., Rahman K., Jahan N., Jamil A., Rashid A., Shah S. M. A. Protection of DNA during oxidative stress and cytotoxic potential of Artemisia absinthium. *Pak J Pharm Sci.* 2016;29(1 Suppl):295–299.
27. Martínez-Díaz R. A., Ibáñez-Escribano A., Burillo J., de las Heras L., del Prado G., Agulló-Ortuño M. T., Julio L. F., González-Coloma A. Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(5):693–699. DOI: 10.1590/0074-02760140129.
28. Nawab A., Yunus M., Mahdi A. A. Gupta S. Evaluation of anticancer properties of medicinal plants from the indian sub-continent. *Mol Cell Pharmacol.* 2011;3(1):21–29. DOI: 10.4255/mcpharmacol.11.04.
29. Sharmila K., Padma P. R. Anticancer activity of Artemisia vulgaris on hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Int J Pharm Pharmaceut Sci.* 2013;5(3):479–483.
30. Lian G., Li F., Yin Y., Chen L., Yang J. Herbal extract of *Artemisia vulgaris* (mugwort) induces antitumor effects in HCT-15 human colon cancer cells via autophagy induction, cell migration suppression and loss of mitochondrial membrane potential. *J BUON.* 2018;23(1):73–78.
31. Abdelhamed S., Yokoyama S., Hafiyani L., Kalauni S. K., Hayakawa Y., Awale S., Saiki I. Identification of plant extracts sensitizing breast cancer cells to TRAIL. *Oncol Rep.* 2013;29(5):1991–1998. DOI: 10.3892/or.2013.2293.
32. Ly B. T. K., Ly D. M., Linh P. H., Son H. K., Ha N. L., Chi H. T. Screening of medicinal herbs for cytotoxic activity to leukemia cells. *J BUON.* 2020;25(4):1989–1996.
33. Jakovljević M. R., Grujičić D., Vukajlović J. T., Markovic A., Milutinović M. G., Stanković M. S., Vukovic N. L., Vukić M., Milošević-Djordjević O. In vitro study of genotoxic and cytotoxic activities of methanol extracts of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra. *S Afr J Bot.* 2020;132:117–126. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.04.016.
34. Saleh A. M., Aljada A., Rizvi S. A., Nasr A., Alaskar A. S., Williams J. D. In vitro cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oilis mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14(1):226. DOI: 10.1186/1472-6882-14-226.
35. Almahdawy S. S., Said A. M., Abbas I. S., Dawood A. H. The evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of the essential oil extracted from the aerial parts of southernwood herb (*Artemisia abrotanum* L.) that recently grown in Iraq. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;10(10):3847. DOI: 10.22159/ajpcr.2017.v10i10.21725.
36. Elansary H. O., Szopa A., Kubica P., Ekiert H., El-Ansary D. O., Al-Mana F. A., Mahmoud E. A. Polyphenol content and biological activities of *Ruta graveolens* L. and *Artemisia abrotanum* L. in Northern Saudi Arabia. *Processes*. 2020;8(5):531. DOI: 10.3390/pr8050531.
37. Akrout A., Gonzalez L. A., El Jani H., Madrid P. C. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(2):342–347. DOI: 10.1016/j.fct.2010.11.003.
38. Beeby E., Magalhães M., Poças J., Collins T., Lemos M. F. L., Barros L., Ferreira I. C. F. R., Cabral C., Pires I. M. Secondary metabolites (essential oils) from sand-duneplants induce cytotoxic effects in cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2020;258:112803. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112803.
39. Kim J., Jung K. H., Yan H. H., Cheon M. J., Kang S., Jin X., Park S., Oh M. S., Hong S. S. Artemisia Capillaris leaves inhibit cell proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):147. DOI: 10.1186/s12906-018-2217-6.
40. Jang E., Kim S. Y., Lee N. R., Yi C. M., Hong D. R., Lee W. S., Kim J. H., Lee K. T., Kim B. J., Lee J. H., Inn K. S. Evaluation of antitumor activity of *Artemisia capillaris* extract against hepatocellular carcinoma through the inhibition of IL-6/STAT3 signalingaxis. *Oncol Rep.* 2017;37(1):526–532. DOI: 10.3892/or.2016.5283.
41. Yan H., Jung K. H., Kim J., Rumman M., Oh M. S., Hong S. S. Artemisia capillaris extract AC68 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma by blocking the PI3K/AKT pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018;98:134–141. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.043.
42. Sharifi-Rad J., Sureda A., Tenore G. C., Daglia M., Sharifi-Rad M., Valussi M., Tundis R., Sharifi-Rad M., Loizzo M. R., Ademiluyi A. O., Sharifi-Rad R., Ayatollahi S. A., Iriti M. Biological Activities of Essen-

tial Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules*. 2017;22(1):70. DOI: 10.3390/molecules22010070.
43. Khlifi D., Sghaier R. M., Amouri S., Laouini D., Hamdi M., Bouajila J. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba, Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem Toxicol*. 2013;55:202–208. DOI: 10.1016/j.fct.2013.01.004.
44. Mohammed H., Alsenosy N., Ebeed N., Fahmy K. Estimation of anticancer effect of methanolic extract of *Artemisia herba alba* on human cancer cell lines. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*. 2019;27(4):2215–2222. DOI: 10.21608/ajs.2019.19168.1112.
45. Tilaoui M., Mouse H. A., Jaafari A., Aboufatima R., Chait A., Zyad A. Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba*. *Rev Bras Farmacogn*. 2011;21(4):781–785. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000114.
46. Sahu N., Meena S., Shukla V., Chaturvedi P., Kumar B., Datta D., Arya K. R. Extraction, fractionation and re-fractionation of *Artemisia nilagirica* for anticancer activity and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS determination. *J Ethnopharmacol*. 2018;213:72–80. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.029.
47. Raju S. R., Balakrishnan S., Kollimada S., Chandrashekara K. N., Jampani A. Anti-tumor effects of *Artemisia nilagirica* extract on MDA-MB-231 breast cancercells: deciphering the biochemical and biomechanical properties via TGF-βupregulation. *Heliyon*. 2020;6(10):e05088. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05088.
48. Chung K.-S.,Choi H.-E., Shin J.-S., Cho E. J., Cho Y. W., Choi J. H., Baek N. I., Lee K. T. Chemopreventive effects of standardized ethanol extract from the aerial parts of *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal via NF-κB inactivation on colitis-associated colon tumorigenesis in mice. *Food Chem Toxicol*. 2015;75:14–23. DOI: 10.1016/j.fct.2014.11.007.
49. Ju H.-K., Lee H.-W., Chung, K.-S., Choi J. H., Cho J. G., Baek N. I., Chung H. G., Lee K. T. Standardized flavonoid-rich fraction of *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal induces apoptosis via mitochondrial pathway in human cervical cancer HeLa cells. *J Ethnopharmacol*. 2012;141(1):460–468. DOI: 10.1016/j.jep.2012.03.011.
50. Choi E.-J., Kim G.-H. Antioxidant and anticancer activity of *Artemisia princeps* var. orientalis extract in HepG2 and Hep3B hepatomacellular carcinoma cells. *Chin J Cancer Res*. 2013;25(5):536–543. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2013.10.02.
51. Tayarani-Najaran Z., Sareban M., Gholami A., Emami S. A., Mojarrab M. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Artemisia turanica* Krasch. on K562 and HL-60 cell lines. *Scientific World Journal*. 2013;2013:628073. DOI: 10.1155/2013/628073.
52. Taherkhani M. In vitro cytobiological effects of phytochemicals from *Artemisia turanica*. *J Rep Pharma Sci*. 2019;8(1):106–113.
53. Khan K., Fatima H., Taqi M. M., Zia M., Ur-Rehman T., Mirza B., Haq I. U. Phytochemical and in vitro biological evaluation of Artemisia scoparia Waldst. & Kit. for enhanced extraction of commercially significant bioactive compounds. *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2015;2(3):77–86. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.04.002.
54. Sajid M., Khan M. R., Shah N. A., Ullah S., Younis T., Majid M., Ahmad B., Nigussie D. Proficiencies of *Artemisia scoparia* against CCl4 induced DNA damages and renal toxicity in rat. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):149. DOI: 10.1186/s12906-016-1137-6.
55. Choi E., Park H., Lee J., Kim G. Anticancer, antiobesity, and anti-inflammatory activity of Artemisia species in vitro. *J Tradit Chin Med* 2013;33(1):92–97. DOI: 10.1016/s0254-6272(13)60107-7.
56. Choi E., Kim G. Effect of artemisia species on cellular proliferation andapoptosis in human breast cancer cells via estrogen receptor-related pathway. *J Tradit Chin Med*. 2013;33(5):658–663. DOI: 10.1016/s0254-6272(14)60038-8.
57. Zhang L., Lv X., Shao L., Ma Y. F., Cheng W. Z., Gao H. T. Essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis and necrosis of HeLa cells. *Zhong Yao Cai*. 2013;36(12):1988–1992.
58. Taherkhani M. Chemical constituents, total phenolic content, antimicrobial, antioxidant and radical scavenging properties, chelating ability, tyrosinase inhibition and in vitro cytotoxic effects of *Artemisia aucheri* herbs. *Pharm Chem J*. 2017;50(11):736–745. DOI: 10.1007/s11094-017-1523-5.
59. Taherkhani M. Chemical constituents, antimicrobial, cytotoxicity, mutagenic and antimutagenic effects of *Artemisia ciniformis*. *Iran J Pharm Res*. 2016;15(3):471–481.
60. Ahmadi F., Mojarrab M., Ghazi-Khansari M., Hosseinzadeh L. A semipolar fraction of petroleum ether extract of *Artemisia aucheri* induces apoptosis and enhances the apoptotic response to doxorubicin in human neuroblastoma SKNMC cell line. *Res Pharm Sci*. 2015;10(4):335–344.
61. Tayarani-Najaran Z., Hajian Z., Mojarrab M., Emami S. A. Cytotoxic and apoptotic effects of extracts of *Artemisia ciniformis* Krasch. & Popov ex Poljakov on K562 and HL-60 cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(17):7055–7059. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.17.7055.
62. Mojarrab M., Lagzianb M., Emamic S. A. Asilic J., Tayarani-Najaran Z. In-vitro anti-proliferative and apoptotic activity of different fractions of *Artemisia armeniaca*. *Rev Bras Farmacogn*. 2013;23(5):783–788. DOI: 10.1590/S0102-695X2013000500010.
63. Navarro-Salcedo M. H., Delgado-Saucedo J. I., Siordia-Sánchez V. H., González-Ortiz L. J., Castillo-Herrera G. A., Puebla-Pérez A. M. *Artemisia dracunculus* extracts obtained by organic solvents and supercritical CO_2 produce cytotoxic and antitumor effects in mice with L5178Y lymphoma. *J Med Food*. 2017;20(11):1076–1082. DOI: 10.1089/jmf.2017.0044.
64. Hong L., Ying S. H. Ethanol extract and isolated constituents from *Artemisia dracunculus* inhibit esophageal squamous cell carcinoma and induce apoptotic cell death. *Drug Res. (Stuttg)*. 2015;65(2):101–106. DOI: 10.1055/s-0034-1372647.
65. Zeng Y. T., Jiang J. M., Lao H. Y., Guo J. W., Lun Y. N., Yang M. Antitumor and apoptoticactivities of the chemical constituents from the ethyl acetate extract of *Artemisia indica*. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):2234–2240. DOI: 10.3892/mmr.2014.3012.
66. Hosseini A., Bakhtiari E., Khajavi Rad A., Shahraki S., Mousavi S. H., Havakhah S., Amiri M. S. The Evaluation and Comparing of Cytotoxic Effects of *Ferula gummosa* Gum, *Scutellaria lindbergii*, *Kelussia odoratissima* and *Artemisia kopetdaghensis* Extracts on ACHN Cell Line. *Iran J Pharm Res*. 2017;16(3):1104–1112.
67. Nyamsambuu A., Ahmed A., Khusbu F. Y., Oidovsambuu S., Khan M. A., Zhou X., Fu J. J., Chen H. C. Anti-oxidant and Antiproliferative Activities of Mongolian Medicinal Plant Extracts and Structure Isolation of Gnetin-H Compound. *Med Chem*. 2021;17(9):963–973. DOI: 10.2174/1573406416666201106110117.
68. Farahani Z. B., Mirzaie A., Ashrafi F., Hesari M. R., Chitgar A., Noorbazargan H., Rahimi A. Phytochemical composition and biological activities of *Artemisia quettensis* Podlech ethanolic extract. *Nat Prod Res*. 2017;31(21):2554–2558. DOI: 10.1080/14786419.2017.1318385.
69. Salehi S., Mirzaie A., Sadat Shandiz S. A., Noorbazargan H., Rahimi A., Yarmohammadi S., Ashrafi F. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of *Artemisia marschalliana* Sprengel extract. *Nat Prod Res*. 2017;31(4):469–472. DOI: 10.1080/14786419.2016.1174234.
70. Asgharian P., Zadehkamand M., Delazar A., Safarzadeh E., Asnaashari S. Chemical Composition and Some Biological Activities of *Artemisia marschalliana* Essential Oil. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2019;6(4):71–77. DOI: 10.22127/rjp.2019.93527.
71. Solowey E., Lichtenstein M., Sallon S., Paavilainen H., Solowey E., Lorberboum-Galsk H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *Sci World J*. 2014;2014:721402. DOI: 10.1155/2014/721402.
72. Nokerbek S., Sakipova Z., Chalupová M., Nejezchlebová M., Hošek J. Cytotoxic, anti-cancer, and anti-microbial effects of different extracts obtained from *Artemisia rupestris*. *CeskaSlov Farm*. 2017;66(1):15–22.
73. Batbold U., Liu J-J. *Artemisia santolinifolia*-Mediated Chemosensitization via Activation of Distinct Cell Death Modes and Suppression of STAT3/Survivin-Signaling Pathways in NSCLC. *Molecules*. 2021;26(23):7200. DOI: 10.3390/molecules26237200.
74. Wang J., Lu H. D., Muhammad U., Wei Z. H., Lu Z. X., Bie X. M., Lu F. X. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from Artemisia selengensis Turcz and itsantioxidant and anticancer activities. *J Food Sci Technol*. 2016;53(2):1025–1034.DOI: 10.1007/s13197-015-2156-x.

REFERENCES

1. Pfeffer C. M., Singh A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):448. DOI: 10.3390/IJMS19020448.
2. An W., Lai H., Zhang Y., Liu M., Lin X., Cao S. Apoptotic Pathway as the Therapeutic Target for Anticancer Traditional Chinese Medicines. *Front Pharmacol*. 2019;10:758. DOI: 10.3389/fphar.2019.00758.
3. Rajandeep K., Karan K., Harpreet K. Plants as a source of anticancer agents. *J Nat Pro. Plant*. 2011;1(1):119–124.

4. Stukov A. N., Blank M. A., Semiglazova T. Yu., Belyaev A. M., editors Pharmacotherapy of tumors. Dedicated to the memory of Mikhail Lazarievich Gershanovich. Saint Petersburg: Voprosy onkologii; 2017. 512 p. (In Russ.)
5. Bora K. S., Sharma A. The genus Artemisia: a comprehensive review. *Pharm. Biol.* 2011;49(1):101–109. DOI: 10.3109/13880209.2010.497815.
6. Budantsev A. L., editor. Plant resources of Russia. Wild flowering plants, their component composition and biological activity. The family *Asteraceae*. The genera Achillea to Doronicum. Saint Petersburg, Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK; 2012. V. 5. P. 1. 320 p. (In Russ.)
7. Ivanescu B., Miron A., Corciova A. Sesquiterpene Lactones from Artemisia Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *J Anal Methods Chem*. 2015;2015:247685. DOI: 10.1155/2015/247685.
8. Randalova T. E. Sesquiterpene lactones of plants of the genus *Artemisia* L. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta. Meditsina i farmatsiya*. 2019;64(4):3–9. (In Russ.) DOI: 10.18101/2306-1995-2019-4-3-9.
9. Bailén M., Julio L. F., Diaz C. E., Sanz J., Martínez-Díaz R. A., Cabrera R., Burillo J., Gonzalez-Coloma A. Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions. *Ind Crop Prod.* 2013;49:102–107. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.04.055.
10. Haider S. Z., Andola H. C., Mohan M. Constituents of *Artemisia gmelinii* Weber ex Stechm. from Uttarakhand Himalaya: A Source of Artemisia Ketone. *Indian J Pharm Sci.* 2012;74(3):265–267. DOI: 10.4103/0250-474X.106074.
11. Wang X., Zhao X., Bin Y., Dong H., Liu D., Huang L. Combination of ultrasonic–assisted extraction with RRLC–QQQ method for the determination of artemisinin in the Chinese herb *Artemisia annua* L. *Phytochem Anal.* 2011;22(3):280–284. DOI: 10.1002/pca.1277.
12. Suberu J. O., Romero-Canelón I., Sullivan N., Lapkin A. A., Barker G. C. Comparative cytotoxicity of artemisinin and cisplatin and their interactions with chlorogenic acids in MCF7 breast cancer cells. *Chem Med Chem.* 2014;9(12):2791–2797. DOI: 10.1002/cmdc.201402285.
13. Feng X., Cao S., Qiu F., Zhang B. Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L. *Pharmacol Ther.* 2020;216:107650. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107650.
14. Lai H. C., Singh N. P., Sasaki T. Development of artemisinin compounds for cancer treatment. *Invest New Drugs*. 2013;31(1):230–246. DOI: 10.1007/s10637-012-9873-z.
15. Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2018;64(3):25–34. DOI: 10.14715/cmb/2018.64.3.5.
16. Mirkin V., Berrebi A., Rakhman I., Haran M., Shvidel L. The role of the plant artemisia in survival and induction of apoptosis of b cells in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Harefuah*. 2017;156(2):86–88.
17. Erel B., Aydin F., Ballar P. In vitro cytotoxic properties of six *Artemisia* L. species. *Turk J Pharm Sci*. 2011;8(3):247–252.
18. Gordanian B., Behbahani M., Carapetian J., Fazilati M. I. Cytotoxic effect of *Artemisia absinthium* L. grown at two different altitudes on human breast cancer cell line MCF7. *Research in Medicine*. 2012;36(3):124–131.
19. Mughees M., Samim M., Ahmad S., Wajid S. Comparative analysis of the cytotoxic activity of extracts from different parts of *A. absinthium* L. on breast cancer cell lines and correlation with active compounds concentration. *Plant Biosyst.* 2018;153(4):569–579. DOI: 10.1080/11263504.2018.1527792.
20. Shafi G., Hasan T. N., Syed N. A., Al-Hazzani A. A., Alshatwi A. A., Jyothi A., Munshi A. *Artemisia absinthium* (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2012;39(7):7373–7379. DOI: 10.1007/s11033-012-1569-0.
21. Uğur D., Güneş H., Güneş F., Mammadov R. Cytotoxic activities of certain medicinal plants on different cancer cell lines. *Turkish J Pharm Sci*. 2017;14:222–230. DOI: 10.4274/tjps.80299.
22. Sultan M. H., Zuwaiel A. A., Moni S. S., Alshahrani S., Alqahtani S. S., Madkhali O., Elmobark M. E. Bioactive Principles and Potentiality of Hot Methanolic Extract ofthe Leaves from *Artemisia absinthium* L. "in vitro" Cytotoxicity Against Human MCF-7 Breast Cancer Cells, Antibacterial Study and Wound Healing Activity". *Curr Pharm Biotechnol.* 2020;21(15):1711–1721. DOI: 10.2174/1389201021666200928150519.
23. Gordanian B., Behbahani M., Carapetian J., Fazilati M. In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five Artemisia species. *Res Pharm Sci*. 2014;9(2):91–96.
24. Ali M., Iqbal R., Safdar M., Murtaza S., Mustafa G., Sajjad M., Bukhari S. A., Huma T. Antioxidant and antibacterial activities of Artemisia absinthium and Citrus paradisi extracts repress viability of aggressive liver cancer cell line. *Mol Biol Rep.* 2022;49(4):3367–3367. DOI: 10.1007/s11033-021-07103-4.
25. Nazeri M., Mirzaie-Asl A., Saidijam M., Moradi M. Methanolic extract of Artemisia absinthium prompts apoptosis, enhancing expression of Bax/Bcl-2 ratio,cell cycle arrest, caspase-3 activation and mitochondrial membrane potential destruction in human colorectal cancer HCT-116 cells. *Mol Biol Rep.* 2020;47(11):8831–8840. DOI: 10.1007/s11033-020-05933-2.
26. Ali A., Rahman K., Jahan N., Jamil A., Rashid A., Shah S. M. A. Protection of DNA during oxidative stress and cytotoxic potential of Artemisia absinthium. *Pak J Pharm Sci.* 2016;29(1 Suppl):295–299.
27. Martínez-Díaz R. A., Ibáñez-Escribano A., Burillo J., de las Heras L., del Prado G., Agulló-Ortuño M. T., Julio L. F., González-Coloma A. Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(5):693–699. DOI: 10.1590/0074-02760140129.
28. Nawab A., Yunus M., Mahdi A. A. Gupta S. Evaluation of anticancer properties of medicinal plants from the indian sub-continent. *Mol Cell Pharmacol.* 2011;3(1):21–29. DOI: 10.4255/mcpharmacol.11.04.
29. Sharmila K., Padma P. R. Anticancer activity of Artemisia vulgaris on hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Int J Pharm Pharmaceut Sci.* 2013;5(3):479–483.
30. Lian G., Li F., Yin Y., Chen L., Yang J. Herbal extract of *Artemisia vulgaris* (mugwort) induces antitumor effects in HCT-15 human colon cancer cells via autophagy induction, cell migration suppression and loss of mitochondrial membrane potential. *J BUON*. 2018;23(1):73–78.
31. Abdelhamed S., Yokoyama S., Hafiyani L., Kalauni S. K., Hayakawa Y., Awale S., Saiki I. Identification of plant extracts sensitizing breast cancer cells to TRAIL. *Oncol Rep.* 2013;29(5):1991–1998. DOI: 10.3892/or.2013.2293.
32. Ly B. T. K., Ly D. M., Linh P. H., Son H. K., Ha N. L., Chi H. T. Screening of medicinal herbs for cytotoxic activity to leukemia cells. *J BUON*. 2020;25(4):1989–1996.
33. Jakovljević M. R., Grujičić D., Vukajlović J. T., Markovic A., Milutinović M. G., Stanković M. S., Vukovic N. L., Vukić M., Milošević-Djordjević O. In vitro study of genotoxic and cytotoxic activities of methanol extracts of *Artemisia vulgaris* L. and *Artemisia alba* Turra. *S Afr J Bot.* 2020;132:117–126. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.04.016.
34. Saleh A. M., Aljada A., Rizvi S. A., Nasr A., Alaskar A. S., Williams J. D. In vitro cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oilis mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14(1):226. DOI: 10.1186/1472-6882-14-226.
35. Almahdawy S. S., Said A. M., Abbas I. S., Dawood A. H. The evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of the essential oil extracted from the aerial parts of southernwood herb (*Artemisia abrotanum* L.) that recently grown in Iraq. *Asian J Pharm Clin Res*. 2017;10(10):3847. DOI: 10.22159/ajpcr.2017.v10i10.21725.
36. Elansary H. O., Szopa A., Kubica P., Ekiert H., El-Ansary D. O., Al-Mana F. A., Mahmoud E. A. Polyphenol content and biological activities of *Ruta graveolens* L. and *Artemisia abrotanum* L. in Northern Saudi Arabia. *Processes*. 2020;8(5):531. DOI: 10.3390/pr8050531.
37. Akrout A., Gonzalez L. A., El Jani H., Madrid P. C. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(2):342–347. DOI: 10.1016/j.fct.2010.11.003.
38. Beeby E., Magalhães M., Poças J., Collins T., Lemos M. F. L., Barros L., Ferreira I. C. F. R., Cabral C., Pires I. M. Secondary metabolites (essential oils) from sand-duneplants induce cytotoxic effects in cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 2020;258:112803. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112803.
39. Kim J., Jung K. H., Yan H. H., Cheon M. J., Kang S., Jin X., Park S., Oh M. S., Hong S. S. Artemisia Capillaris leaves inhibit cell proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):147. DOI: 10.1186/s12906-018-2217-6.

40. Jang E., Kim S. Y., Lee N. R., Yi C. M., Hong D. R., Lee W. S., Kim J. H., Lee K. T., Kim B. J., Lee J. H., Inn K. S. Evaluation of antitumor activity of *Artemisia capillaris* extract against hepatocellular carcinoma through the inhibition of IL-6/STAT3 signalingaxis. *Oncol Rep.* 2017;37(1):526–532. DOI: 10.3892/or.2016.5283.
41. Yan H., Jung K. H., Kim J., Rumman M., Oh M. S., Hong S. S. Artemisia capillaris extract AC68 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma by blocking the PI3K/AKT pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018;98:134–141. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.043.
42. Sharifi-Rad J., Sureda A., Tenore G. C., Daglia M., Sharifi-Rad M., Valussi M., Tundis R., Sharifi-Rad M., Loizzo M. R., Ademiluyi A. O., Sharifi-Rad R., Ayatollahi S. A., Iriti M. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules*. 2017;22(1):70. DOI: 10.3390/molecules22010070.
43. Khlifi D., Sghaier R. M., Amouri S., Laouini D., Hamdi M., Bouajila J. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba, Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem Toxicol*. 2013;55:202–208. DOI: 10.1016/j.fct.2013.01.004.
44. Mohammed H., Alsenosy N., Ebeed N., Fahmy K. Estimation of anticancer effect of methanolic extract of *Artemisia herba alba* on human cancer cell lines. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*. 2019;27(4):2215–2222. DOI: 10.21608/ajs.2019.19168.1112.
45. Tilaoui M., Mouse H. A., Jaafari A., Aboufatima R., Chait A., Zyad A. Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from aerial parts of a medicinal herb *Artemisia herba-alba*. *Rev Bras Farmacogn*. 2011;21(4):781–785. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000114.
46. Sahu N., Meena S., Shukla V., Chaturvedi P., Kumar B., Datta D., Arya K. R. Extraction, fractionation and re-fractionation of *Artemisia nilagirica* for anticancer activity and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS determination. *J Ethnopharmacol.* 2018;213:72–80. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.029.
47. Raju S. R., Balakrishnan S., Kollimada S., Chandrashekara K. N., Jampani A. Anti-tumor effects of *Artemisia nilagirica* extract on MDA-MB-231 breast cancercells: deciphering the biochemical and biomechanical properties via TGF-βupregulation. *Heliyon.* 2020;6(10):e05088. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05088.
48. Chung K.-S.,Choi H.-E., Shin J.-S., Cho E. J., Cho Y. W., Choi J. H., Baek N. I., Lee K. T. Chemopreventive effects of standardized ethanol extract from the aerial parts of *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal via NF-κB inactivation on colitis-associated colon tumorigenesis in mice. *Food Chem Toxicol.* 2015;75:14–23. DOI: 10.1016/j.fct.2014.11.007.
49. Ju H.-K., Lee H.-W., Chung, K.-S., Choi J. H., Cho J. G., Baek N. I., Chung H. G., Lee K. T. Standardized flavonoid-rich fraction of *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal induces apoptosis via mitochondrial pathway in human cervical cancer HeLa cells. *J Ethnopharmacol.* 2012;141(1):460–468. DOI: 10.1016/j.jep.2012.03.011.
50. Choi E.-J., Kim G.-H. Antioxidant and anticancer activity of *Artemisia princeps* var. orientalis extract in HepG2 and Hep3B hepatomacellular carcinoma cells. *Chin J Cancer Res*. 2013;25(5):536–543. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2013.10.02.
51. Tayarani-Najaran Z., Sareban M., Gholami A., Emami S. A., Mojarrab M. Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Artemisia turanica* Krasch. on K562 and HL-60 cell lines. *Scientific World Journal*. 2013;2013:628073. DOI: 10.1155/2013/628073.
52. Taherkhani M. In vitro cytobiological effects of phytochemicals from *Artemisia turanica*. *J Rep Pharma Sci.* 2019;8(1):106–113.
53. Khan K., Fatima H., Taqi M. M., Zia M., Ur-Rehman T., Mirza B., Haq I. U. Phytochemical and in vitro biological evaluation of Artemisia scoparia Waldst. & Kit. for enhanced extraction of commercially significant bioactive compounds. *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2015;2(3):77–86. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.04.002.
54. Sajid M., Khan M. R., Shah N. A., Ullah S., Younis T., Majid M., Ahmad B., Nigussie D. Proficiencies of *Artemisia scoparia* against CCl4 induced DNA damages and renal toxicity in rat. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):149. DOI: 10.1186/s12906-016-1137-6.
55. Choi E., Park H., Lee J., Kim G. Anticancer, antiobesity, and anti-inflammatory activity of Artemisia species in vitro. *J Tradit Chin Med* 2013;33(1):92–97. DOI: 10.1016/s0254-6272(13)60107-7.
56. Choi E., Kim G. Effect of artemisia species on cellular proliferation andapoptosis in human breast cancer cells via estrogen receptor-related pathway. *J Tradit Chin Med.* 2013;33(5):658–663. DOI: 10.1016/s0254-6272(14)60038-8.
57. Zhang L., Lv X., Shao L., Ma Y. F., Cheng W. Z., Gao H. T. Essential oil from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis and necrosis of HeLa cells. *Zhong Yao Cai.* 2013;36(12):1988–1992.
58. Taherkhani M. Chemical constituents, total phenolic content, antimicrobial, antioxidant and radical scavenging properties, chelating ability, tyrosinase inhibition and in vitro cytotoxic effects of *Artemisia aucheri* herbs. *Pharm Chem J.* 2017;50(11):736–745. DOI: 10.1007/s11094-017-1523-5.
59. Taherkhani M. Chemical constituents, antimicrobial, cytotoxicity, mutagenic and antimutagenic effects of *Artemisia ciniformis*. *Iran J Pharm Res*. 2016;15(3):471–481.
60. Ahmadi F., Mojarrab M., Ghazi-Khansari M., Hosseinzadeh L. A semipolar fraction of petroleum ether extract of *Artemisia aucheri* induces apoptosis and enhances the apoptotic response to doxorubicin in human neuroblastoma SKNMC cell line. *Res Pharm Sci*. 2015;10(4):335–344.
61. Tayarani-Najaran Z., Hajian Z., Mojarrab M., Emami S. A. Cytotoxic and apoptotic effects of extracts of *Artemisia ciniformis* Krasch. & Popov ex Poljakov on K562 and HL-60 cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(17):7055–7059. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.17.7055.
62. Mojarrab M., Lagzianb M., Emamic S. A. Asilic J., Tayarani-Najaran Z. In-vitro anti-proliferative and apoptotic activity of different fractions of *Artemisia armeniaca*. *Rev Bras Farmacogn*. 2013;23(5):783–788. DOI: 10.1590/S0102-695X2013000500010.
63. Navarro-Salcedo M. H., Delgado-Saucedo J. I., Siordia-Sánchez V. H., González-Ortiz L. J., Castillo-Herrera G. A., Puebla-Pérez A. M. *Artemisia dracunculus* extracts obtained by organic solvents and supercritical CO_2 produce cytotoxic and antitumor effects in mice with L5178Y lymphoma. *J Med Food.* 2017;20(11):1076–1082. DOI: 10.1089/jmf.2017.0044.
64. Hong L., Ying S. H. Ethanol extract and isolated constituents from *Artemisia dracunculus* inhibit esophageal squamous cell carcinoma and induce apoptotic cell death. *Drug Res. (Stuttg).* 2015;65(2):101–106. DOI: 10.1055/s-0034-1372647.
65. Zeng Y. T., Jiang J. M., Lao H. Y., Guo J. W., Lun Y. N., Yang M. Antitumor and apoptoticactivities of the chemical constituents from the ethyl acetate extract of *Artemisia indica*. *Mol Med Rep*. 2015;11(3):2234–2240. DOI: 10.3892/mmr.2014.3012.
66. Hosseini A., Bakhtiari E., Khajavi Rad A., Shahraki S., Mousavi S. H., Havakhah S., Amiri M. S. The Evaluation and Comparing of Cytotoxic Effects of *Ferula gummosa* Gum, *Scutellaria lindbergii*, *Kelussia odoratissima* and *Artemisia kopetdaghensis* Extracts on ACHN Cell Line. *Iran J Pharm Res*. 2017;16(3):1104–1112.
67. Nyamsambuu A., Ahmed A., Khusbu F. Y., Oidovsambuu S., Khan M. A., Zhou X., Fu J. J., Chen H. C. Anti-oxidant and Antiproliferative Activities of Mongolian Medicinal Plant Extracts and Structure Isolation of Gnetin-H Compound. *Med Chem*. 2021;17(9):963–973. DOI: 10.2174/1573406416666201106110117.
68. Farahani Z. B., Mirzaie A., Ashrafi F., Hesari M. R., Chitgar A., Noorbazargan H., Rahimi A. Phytochemical composition and biological activities of *Artemisia quettensis* Podlech ethanolic extract. *Nat Prod Res*. 2017;31(21):2554–2558. DOI: 10.1080/14786419.2017.1318385.
69. Salehi S., Mirzaie A., Sadat Shandiz S. A., Noorbazargan H., Rahimi A., Yarmohammadi S., Ashrafi F. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of *Artemisia marschalliana* Sprengel extract. *Nat Prod Res*. 2017;31(4):469–472. DOI: 10.1080/14786419.2016.1174234.
70. Asgharian P., Zadehkamand M., Delazar A., Safarzadeh E., Asnaashari S. Chemical Composition and Some Biological Activities of *Artemisia marschalliana* Essential Oil. *Research Journal of Pharmacognosy.* 2019;6(4):71–77. DOI: 10.22127/rjp.2019.93527.
71. Solowey E., Lichtenstein M., Sallon S., Paavilainen H., Solowey E., Lorberboum-Galsk H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *Sci World J.* 2014;2014:721402. DOI: 10.1155/2014/721402.
72. Nokerbek S., Sakipova Z., Chalupová M., Nejezchlebová M., Hošek J. Cytotoxic, anti-cancer, and anti-microbial effects of different extracts obtained from *Artemisia rupestris*. *CeskaSlov Farm*. 2017;66(1):15–22.
73. Batbold U., Liu J-J. *Artemisia santolinifolia*-Mediated Chemosensitization via Activation of Distinct Cell Death Modes and Suppression of STAT3/Survivin-Signaling Pathways in NSCLC. *Molecules*. 2021;26(23):7200. DOI: 10.3390/molecules26237200.
74. Wang J., Lu H. D., Muhammad U., Wei Z. H., Lu Z. X., Bie X. M., Lu F. X. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from Artemisia selengensis Turcz and itsantioxidant and anticancer activities. *J Food Sci Technol*. 2016;53(2):1025–1034.DOI: 10.1007/s13197-015-2156-x.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-52-58
UDC 616-085

Check for updates

CC BY 4.0

Research article / Оригинальная статья

Cytotoxic Effect of 6-Ethyl-Chenodeoxycholic Acid and Cabazitaxel on PC-3 Cells

Munaf H. Zalzala[1], Wrood S. Al-khfajy[2]✉, Raghad Abdulsalam Khaleel[3]

[1] Department of Pharmacology and Toxicology, University of Baghdad, College of Pharmacy, Baghdad-Iraq
[2] Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy, Mustansiriyah University, Baghdad-Iraq
[3] Department of Pharmacology, College of Medicine, University of Al Iraqia, Baghdad-Iraq

✉ **Corresponding author:** Wrood S. Al-khfajy. **E-mail:** pharm.wroodsalim@uomustansiriyah.edu.iq

ORCID: Munaf H. Zalzala – https://orcid.org/0000-0003-0552-6469; Wrood S. Al-khfajy – https://orcid.org/0000-0003-4451-8939; Raghad Abdulsalam Khaleel – https://orcid.org/0000-0001-5757-5356.

Received: 15.08.2022 **Revised:** 11.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Chemotherapy with Cabazitaxel (CBZ) is a typical first-line treatment option for naïive castration-resistant prostate cancer resistant to docetaxel. On the other hand, Cabazitaxel's therapeutic success is constrained by chemoresistance and side effects.

Aim. To assess whether 6 alpha-ethylchenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a selective agonist for bile acid receptors will enhance the efficacy of CBZ in androgen-independent prostate cancer cells.

Materials and methods. The 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) viability assay was used to assess the cytotoxicity of 6-ECDCA and CBZ medicines or their combinations against the human prostate cancer cell line (PC-3). The combination outcome suggested by Chou TC et al. was then evaluated using the combination index (CI) to find out the nature of synergism, antagonism, and additive effect of the drug's combination. Furthermore, the Dose-Reduction Index (DRI) was determined to measure how many times the dose could be reduced for each drug in a synergistic combination.

Results and discussion. Analysis of the dose- effect curve showed that the treatment of PC-3 cells with CBZ alone or combined with 6-ECDCA for 48 h led to 50 % cytotoxicity of 20.5 nM and 4.7 nM, respectively. 6-ECDCA at 1.77 μM had an additive effect based on the CI value, which was 1.02, while at 21.02 μM, the CI was 0.54 which designates a strong synergistic effect. The combination of CBZ and 6-ECDCA at a submaximal lower dose by 6-folds of each one produced a 95 % cell death than treatment with either agent alone

Conclusion. The Combination index plot showed CI ≤ l for all combinations used in this study, which indicates additive and synergistic interactions between CBZ and 6-ECDCA. The significant impact of 6-ECDCA in combination with CBZ for treating androgen-independent prostate cancer cells was confirmed by this study to be preferred to the treatment with a single drug.

Keywords: 6 alpha-ethylchenodeoxycholic acid; Cabazitaxel; synergistic combination chemotherapy

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. Wrood S. Al-khfajy and Munaf H. Zalzala – methodology; software, formal analysis; investigation. Raghada Abdalsalam Khaleel – review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgment. The authors thank college of pharmacy / Mustansiriyah University for providing the facilities to perform this study.

For citation: Zalzala M. H., Al-khfajy W. S., Khaleel R. A. Cytotoxic effect of 6-ethyl-chenodeoxycholic acid and cabazitaxel on PC-3 cells. *Drug development & registration*. 2023;12(1):52–58. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-52-58

INTRODUCTION

Cabazitaxel (CBZ) is an authorized first-line therapies in castration-resistant prostate cancer (CRPC) with a significant clinical outcome comparison with Docetaxel [1, 2]. These tubulin-active agents stabilize microtubules compositions, restraining cells in the late G_2–M phase of the cell cycle, resultant in cell death [2]. Nevertheless, survival of patients continues to be a challenge by the incidence of dose-dependent adverse side effects that were reported in 82 percent of patients and acquired resistance [3]. This highlighting a need to identify additional therapeutic targets to enhance chemotherapy based on taxanes. Finding compounds that, when used in conjunction with the present chemotherapeutic drugs, enable dose reduction without compromising efficacy, as well as the avoidance and/or overcoming of drug resistance, is therefore of great clinical significance. As a result, combination therapy, a form of cancer treatment that incorporates two or more therapeutic drugs, is increasing in importance [4, 5]. The 6 alpha-ethylchenodeoxycholic acid (6-ECDCA) is a potent, first class selective agonist for NR1H4 bile acid receptor derived from the primary human bile acid chenodeoxycholic acid

© Zalzala M. H., Al-khfajy W. S., Khaleel R. A., 2023

(CDCA) [6]. It is used clinically as an orally administered drug once daily to treat primary biliary cholangitis [7]. Bile acid signaling is involved in many physiological and pathological processes [8–10]. The 6-ECDCA has been shown to have protective antifibrotic effects in models of inflammatory bowel disease and diabetic nephropathy [8, 11]. Furthermore, new evidence confirms that it plays a pivotal role in carcinogenesis [12, 13]. Furthermore, recent results show that 6-ECDCA makes cells more sensitive to chemotherapeutic drugs [14]. Furthermore, the 6-ECDCA and the antiparasitic medication nitazoxanide (NTZ) worked together cooperatively to decrease tumor growth by preventing the expression of β-Catenin [15]. Moreover, Acyclic retinoid (ACR) agonist and the bile acid receptor GW4064 demonstrated synergistic inhibitory effects on the development of HCC at lower doses of each drug [16]. Furthermore, our previous recent study has shown that 6-ECDCA inhibits the proliferation, survival and migration of prostate cancer cells [17].

Therefore, the main objective was to investigate whether 6-ECDCA potentiates the cytotoxic and tumor-suppressive effects of Cabazitaxel and thus makes prostate cancer cells more chemosensitive to reduce the dose and toxicity and boost its efficacy in combating drug resistance. In addition, this study finds out the nature of action of drug combinations by assessment the CI and DRI.

MATERIALS AND METHODS

All the investigations conformed to the ethics of research and the study was approved by the Ethics Committee of the University.

Chemicals

6 alpha-ethylchenodeoxycholic acid (6-EDCA) and cabazotaxel (CBZ) were purchased from Medical Chemical Express (USA). MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 Diphenyltetrazolium Bromide was purchased from Promega (USA). MTT was diluted in PBS at a rate of 5 mg/ml to create the MTT stock solution. Filtration was used with a 0.45 µm filter unit to sterilize this solution. DMSO solvent was used to solubilize the formazan crystals. Best-grade solutions and chemicals were used in this study.

Cell culture

The human androgen -independent prostate cancer cell line (PC-3) was obtained from the ATCC American Type Culture Collection ATCC (USA) and grown in RPMI 1640 medium complemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 µM of L-glutamine in the presence of 1 % penicillin/streptomycin. The cell culture was maintained in a 37 °C incubator with a humidified 5 % CO_2. Cells were kept in the logarithmic growth phase. Cells were regularly tested for mycoplasma contamination.

In vitro cytotoxicity

Using the 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) viability assay, the cytotoxicity of the medicines or their combinations was assessed [18]. PC-3 cells were seeded in 96-well plates at a density of 5000 cells per well and cultured in a CO_2 incubator for 24 hours. After 24 hours, PC-3 cells were treated with CBZ alone at different low concentrations 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 and 160 nM, and another 96 well PC-3 cultured plate was treated with both CBZ / 6-ECDCA at different low concentrations of 6-ECDCA (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 µM) at 1:400 ratio. The Cell viability was determined after 48 hours by reading the absorbance at 530 nm using a microplate reader (BioTEK, USA). The cell viability was calculated using the following formula: Cell viability (%) = {(absorbance of the treated cells-blank) / (absorbance of the untreated cells-blank)} × 100. The experiment was achieved with 3 replications. The IC_{50} (the concentration required for 50 % cell inhibition) was calculated using the GraphPad Prism 9.2 program (GraphPad Software Inc., USA).

Synergistic effects analysis

As previously mentioned, the software Compusyn was used to investigate synergism, and its analysis method was based on Chou and Talalay's principle of the median effect [19]. This statistical analysis used data from the cell viability inhibitory experiments mentioned above. The following formula is used to produce a numerical index called the combination index (CI): $CI = D_1/(Dx)_1 + D_2/(Dx)_2$, where D_1 and D_2 are the concentrations of reagent 1 and 2 used together to achieve x% of the total effect of the medication, and $(Dx)_1$ and $(Dx)_2$ are the concentrations of separate agents to achieve the same efficacy. The CI value ($CI > 1$, antagonism; $CI = 1$, additive; $CI^{\bullet} < 1$, synergism) is a mathematical and quantitative representation of the pharmacological interaction between two medications. Based on data obtained from the cytotoxicity experiment and electronic software, CI values were made from a collection of fraction affected (Fa) levels from 0.05 to 0.9 (i. e. 5 to 90 % growth suppression). The Fa-CI plot and Fa-log (CI) plot illustrate the actual CI values at diverse suppressive levels. Dm. (the median-effect dose that inhibits 50 % of the growth under study) also studied. DRI was also measured to calculate how much the folds in dose reduction for each drug in synergistic combination, $DRI = 1$ indicates no dose reduction, whereas $DRI > 1$ and $DRI < 1$ indicate favorable and unfavorable dose reduction, respectively.

Morphological changes study:

An inverted microscope (Optika, Italy) was used to examine the morphology of PC-3 cells. Cellular alteration was examined as follows: After confluence (70 to 80 %), PC-3 cells were cultivated in a 60 mm cell culture plate.

The cells were then treated for 48 hours with fixed concentrations of CBZ and/or 6-ECDCA at their IC_{50}. After 48 hours of incubation, apoptotic features were recognized by the manifestation of cell shrinkage and/or the presence of membrane-bound cellular bodies. The morphological changes of the apoptotic cells were examined under an inverted microscope at 40x magnifications and captured with a digital camera (Optika, Italy).

Statistical analysis

The mean and standard deviation were used to express the data of the MTT assay (SD). GraphPad Prism 9.2 was used to calculate the IC_{50} values for each medication (GraphPad Software Inc., USA). Using the parameters of the CompuSyn tool, the dose-effect curve, CI values, Fa-CI, and DRI-Fa plots were measured (Compusyn Inc, USA). Differences that had a p-value <0.5 were considered significant.

RESULTS

Combined treatment with Cabazitaxel and 6-ECDCA induced a higher Proliferation inhibitory effect than that with Cabazitaxel alone on the PC-3 cells

The basic requirement for the estimation of synergistic activity is to know the potency and slope of the concentration-response curves of each drug molecule. Then, we measured the IC_{50} of CBZ in androgen independent prostate cancer cells that had been exposed to serial dilutions ranging from 1.25–160 nM for 48 hours using the MTT cytotoxicity test. Depending on the data in (figure 1, A), CBZ inhibited PC-3 cell proliferation in a dose-dependent effect. IC_{50} was 20.01 nM for CBZ, corroborating previously published literature [20]. Previous our work showed that the IC_{50} for 6-EDCA in PC-3 cells was 8 μM at 48 hours incubation time [17]. As shown below, CBZ being more potent than 6-EDCA in prostate cancer cell line. The CBZ + 6-EDCA group had higher inhibitory rates of the prostate cell line than each drug when administered independently at all concentrations. With the increase in CBZ concentration, the proliferation inhibitory rates of PC-3 cells reached significantly 80 and 97.3 % in the CBZ + 6-EDCA group at 20 and 40 nM CBZ, respectively (figure 1, B).

Both 6-ECDCA and Cabazitaxel have different combinations of synergistic effects when administered concurrently in androgen-independent PC-3 Cells

In combination chemotherapy, the dosage and timing of administration are crucial since they can influence the effectiveness of the treatment. Combining cytotoxic substances can have a synergistic, additive, or antagonistic effect depending on the ratio and timing of administration. This led us to identify the drug ratio and dosage schedule that produce the greatest amount of synergy. To determine whether 6-ECDCA and CBZ could work together, cells were treated for 48 hours in a constant ratio of 1:400 of CBZ to 6-ECDCA and 6-EDCA. Then, other analytical techniques were used, including the isobologram analysis, curve-shift analysis, and combination index (CI). As shown in the figure 2, A, the Dose-response curves illustrated in (table 1, figure 2, A) showed that CBZ/6-ECDCA combination was significantly

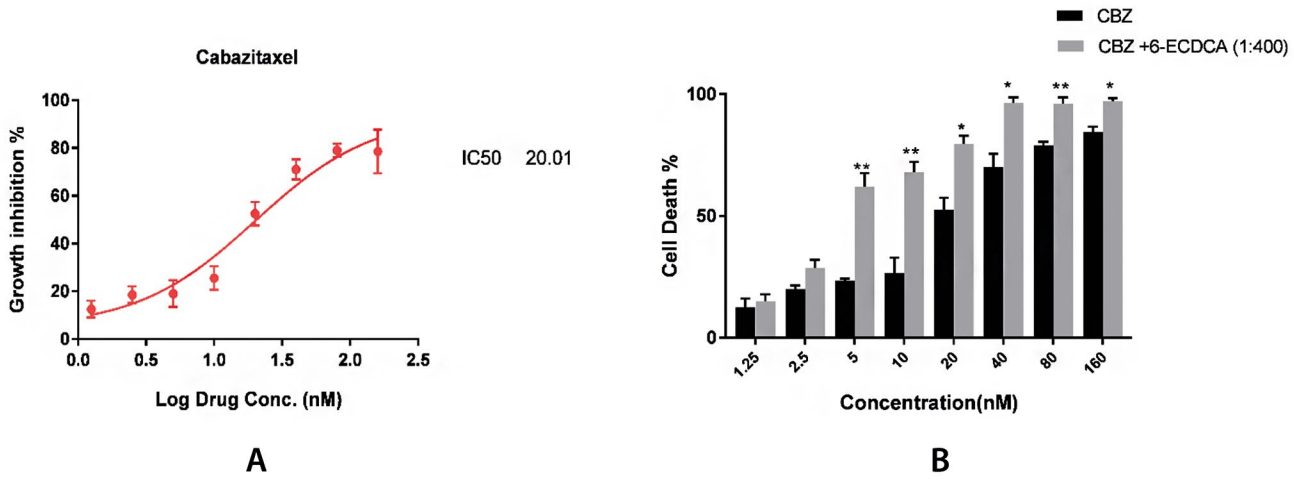
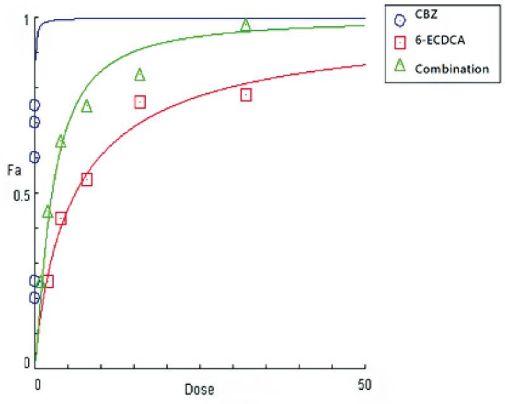


Figure 1. Combination treatment of Cabazitaxel (CBZ) with 6-ethylchenodeoxycholic acid (6-EDCA) resulted in a significantly higher dose-dependent reduction in prostate cancer cell viability than CBZ alone (A). Dose-response curve of Cabazitaxel (CBZ) on prostate cancer cell line. After being exposed to CBZ doses ranging from 0 M to 160 nM, the cells were tested for vitality; cells treated with vehicle served as controls (B). A representative histogram image demonstrating the effects of cabazitaxel alone or in combination with cells that had received a 1:400 constant ratio of CBZ: 6-ECDCA concurrently for 48 hours. Data points represent the average of three independent trials in triplicate. * p < 0.05; ** p < 0.01

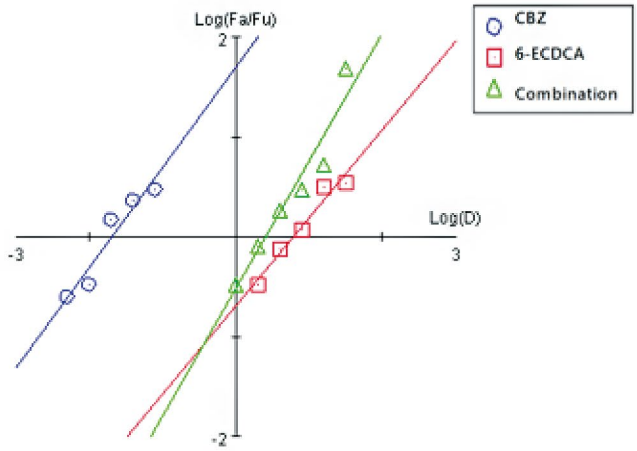
better than the single drug treatment confirming the favorable effect of 6-EDCA in combination with CBZ for treatment. The CBZ/6-EDCA group shows a steeper sigmoidal curve compared to CBZ or 6-ECDCA alone as shown by their slopes (m values). Both compounds have $R^2 > 0.96$ representing an excellent linear correlation, values of r were 0.95 or greater, demonstrating good conformity of dose-dependent effect data with respect to the median effect principle for in-vitro studies

Dose-dependent response curves represent a qualitative graphic illustration of the activity of combined drug, while CI presents a quantitative measure to assess the degree of drug combination. As shown in table 1, the CI value decreased as the concentration of CBZ combination increased. The CI value of the combination at 6.8 nM of CBZ was 1.025 that signifies slight additive action. While the CI value of 20.54 nM of CBZ and 61.78 nM were 0.74314 and 0.54078 respectively that indicates moderate synergistic action. These findings show that 6-ECDCA significantly and synergistically increased the sensitivity of prostate cancer cells to cabazitaxel therapy and decreased cell viability.

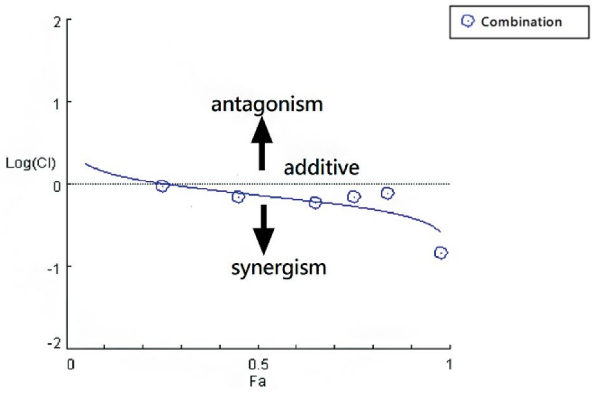


	m	Dm (μM)	R^2
CBZ	1	0.02	0.97
6-ECDCA	0.88	6.11	0.98
Combination(1:400)	1.28	2.61	0.97

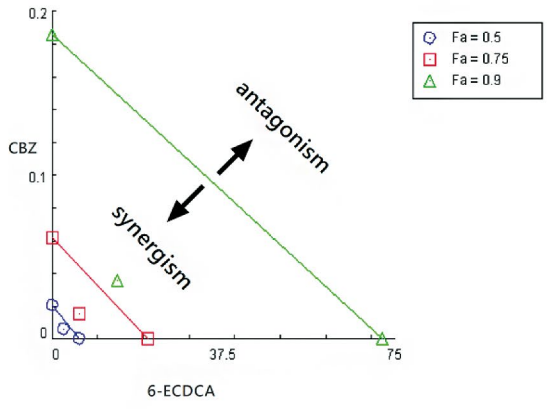
A



B



C



D

Figure 2. Individual and combination cytotoxicity of Cabazitaxel (CBZ) and 6-ethylchenodeoxycholic acid (6-ECDCA) in PC-3 prostate cancer cells (A). Concentration-dependent cytotoxicity of CBZ and 6-EDCA from MTT cytotoxicity test at 48 hours treatment (B). The CI plot of combinations treatment for 6-ECDCA and cabazitaxl drugs (C). Isobolograms showing the doses necessary for inhibition at 50 % (Fa 0.5), 75 % (Fa 0.75) and 90 % (Fa 0.9) for each drug separately. The dose pair is plotted as a point (symbol) beneath each Fa isobole or line to show synergism. CI values <1 are symbolic of synergistic effects; CI values >1 are symbolic of antagonistic effects; and CI values =1 are symbolic of additive effects, Fraction affected (FA) is a measure of the determined effect (cytotoxicity measured by an MTT assay). Slope (m), correlation coefficients (r), and median effect dosages (Dm) from median-effect plots.CI, combination index; Fa, fractional inhibition; CBZ, Cabazitaxel; 6-EDCA, 6-ethyle chenodeoxy acid. Data points are mean of three independent trials performed in triplicates. These were automatically generated using the CompuSyn software (Paramus, NJ, USA)

Table 1. Combination Index (CI) and Dose reduction index (DRI) to assess the degree of drug combination using the CompuSyn Software. The table lists the dose combinations that were evaluated along with the effects they had, affected fractions (Fa) and matching CI and DRI values

Effect (Fa)	Dose of CBZ (μM)	Dose of 6-ECDCA (μM)	CI Value	DRI for CBZ	DRI for 6-ECDCA
0.25	0.00683	1.77	1.02	2.474	1.608
0.45	0.01680	4.87	0.70	3.018	2.189
0.5	0.02054	6.11	0.74	3.155	2.346
0.75	0.06178	21.02	0.54	4.023	3.422
0.95	0.39293	167.58	0.32	6.051	6.452

The 6-ECDCA acts as an Adjuvant to reduce the effective dose of the chemotherapeutic potential of CBZ

After combining CBZ with 6-ECDCA, the Dose-Reduction Index (DRI), which assesses how many times a single drug's dose can be decreased when administered in combination, was determined. As shown in figure 3, the CompuSyn analyses for the prostate cancer cells line indicating that both CBZ and 6-ECDCA had an inhibitory effect, and that the combination treatment was superior to a single-drug treatment. Furthermore, the DRI plot revealed that both drugs had a DRI value over 1, However, the dosage reduction in CBZ was greater than that in 6-ECDCA, indicating that 6-ECDCA may help reduce the adverse effects of CBZ. Interestingly, the CBZ+ 6-EDCA group at all concentrations exhibit a higher dose-reduction index >1. For prostate cancer cells (PC-3 cells), single CBZ and 6-EDCA showed dose reductions of 2.47 and 1.6 times at Fa of 0.25. While at Fa = 0.5, the DRI were 3.1 and 2.3 for CBZ and 6-ECDCA, respectively (table 1).

Morphological Comparison between Prostate cancer Cells upon Exposure to 6-ECDCA, CBZ and 6-ECDCA /CBZ Co-Treatment

In the control group, a 0.5 % exposure to DMSO causes prostate cancer cells (PC-3 cells) to display a typical morphological pattern (figure 4, i). The CBZ group, on the other hand, was shown to negatively affect cells as evidenced by low density of the cells and shrinkage of the cells (figure 4, ii), whereas in the combined therapy of 8 μM 6-ECDCA and 20 nM CBZ substantially triggered cell death as evidenced by the rise in the number of dead and de-attached cells (figure 4, iv). Following the combined therapy, The PC-3 cells demonstrated the typical phenotypic signs of apoptosis, such as cell shrinkage, cellular blebbing, and the creation of apoptotic bodies (figure 4, iv).

DISCUSSION

The most effective anticancer drug for the treatment of naive and metastatic prostate cancer is Cabazitaxel [21]. Its effectiveness was however reduced by the rapid evolution of resistance and systemic toxicity [3]. Pre-

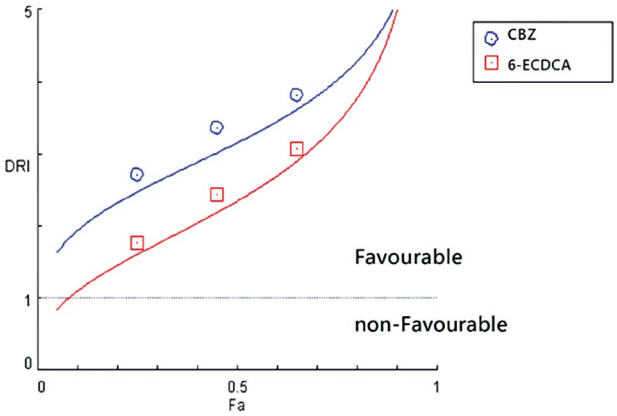


Figure 3. The DRI of the CBZ and 6-ECDCA drug combinations is illustrated, the DRI value >1 indicated favorable drug combinations, while DRI less than 1 indicating unfavorable combination. Data obtained via CompuSyn analysis

clinical findings suggest that combining innovative agent with conventional therapies proposes new advantages effective therapeutic approach for overcoming toxicity by lowering the effective dose and reduce or interruption the initiation of drug resistance [5, 22–24]. Based on effectiveness and acceptable toxicity, a number of promising agents are developing with a possible impact in Cabazitaxel-based combos for enhancing therapeutic outcomes [1, 4, 20]. In line with this, the present study was designed to investigate the cytotoxic effectiveness of the combination of the semisynthetic bile acid analogue 6-ECDCA and Cabazitaxel in Androgen independent prostate cancer cells (PC-3). Our study demonstrated that 6-ECDCA, when combined with Cabazitaxel, produce concentration dependent cytotoxic effect in the PC-3 cells. Indeed, combinations of Cabazitaxel with 6-ECDCA revealed CI values ≤1 (revealing of additive and synergistic interactions). Furthermore, Cabazitaxel alone did not totally caused complete PC-3 cell death even at concentrations greater than 8-folds above their corresponding IC_{50} values, while combinations of Cabazitaxel with 6-ECDCA caused complete eradication of PC-3 cells at much lower concentrations. Consistent with that, the combination of Cabazitaxel and 6-ECDCA at submaximal lower dose by 6- folds (DRI = 6) of each one produced a greater reduction in PC-3 cell viability (95 % cell death) than treatment with either agent alone. A DRI value of more than 1 is of important importance because it signifies therapeutic advantage under circumstances in which the dose of any particular component of combinative drugs is reduced to reduce the adverse effects caused by cytotoxicity in normal cells. According to morphological examination, 6-ECDCA and CBZ together triggered apoptotic- cell death in prostate cancer cells, which was evident by the presence of distinct apoptotic characteristic features such as cell shrinkage, cells de-attachment, and presence of apoptotic bodies [25, 26]. Theoretically, combination therapy with therapeutic agents that are found to be efficient as monotherapy in

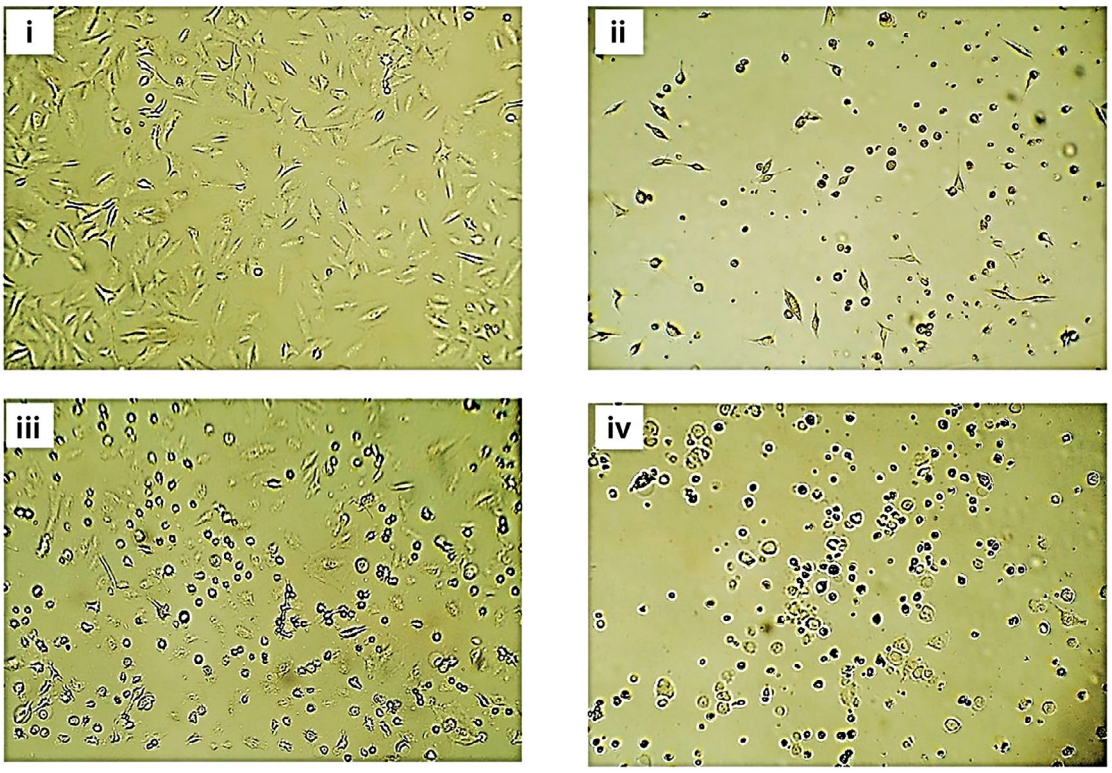


Figure 4. Effects of 6-ECDCA and CBZ alone or in combination on the morphology of prostate cancer cells (PC-3) (i) 0.05 percent DMSO is added to the culture medium, (ii) 20 nM CBZ, (iii) 8 nM 6-ECDCA, or (iv)20 nM CBZ plus 8 μM 6-ECDCA are all used to treat PC-3 cells. Phase contrast microscopy was used to evaluate the cellular morphology of PC-3 cells at a magnification of 40x (scale 80 μm)

the clinic should show good therapeutic effects without further toxicity at lower drug dosages [21]. One of the advantages of combination chemotherapy is improved patient compliance due to decrease in the number [27, 28] and resistance [29, 30]. The most interesting observation emerging from our data was 6-ECDCA which have been used safely in many patients against primary cholangitis [6, 31] it inhibited prostate cancer cell growth ,migration and induce apoptosis by inhibiting Cyclin D_1 and MMP-9 expression while it induced PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [17]. According to a different study, 6-ECDCA had a strong inhibitory effect on the JAK2/STAT3 pathway by upregulating SOCS3 expression in colon cancer cells [32]. These findings confirm those of earlier studies, as ECDCA also found to inhibit the production of regulated gene products involved in angiogenesis (VEGF), invasion (MMP-9), proliferation (cyclin D1, c-Myc, and COX-2), and antiapoptosis (Bcl-2, Bcl-xL, and XIAP) [33–35]. A more recent study reported that enhancement of PI3K/AKT signaling was related to castration-refractory and Docetaxel resistant castration resistant prostate cancer [36–38]. From the literature, it can be resolved that, the anticancer effects of 6-ECDCA may also mediated by preventing the PI3K/AKT/ABCG2 signaling pathway- mediated chemotherapeutic resistance [39]. In further support of these findings, 6-ECDCA has previously been shown to as a suppressor for the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in different cancer models [35, 40, 41]. Recent studies have reported that prostate cancer cells are more sensitive when the PI3K/AKT and/or EMT pathways are blocked [42, 43]. Taken together, these findings suggest that the 6-ECDCA resensitize prostate cancer cells that are resistant to CBZ and caused a highly decreases in cell viability.

CONCLUSION

In conclusion, our results show for the first time that 6-ECDCA increased cabazitaxel-mediated cytotoxicity. Combination index (CI) analysis showed that simultaneous administration of 6-ECDCA and Cabazitaxel was able to exert strong synergistic effect on PC-3 at all doses tested. This approach allows the use of a much less dose of cabazitaxel and might be a new therapeutic option for prostate cancer and possibly other types of cancer with perhaps lower chemoresistance potential and less side effects.

REFERENCES

1. Erdogan S., Serttas R., Turkekul K., Dibirdik I. The synergistic anticancer effect of salinomycin combined with cabazitaxel in CD44+ prostate cancer cells by downregulating wnt, NF-κB and AKT signaling. *Mol Biol Rep*. 2022;49(6):4873–4884.
2. Ebner B., Chaloupka M., Berg E., Stief C. G., Kretschmer A., Herlemann A. Prostate cancer: When to treat, which treatment options by stage? *MMW Fortschr Med*. 2021;163(7):36–40.
3. Vrignaud P., Semiond D., Benning V., Beys E., Bouchard H., Gupta S. Preclinical profile of cabazitaxel. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:1851–1867.

4. Mukhtar E., Adhami V. M., Siddiqui I. A., Verma A. K., Mukhtar H. Fisetin Enhances Chemotherapeutic Effect of Cabazitaxel against Human Prostate Cancer Cells. Mol Cancer Ther. 2016;15(12): 2863–2874.
5. Bansal D., Reimers M. A., Knoche E. M., Pachynski R. K. Immunotherapy and Immunotherapy Combinations in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(2).
6. Zhang Y., Jiang R., Zheng X., Lei S., Huang F., Xie G., Kwee S., Yu H., Farrar C., Sun B., Zhao A., Jia W. Ursodeoxycholic acid accelerates bile acid enterohepatic circulation. *Br J Pharmacol*. 2019;176(16):2848–2863. DOI: 10.1111/bph.14705.
7. Duan W. J., Jia J. D. Research advances in primary biliary cholangitis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2017;25(11):801–804.
8. Di Ciaula A., Wang D. Q., Molina-Molina E., Lunardi Baccetto R., Calamita G., Palmieri V. O., Portincasa P. Bile Acids and Cancer: Direct and Environmental-Dependent Effects. *Ann Hepatol*. 2017;16(Suppl. 1: s3–105.):s87–s105. DOI: 10.5604/01.3001.0010.5501.
9. Liu X., Wang Y. An overview of bile acid synthesis and its physiological and pathological functions. *Yi Chuan*. 2019;41(5):365–374.
10. Garcia M., Thirouard L., Sedès L., Monrose M., Holota H., Caira F., Volle D. H., Beaudoin C. Nuclear Receptor Metabolism of Bile Acids and Xenobiotics: A Coordinated Detoxification System with Impact on Health and Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3630. DOI: 10.3390/ijms19113630.
11. Pellicciari R., Fiorucci S., Camaioni E., Clerici C., Costantino G., Maloney P. R., Morelli A., Parks D. J., Willson T. M. 6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem*. 2002;45(17):3569–3572. DOI: 10.1021/jm025529g.
12. Cariello M., Peres C., Zerlotin R., Porru E., Sabbà C., Roda A., Moschetta A. Long-term Administration of Nuclear Bile Acid Receptor FXR Agonist Prevents Spontaneous Hepatocarcinogenesis in Abcb4. *Sci Rep*. 2017;7(1):11203. DOI: 10.1038/s41598-017-11549-7.
13. Di Ciaula A., Wang D. Q.-H., Molina-Molina E., Baccetto R. L., Calamita G., Palmieri V. O., Portincasa P. Bile Acids and Cancer: Direct and Environmental-Dependent Effects. *Ann Hepatol*. 2017;16(Suppl. 1: s3–105):s87–s105. DOI: 10.5604/01.3001.0010.5501.
14. Wang W., Zhan M., Li Q., Chen W., Chu H., Huang Q., Hou Z., Man M., Wang J. FXR agonists enhance the sensitivity of biliary tract cancer cells to cisplatin via SHP dependent inhibition of Bcl-xL expression. *Oncotarget*. 2016;7(23):34617–34629. DOI: 10.18632/oncotarget.8964.
15. Yu J., Yang K., Zheng J., Zhao W., Sun X. Correction: Synergistic tumor inhibition of colon cancer cells by nitazoxanide and obeticholic acid, a farnesoid X receptor ligand. *Cancer Gene Ther*. 2022;29(6):871–872.
16. Ohno T., Shirakami Y., Shimizu M., Kubota M., Sakai H., Yasuda Y., Kochi T., Tsurumi H., Moriwaki H. Synergistic growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells by acyclic retinoid and GW4064, a farnesoid X receptor ligand. *Cancer letters*. 2012;323(2):215–222. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.04.015.
17. Al-khfajy W. S., Arif I. S., Al-sudani B. T. Synergistic effect of obeticholic acid and fasting-mimicking on proliferative, migration, and survival signaling in prostate cancer. *Pharmacia*. 2022;69(2):579–587.
18. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6).
19. Chou T.-C., Rideout D. C. Synergism and antagonism in chemotherapy. San Diego: Academic Press; 1991. xvi. 752 p.
20. Carbonetti G., Converso C., Clement T., Wang C., Trotman L. C., Ojima I., Kaczocha M.. Docetaxel/cabazitaxel and fatty acid binding protein 5 inhibitors produce synergistic inhibition of prostate cancer growth. *Prostate*. 2020;80(1):88–98. DOI: 10.1002/pros.23921.
21. Achard V., Putora P. M., Omlin A., Zilli T., Fischer S. Metastatic Prostate Cancer: Treatment Options. *Oncology*. 2022;100(1):48–59.
22. Lee S. T., Wong P. F., Hooper J. D., Mustafa M. R. Alpha-tomatine synergises with paclitaxel to enhance apoptosis of androgen-independent human prostate cancer PC-3 cells in vitro and in vivo. *Phytomedicine*. 2013;20(14):1297–1305.
23. Li X., Lao Y., Zhang H., Wang X., Tan H., Lin Z., Xu H. The natural compound Guttiferone F sensitizes prostate cancer to starvation induced apoptosis via calcium and JNK elevation. *BMC cancer*. 2015;15:254. DOI: 10.1186/s12885-015-1292-z.
24. Tran L. N. K., Kichenadasse G., Sykes P. J. Combination Therapies Using Metformin and/or Valproic Acid in Prostate Cancer: Possible Mechanistic Interactions. *Curr Cancer Drug Targets*. 2019;19(5):368–381.
25. Darzynkiewicz Z., Traganos F. Measurement of apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 1998;62:33–73.
26. Martelli A. M., Zweyer M., Ochs R. L., Tazzari P. L., Tabellini G., Narducci P., Bortul R. Nuclear apoptotic changes: an overview. *J Cell Biochem*. 2001;82(4):634–646. DOI: 10.1002/jcb.1186.
27. Aljubran A., Leighl N., Pintilie M., Burkes R. Improved compliance with adjuvant vinorelbine and cisplatin in non-small cell lung cancer. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2009;2(1):265-71.
28. Lee J. J., Chu E. Adherence, Dosing, and Managing Toxicities With Trifluridine/Tipiracil (TAS-102). *Clin Colorectal Cancer*. 2017;16(2):85–92.
29. Pfeiffer P., Yilmaz M., Möller S., Zitnjak D., Krogh M., Petersen L. N., Poulsen L. Ø., Winther S. B., Thomsen K. G., Qvortrup C. TAS-102 with or without bevacizumab in patients with chemorefractory metastatic colorectal cancer: an investigator-initiated, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(3):412–420.
30. Negri M., Gentile A., de Angelis C., Montò T., Patalano R., Colao A., Pivonello R., Pivonello C. Vitamin D-Induced Molecular Mechanisms to Potentiate Cancer Therapy and to Reverse Drug-Resistance in Cancer Cells. *Nutrients*. 2020;12(6):1798. DOI: 10.3390/nu12061798.
31. Nevens F., Andreone P., Mazzella G., Strasser S. I., Bowlus C., Invernizzi P., Drenth J. P. H., Pockros P. J., Regula J., Beuers U., Trauner M., Jones D. E., Floreani A., Hohenester S., Luketic V., Shiffman M., van Erpecum K. J., Vargas V., Vincent C., Hirschfield G. M., Shah H., Hansen B., Lindor K. D., Marschall H.-U., Kowdley K. V., Hooshmand-Rad R., Marmon T., Sheeron S., Pencek R., MacConell L., Pruzanski M., Shapiro D. A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *N Engl J Med*. 2016;375(7):631–643. DOI: 10.1056/NEJMoa1509840.
32. Li S., Xu Z., Guo J., Zheng J., Sun X., Yu J. Farnesoid X receptor activation induces antitumour activity in colorectal cancer by suppressing JAK2/STAT3 signalling via transactivation of SOCS3 gene. *J Cell Mol Med*. 2020;24(24):14549–14560.
33. Attia Y. M., Tawfiq R. A., Ali A. A., Elmazar M. M. The FXR Agonist, Obeticholic Acid, Suppresses HCC Proliferation & Metastasis: Role of IL-6/STAT3 Signalling Pathway. *Sci Rep*. 2017;7(1):12502.
34. Han C. Y. Update on FXR Biology: Promising Therapeutic Target? *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):2069. DOI: 10.3390/ijms19072069.
35. Lv B., Ma L., Tang W., Huang P., Yang B., Wang L., Chen S., Gao Q., Zhang S., Xia J. FXR Acts as a Metastasis Suppressor in Intrahepatic Cholangiocarcinoma by Inhibiting IL-6-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(1):158–172. DOI: 10.1159/000491715.
36. Braglia L., Zavatti M., Vinceti M., Martelli A. M., Marmiroli S. Deregulated PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling in prostate cancer: Still a potential druggable target? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(9):118731.
37. Kosaka T., Miyajima A., Shirotake S., Suzuki E., Kikuchi E., Oya M. Long-term androgen ablation and docetaxel up-regulate phosphorylated Akt in castration resistant prostate cancer. *J Urol*. 2011;185(6):2376–2381.
38. Yasumizu Y., Miyajima A., Kosaka T., Miyazaki Y., Kikuchi E., Oya M. Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 sensitizes docetaxel in castration resistant prostate cancer. *J Urol*. 2014;191(1):227–234.
39. Wang L., Lin N., Li Y. The PI3K/AKT signaling pathway regulates ABCG2 expression and confers resistance to chemotherapy in human multiple myeloma. *Oncol Rep*. 2019;41(3):1678–1690.
40. Mao J., Chen X., Wang C., Li W., Li J. Effects and mechanism of the bile acid (farnesoid X) receptor on the Wnt/β-catenin signaling pathway in colon cancer. *Oncol Lett*. 2020;20(1):337–345.
41. Peng Z., Chen J., Drachenberg C. B., Raufman J. P., Xie G. Farnesoid X receptor represses matrix metalloproteinase 7 expression, revealing this regulatory axis as a promising therapeutic target in colon cancer. *J Biol Chem*. 2019;294(21):8529–8542.
42. Duran G. E., Wang Y. C, Francisco E. B., Rose J. C., Martinez F. J., Coller J., Brassard D., Vrignaud P., Sikic B. I. Mechanisms of Resistance to Cabazitaxel. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015;14(1):193–201. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0155.
43. Liu R., Chen Y., Liu G., Li C., Song Y., Cao Z., Li W., Hu J., Lu C., Liu Y. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death & Disease*. 2020;11(9):797.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-59-68
УДК 615.322:615.454.1

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Методология разработки топической трансдермальной системы доставки фукоидана

Е. Д. Облучинская[1], А. Н. Шиков[1, 2]✉, О. Н. Пожарицкая[1]

[1] ФГУН «Мурманский морской биологический институт Российской академии наук» (ММБИ РАН), 183010, Россия, г. Мурманск, ул. Владимирская, д. 17
[2] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

✉ **Контактное лицо:** Шиков Александр Николаевич. **E-mail:** spb.pharmacy@gmail.com

ORCID: Е. Д. Облучинская – https://orcid.org/0000-0003-4456-656X; А. Н. Шиков – https://orcid.org/0000-0003-4351-0695; О. Н. Пожарицкая – https://orcid.org/0000-0003-1061-0665.

Статья поступила: 27.06.2022 **Статья принята в печать:** 12.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Полисахариды морского происхождения являются многообещающими кандидатами для создания инновационных лекарственных средств. Одним из таких соединений является полисахарид фукоидан из бурых водорослей, обладающий антикоагулянтной и противовоспалительной активностью. Создание топических трансдермальных препаратов для лечения хронических заболеваний вен представляет особый интерес, т. к. при адресной доставке действующее вещество в высокой концентрации попадает непосредственно на участок, где требуется воздействие лекарственного средства, при этом риск развития нежелательных побочных эффектов минимален.

Цель. Экспериментально-теоретическое обоснование методологической схемы разработки трансдермальной системы доставки морского полисахарида фукоидана в рамках подхода Quality by Design (QbD) для местной терапии.

Материалы и методы. Использовали субстанцию Фукоидан, выделенную по оригинальной технологии ММБИ РАН из слоевищ фукуса пузырчатого *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря. В работе использовали вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению. Выбор состава вспомогательных веществ трансдермальной системы доставки (ТСД) проводили по плану греко-латинского квадрата 4 × 4 с повторными наблюдениями. В качестве физико-химических показателей оценивали pH водных извлечений ТСД, коллоидную и термическую стабильность. Структурно-механические свойства оптимального состава ТСД определяли на ротационном вискозиметре. Скорость растворения *in vitro* оценивали с использованием метода «мешалка над диском» при температуре 32 ± 0.5 °C.

Результаты и обсуждение. Проведена разработка состава и технологии топической ТСД фукоидана с применением концепции QbD. В результате разработки в качестве топической формы с фукоиданом выбраны состав и технология ТСД фукоидана с содержанием действующего вещества 15 %, обладающий термо- и коллоидной стабильностью, имеющий водородный показатель, приближенный к pH кожи человека. В качестве гелевой основы использован полоксамер 407, в качестве гидрофобной фазы – масло оливковое. Установлено, что отношение полоксамера 407 к водной фазе должно быть не менее 0.1 и не более 0.37; отношение воды к водной фазе должно быть не менее 0.56 и не более 0.69; и полиоксил 40 гидрогенизированное касторовое масло к масляной фазе должно быть не менее 0.34. Определено, что 9 % полоксамера 407 обеспечивает необходимые структурно-механические свойства ТСД. Установлено, что разработанная ТСД фукоидана с полоксамером 407 относится к неньютоновским типам течения с пластическими свойствами и имеет тиксотропность.

Заключение. Проведенный комплекс исследований позволил экспериментально-теоретически обосновать методологическую схему разработки трансдермальной системы доставки морского полисахарида фукоидана в рамках подхода QbD. Методологическая схема учитывает физико-химические и технологические особенности фукоидана и позволяет создать высококачественную ТСД, обеспечивающую стабильность и полное высвобождение действующего вещества.

Ключевые слова: трансдермальная система доставки, фукоидан, качество через разработку, стабильность, многофакторный эксперимент, реологические свойства, профиль высвобождения

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

Вклад авторов. Е. Д. Облучинская осуществила выделение образца и его анализ, обработку данных. А. Н. Шиков произвел дизайн исследования, получение данных. О. Н. Пожарицкая осуществила анализ и интерпретацию данных, обзор публикаций. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания Мурманскому морскому биологическому институту РАН (№ Гос. регистрации 21091600104-7).

Для цитирования: Облучинская Е. Д., Шиков А. Н., Пожарицкая О. Н. Методология разработки топической трансдермальной системы доставки фукоидана. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):59–68. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-59-68

Methodology of the Development of a Topical Transdermal Fucoidan Delivery System

Ekaterina D. Obluchinskaya[1], Alexander N. Shikov[1, 2]✉, Olga N. Pozharitskaya[1]

[1] Murmansk Marine Biological Institute of the RAS, 17, Vladimirskaya str., Murmansk, 183010, Russia
[2] Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexander N. Shikov. **E-mail:** spb.pharmacy@gmail.com

© Облучинская Е. Д., Шиков А. Н., Пожарицкая О. Н., 2023
© Obluchinskaya E. D., Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., 2023

ORCID: Ekaterina D. Obluchinskaya – https://orcid.org/0000-0003-4456-656X; Alexander N. Shikov – https://orcid.org/0000-0003-4351-0695; Olga N. Pozharitskaya – https://orcid.org/0000-0003-1061-0665.

Received: 27.06.2022 **Revised:** 12.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Marine-derived polysaccharides are promising candidates for the development of innovative drugs. One of such compounds is the polysaccharide fucoidan from brown seaweeds, which shows anticoagulant and anti-inflammatory activity. The development of topical transdermal formulation for the treatment of chronic venous diseases is of particular interest, because with targeted delivery, the active compound in high concentration comes directly to the site where the drug is required, while the risk of side effects is minimal.

Aim. Experimental and theoretical justification of the methodological scheme for the development of a transdermal delivery system with fucoidan for local therapy using the Quality by Design (QbD) approach.

Materials and methods. Fucoidan was isolated from the thalli of *Fucus vesiculosus* L. from the Barents Sea according to the original technology of the MMBI RAS. All excipients were approved for medical use. The experiments for rational selection of the excipients for the transdermal delivery system (TSD) were planned using the Greek-Latin square 4 × 4 with repeated observations. The colloidal and thermal stability and pH were evaluated as physicochemical parameters of TSD Structural and mechanical properties of TSD were deter-mined with rotational viscometer. The dissolution rate of fucoidan *in vitro* was evaluated using the paddle-over-disk method at a temperature of 32 ± 0.5 °C.

Results and discussion. The composition and technology of topical TSD цwith fucoidan were developed using the QbD concept. The composition and technology of topical TSD with 15 % of fucoidan as active ingredient were developed. TSD has thermo- and colloidal stability, and has a pH value close to the pH of human skin. Poloxamer 407 was used as a gel base; olive oil was used as a hydrophobic phase. It was found that the ratio of poloxamer 407 to the aqueous phase should be no less than 0.1 and no more than 0.37; the ratio of water to the aqueous phase should not be less than 0.56 and not more than 0.69; and the ratio of polyoxyl 40 hydrogenated castor oil to the oil phase must be at least 0.34. It was found that 9 % poloxamer 407 provides the necessary structural and mechanical properties of TSD. It has been established that the developed TSD of fucoidan with poloxamer 407 belongs to non-Newtonian flow types with plastic properties and has thixotropy.

Conclusion. The complex of studies based on QbD approach led to the experimental and theoretical justification of the methodological scheme for the development of a transdermal delivery system with marine polysaccharide fucoidan. The methodological scheme takes into account the physicochemical and technological features of fucoidan and allows you to create a high-quality TSD that ensures stability and complete release of the active substance.

Keywords: transdermal delivery system, fucoidan, quality by design, stability multifactorial experiment design, rheological properties, release profile

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. Ekaterina D. Obluchinskaya carried out the extraction of the sample and its analysis, data processing. Alexander N. Shikov produced the study design, data acquisition. Olga N. Pozharitskaya carried out the analysis and interpretation of the data, review of publications. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

Funding. This study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the Government Assignment to the Murmansk Marine Biological Institute Russian Academy of Sciences (State Reg. No. 121091600104-7).

For citation: Obluchinskaya E. D., Shikov A. N., Pozharitskaya O. N. Methodology of the development of a topical transdermal fucoidan delivery system. *Drug development & registration*. 2023;12(1):59–68. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-59-68

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в медицине отмечается повышенный интерес к применению водорослей в связи с высоким содержанием в них биологически активных веществ, среди которых особое внимание привлекает фукус пузырчатый (*Fucus vesiculosus* L.). Отличительной особенностью фукуса пузырчатого является сульфатированный полисахарид фукоидан, встречающийся только в бурых водорослях[1].

Проведенные исследования показали, что фукоиданы снижают выраженность окислительного стресса и воспалительной реакции базовых патофизиологических процессов, лежащих в основе большого количества заболеваний. Установлена противовирусная, иммунорегулирующая, противоопухолевая, антикоагулянтная, и другие активности фукоиданов [1,2]. Так, в исследованиях *in vitro* показано, что фукоиданы, полученные из разных видов бурых водорослей, проявляют гепариноподобные антикоагулянтные свойства посредством активации плазматического антитромбина III и ингибирования тромбина, кофактора II гепарина и фактора коагуляции Xa [3]. В работах *in vivo* также были продемонстрированы результаты изучения антикоагулянтной активности фукоидана [3].

Существующие лекарственные препараты, применяемые для лечения заболеваний, связанных с нарушением системы свертывания крови, недостаточно эффективны и безопасны. Для лечения тромбофлебитов и тромбозов широко применяют прямые антикоагулянты (гепарин или низкомолекулярный гепарин –

[1] EMA/661584/2016. Bladderwrack. *Fucus versiculosus* L., thallus. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/fucus. Accessed: 11.10.2022.

например, фраксипарин). Известно, что гепарин имеет противопоказания и побочные действия, в частности в ряде случаев наблюдаются аллергические реакции, остеопороз и тромбоцитопения [4].

Исследования фукоидана, выделенного из фукуса пузырчатого Баренцева моря показали, что он влияет на формирование протромбиназного комплексона за счет блокирующего воздействия на «внутренний» путь коагуляционного гемостаза [5] и не обладает токсичными свойствами [6].

Фармакотерапия хронических заболеваний вен основана, прежде всего, на пероральной и парентеральной терапии. Однако применение адресной доставки действующих веществ представляет особый интерес, так как при топическом (местном) нанесении действующее вещество в высокой концентрации попадает непосредственно на участок, где требуется воздействие лекарственного средства, при этом риск развития нежелательных побочных эффектов минимален. Трансдермальные системы доставки (ТСД) могут эффективно применяться для действующих веществ с большой молекулярной массой, в частности полисахаридов [7, 8].

Современные требования при разработке новых лекарственных препаратов в рамках фармацевтической системы качества применяют принцип системного подхода – качество через разработку (Quality by Design, QbD)[1]. Целью QbD в фармации является лучшее понимание рецептуры и переменных процесса, а также разработка лекарственных препаратов, наилучшим образом соответствующих их назначению [9]. Подход QbD при фармацевтической разработке был введен регулирующими органами в области фармации для создания основы для надежного и эффективного препарата. Использование данного подхода выдвигает на первое место применение методов математического планирования эксперимента.

Целью данной работы являлось экспериментально-теоретическое обоснование методологической схемы разработки трансдермальной системы доставки морского полисахарида фукоидана в рамках подхода Quality by Design для местной терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали субстанцию «Фукоидан», выделенного в ММБИ РАН по запатентованной технологии из слоевищ фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.) Баренцева моря [10]. Фукоидан содержал 79,5 % нейтральных углеводов, основным из которых является фукоза (73,5 мол.%).

В качестве вспомогательных веществ использовали: полоксамер 407 (Kolliphor® P 407), полиоксил 40 гидрогенизированное касторовое масло (полиоксил 40 ГКМ) (Kolliphor® RH 40), полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ-400) (Kollisolv® PEG-400) (BASF, Германия), диэтиленгликоль монометиловый эфир (ДЭМЭ) (Transcutol® P, Gattefossé, Франция), оливковое масло сорта экстра вирджин (Sovena Group, Португалия), метилпарагидроксибензоат (нипагин) и пропилпарагидроксибензоат (нипазол) (ООО «Экохим-Инновации», Россия). Для количественного анализа использовали стандартные образцы: фукозу (Sigma-Aldrich, Германия), кислоту серную концентрированную и L-цистеина гидрохлорид (АО «ВЕКТОН», Россия).

Приготовление образцов

Составы ТСД, содержащие фукоидан, готовили с использованием оливкового масла и дополнительных модифицирующих наполнителей различной природы (таблица 1). Водную и масляную фазы готовили раздельно. Фукоидан, полоксамер 407, нипагин и нипазол растворяли в воде. Липофильные компоненты (полиоксил 40 ГКМ, ПЭГ-400, ДЭМЭ) растворяли в оливковом масле. Обе фазы смешивали при комнатной температуре при перемешивании.

Исследование влияния свойств вспомогательных веществ на технологические свойства проводили с применением плана греко-латинского квадрата 4×4 с повторными наблюдениями (таблица 1). В качестве физико-химических показателей оценивали коллоидную и термическую стабильность (ГОСТ 29188.3-91 «Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии»), pH мази (ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия»).

Оценку скорости высвобождения *in vitro* проводили с использованием метода «мешалка над диском» с использованием тестера для проверки растворимости DT 600 (ERWEKA GmbH, Германия) при температуре $32 \pm 0{,}5$ °C [11], с использованием воды в качестве среды растворения. По истечению заданных промежутков времени (5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 мин) отбирали пробы по 2 мл и фильтровали через фильтр-насадки Phenex PTFE с диаметром пор 0,45 мкм (Phenomenex, США). Объем среды растворения восполняли водой. Анализ содержания фукоидана в среде растворения проводили предварительно валидированным методом спектрофотометрии на UV-1700 mini (Shimadzu, Япония), основанном на определении продуктов реакции фукозы с L-цистеином [12]. Для интерпретации процесса растворения фукоидана использовали: уравнение Higuchi, уравнение кинетики нулевого и первого порядка [11].

Изучение структурно-механических характеристик проводили с использованием ротационного вискозиметра Rheotest RV 2.1 (RHEOTEST Medingen GmbH, Германия) и цилиндрического измерительного устройства (цилиндр/стакан H/H) для образцов с высокой вязкостью. Образцы массой 15 г помещали в измерительный резервуар и термостатировали 15 мин до достижения заданной температуры. Измерение

[1] ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development Step 5. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development. Accessed: 11.10.2022.

проводили при температуре 32 °С (температура кожного покрова голени человека). Измерения начинали с низких значений скоростей сдвига, постепенно повышая последние, регистрируя показания прибора на каждой из 12 ступеней. После достижения максимальной величины касательного напряжения последовательно уменьшали скорость вращения цилиндра [13]. Для оценки типа течения системы и выявления наличия тиксотропных свойств строили графики зависимости средних напряжения сдвига и градиента приложенной скорости, по которым судили о типе течения системы и о наличии тиксотропных свойств.

Свойства получаемых составов ТСД фукоидана оценивали по коллоидной и термической стабильности: 1 – образец расслоился в течение 24 часов; 2 – образец расслоился спустя 1–50 суток; 3 – образец стабилен при хранении.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием программ STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., США) и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе разработки, согласно концепции QbD, должен быть определен профиль целевого качества препарата на основе предварительных знаний. Обобщение литературных и собственных данных позволило сформулировать требования к топическим препаратам, содержащим фукоидан, для лечения заболеваний, связанных с нарушением системы свертывания крови.

Фукоидан, выделенный из *F. vesiculosus*, обладает гепариноподобным и противовоспалительным действием [5] и топический препарат ТСД фукоидана может быть рекомендован для профилактики и лечения тромбофлебита поверхностных вен. Подобные показания к применению подразумевают, что требуется разработка ТСД глубокого (проникающего/резорбтивного) действия, который обеспечил бы всасывание действующего вещества в глубокие слои кожи. В составе подобных топических препаратов, как правило, присутствуют гидрофильные компоненты, гидрофобные компоненты и поверхностно-активные вещества, так как известно, что эмульсионные основы повышают всасывание лекарственных веществ, обеспечивают мягкость и эластичность кожи. Таким образом, для фукоидана представляется оптимальной разработка ТСД на эмульсионной основе [7].

Фукоидан представляет собой субстанцию, хорошо растворимую в воде и нерастворимую в органических растворителях. Учитывая это свойство, введение субстанции в состав ТСД в виде раствора в воде представляется наиболее рациональным.

На терапевтический эффект топических препаратов большое влияние оказывает характер основ, которые отличаются большим разнообразием и способны оказывать существенное влияние на высвобождение действующих веществ. Это обуславливается разнообразием физико-химических свойств как действующих, так и вспомогательных веществ, используемых при разработке ТСД композиции [14].

Содержание фукоидана (15 %) в готовой форме выбрали на основании ранее проведенной работы [15]. В качестве гидрофобной фазы для ТСД выбрали масло оливковое, которое легко проникает через эпидермис кожи, обеспечивая при этом хорошую всасываемость лекарственных веществ [16]. Известно, что фукоидан не образует устойчивых гелей при смешивании с водой. Поэтому требуется добавление других структурообразующих компонентов [17]. В качестве возможных основ предварительно были выбраны и исследованы: гидроксиэтилцеллюлоза, карбопол, синтетический блоксополимер этиленоксида и пропиленоксида (полоксамер 407), ланолин, моностеарат глицерина, твердый жир (смесь моно-, ди- и триглицеридов) и этоксилированный цетилстеариловый спирт. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что использование в составе основы карбопола и гидроксиэтилцеллюлозы не позволяют получить однородный гель при условии содержания в нем 15 % субстанции фукоидана. Введение в состав ланолина, этоксилированного цетилстеарилового спирта и твердого жира приводило к образованию плотной структуры, не обеспечивающей биодоступность фукоидана. В качестве гелеобразующего компонента выбрали полоксамер 407 [18], добавление которого к природным полисахаридам альгинату [19] и гиалуроновой кислоте [20] улучшало реологические свойства гелевых композиций. Полоксамер 407 имеет самую низкую концентрацию гелеобразования и самую простую фазу поведения среди полоксамеров [21]. Введение гиалуроновой кислоты в состав гидрогелей полоксамера 407 не изменяло температуру мицеллообразования и стабилизировало реологические свойства гидрогелей, не оказывая влияния на термообратимые свойства полоксамера [20]. Результаты реологических, калориметрических анализов и высвобождения *in vitro* показали, что введение альгината в состав органогеля на основе олеиновой кислоты и полоксамера 407 позволяет модулировать высвобождение действующего вещества [19]. Для стабилизации эмульсии использовали полиоксил 40 ГКМ, неионогенный эмульгатор, стабилизирующий эмульсии типа масло в воде, и солюбилизатор, способствующий проникновению веществ через роговой слой кожи [22]. Для предотвращения трансэпидермальной потери воды, а также для обеспечения увлажнения кожи, смазки и улучшения проникновения действующих веществ в качестве вспомогательных веществ применяют эмоленты [23], среди которых часто используют ПЭГ-400 [24]. Пассивная диффузия лекарств играет основную роль в трансдермальной доставке лекарств. Ее можно усилить, увеличив концентрацию лекарственного средства в препарате или увеличив проницаемость кожи. С этой целью в их состав включают компоненты, обес-

печивающие проникновение действующих веществ через кожу: активаторы всасывания [14]. Активаторы всасывания обратимо модифицируют структуру рогового слоя и, как следствие, ослабляют его барьерную функцию [25]. В связи с гидрофильными свойствами фукоидана активаторы всасывания были выбраны из группы гидрофильных неионогенных ПАВ, растворимых или смешивающихся с водой. ДЭМЭ привлекателен в качестве усилителя проникновения из-за отсутствия токсичности, биосовместимости с кожей, смешиваемости с полярными и неполярными растворителями и оптимальных солюбилизирующих свойств для некоторых лекарств [26]. Для предотвращения микробной контаминации использовали синергическую смесь нипагина с нипазолом [14].

На втором (исследовательском) этапе, следуя концепции QbD, осуществляли оптимизацию качественного и количественного состава композиции, разработку рациональной технологии, определение показателей качества. Определение структурной вязкости, тиксотропности, механической стабильности на данном этапе позволяет объективно оценивать качество разрабатываемого препарата. В соответствии с планом эксперимента приготовили 16 составов ТСД фукоидана (таблица 1). После чего образцы заложили на хранение в прохладном месте (согласно ОФС.1.1.0010.15 «Хранение лекарственных средств»). За стабильностью образцов наблюдали в течение 3 месяцев.

Шесть образцов после хранения в течение 90 суток имели удовлетворительный внешний вид и представляли собой однородные композиции, мягкой консистенции, коричневого цвета (образцы 3, 4, 5, 7, 9, 10). Остальные составы расслаивались в течение 24 часов хранения или 1–50 суток.

Провели анализ полученных образцов на коллоидную и термическую стабильность при хранении в течение 3 месяцев. По данным дисперсионного анализа установили, что значимое ($p < 0,05$) наибольшее влияние на стабильность образцов ТСД фукоидана имеет полоксамер 407 (50 %), в то время как влияние содержания полиоксил 40 ГКМ и ПЭГ-400 менее выражено (25 %) (рисунок 1). Влияние полоксамера 407 на стабильность представлена на рисунке 2. Установлено, что введение в состав основы полоксамера 407 в концентрации 9 % обеспечивает необходимые структурно-механические ее свойства.

Для изучения влияния вспомогательных веществ на стабильность ТСД разработали алгоритм, учитывающий соотношение компонентов и водной и липофильной фаз, первоначально рассчитали количество компонентов водной и липофильной фаз и относительное содержание компонентов к друг другу. Полученные данные были ранжированы с учетом ста-

Таблица 1. Составы исследуемых образцов ТСД фукоидана (масс.%)

Table 1. Compositions of the samples of transdermal delivery system with fucoidan (mas.%)

№	Полоксамер 407 Poloxamer 407	Масло оливковое Olive oil	Полиоксил 40 ГКМ Polyoxyl 40 hydrogenated castor oil	ПЭГ-400 PEG-400	ДЭМЭ Diethylene glycol monomethyl ether	Нипагин Nipagin	Нипазол Nipazol	Вода Water	Стабильность при хранении* Storage stability*
1	4,5	5	4	2,5	1	0,15	0,05	67,8	1
2	4,5	10	8	5	1	0,15	0,05	56,3	1
3	4,5	15	12	7,5	1	0,15	0,05	44,8	3
4	4,5	20	16	10	1	0,15	0,05	33,3	3
5	9	5	8	7,5	1	0,15	0,05	54,3	3
6	9	10	4	10	1	0,15	0,05	50,8	2
7	9	15	16	2,5	1	0,15	0,05	41,3	3
8	9	20	12	5	1	0,15	0,05	37,8	2
9	13,5	5	12	10	1	0,15	0,05	43,3	3
10	13,5	10	16	7,5	1	0,15	0,05	36,8	3
11	13,5	15	4	5	1	0,15	0,05	46,3	2
12	13,5	20	8	2,5	1	0.15	0,05	39,8	2
13	18	5	16	5	1	0,15	0,05	39,8	1
14	18	10	12	2,5	1	0,15	0,05	41,3	1
15	18	15	8	10	1	0,15	0,05	32,8	1
16	18	20	4	7,5	1	0,15	0,05	34,3	1

Примечание. * 1 – образец расслоился в течение 24 часов; 2 – образец расслоился в течение 1–50 суток; 3 – образец стабилен при хранении в течение 90 суток.

Note. * 1 – the sample is stable for less than 24 hours; 2 – the sample is stable for 1–50 days; 3 – the sample is stable during storage for 90 days.

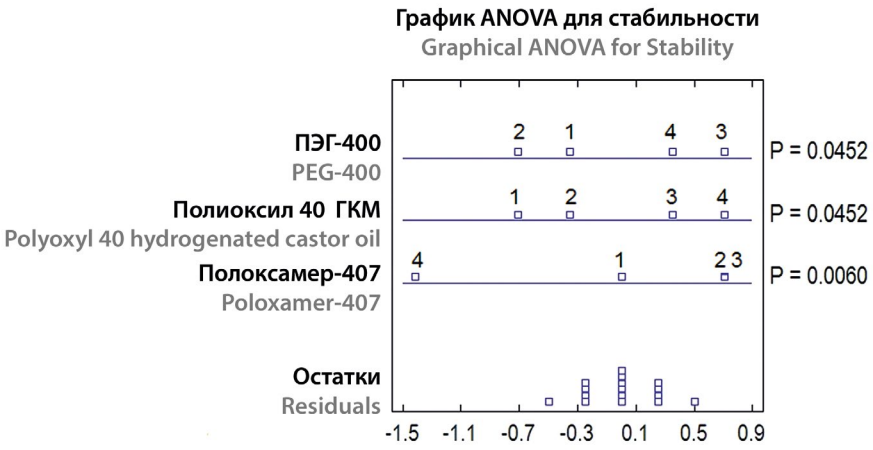


Рисунок 1. **Графическое представление данных дисперсионного анализа**

Figure 1. **Graphical representation of ANOVA data**

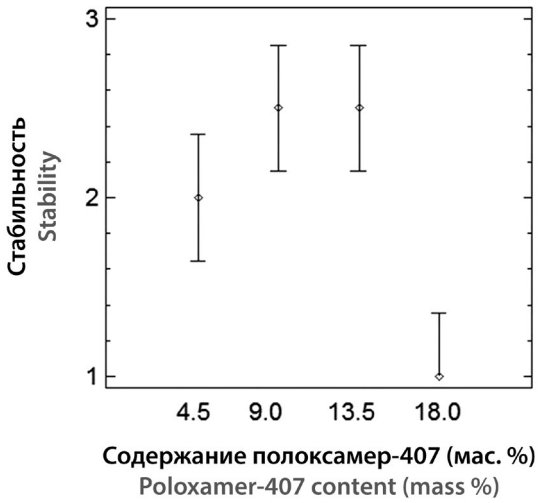


Рисунок 2. **Средние значения параметра стабильность и 95%-е доверительные интервалы для четырех уровней фактора содержание полоксамера 407.**

*** 1 – образец расслоился в течение 24 часов; 2 – образец расслоился в течение 1–50 суток; 3 – образец стабилен при хранении в течение 90 суток**

Figure 2. **Mean values of stability and 95 % confidence intervals for four levels of the poloxamer 407 content.**

*** 1 – the sample delaminated within 24 hours; 2 – the sample delaminated within 1–50 days; 3 – the sample is stable during storage for 90 days**

бильности максимального относительного содержания каждого компонента к минимальному.

На основании полученных данных установили, что для обеспечения стабильности ТСД фукоидана требуется соблюдение следующих условий:

1. Отношение полоксамера 407 к водной фазе должно быть не менее 0,1 и не более 0,37 (объясняет расслоение образцов 1, 2, 13–16).
2. Отношение воды к водной фазе должно быть не менее 0,56 и не более 0,69 (объясняет расслоение образцов 1, 2, 13–16).
3. Отношение полиоксил 40 ГКМ к масляной фазе должно быть не менее 0,34 (объясняет расслоение образцов 6, 8, 11, 12).

Образцы № 3, 4, 5, 7, 9 и 10 далее проанализировали на коллоидную и термическую стабильность и определили их pH (таблица 2).

Таблица 2. **Физико-химическая характеристика образцов ТСД фукоидана**

Table 2. **Physic-chemical characteristics of the samples of transdermal delivery system with fucoidan**

№ образца Sample №	Термическая стабильность Thermal stability	Коллоидная стабильность Colloidal stability	pH
3	Не стабильный Not stable	Стабильный Stable	4,12
4	Не стабильный Not stable	Стабильный Stable	4,25
5	Не стабильный Not stable	Не стабильный Not stable	4,34
7	Стабильный Stable	Стабильный Stable	5,26
9	Стабильный Stable	Стабильный Stable	4,71
10	Стабильный Stable	Стабильный Stable	4,87

Образцы 7, 9 и 10 были проанализированы в тесте «Растворение» (рисунок 3) и определены их структурно-механические характеристики (рисунок 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что высвобождение фукоидана из образца 7 протекает интенсивно в течение первого часа эксперимента, к 60 минуте высвобождается практически 100 % действующего вещества. Высвобождение фукоидана из образцов 9 и 10 не превышало 50 % за это же время. Линеаризация кривых высвобождения фукоидана из образца № 7 ТСД в координатах: количество лекарст-

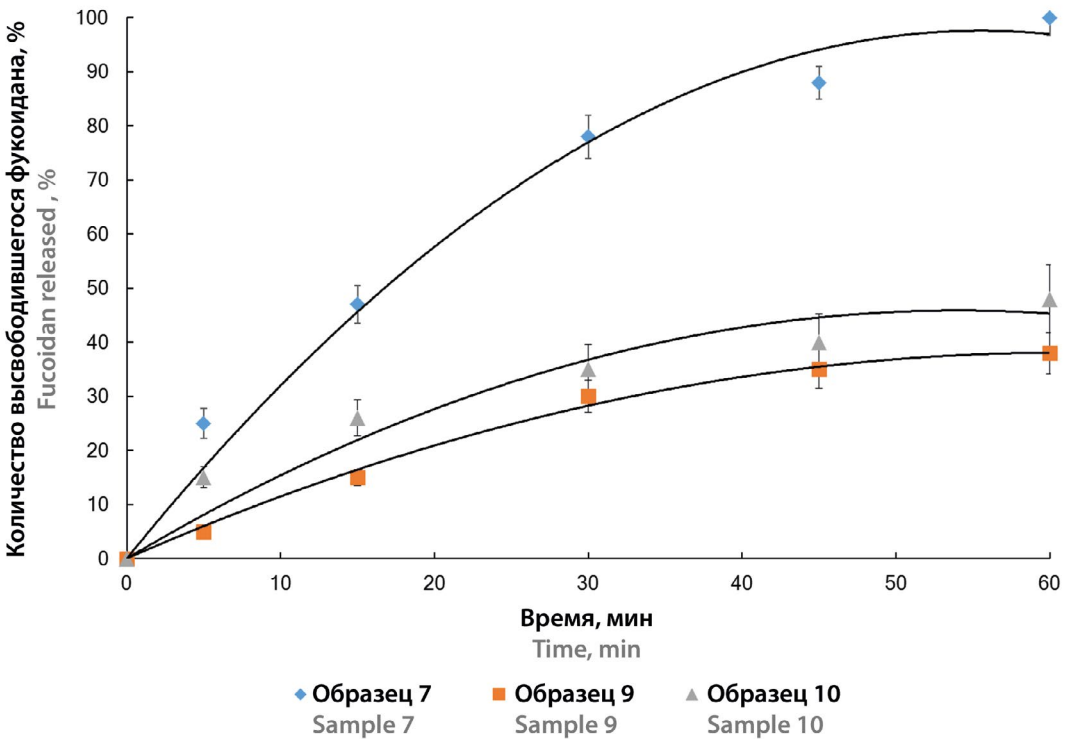


Рисунок 3. **Профиль высвобождение фукоидана из ТСД**

Figure 3. **Release profile of fucoidan from of transdermal delivery system**

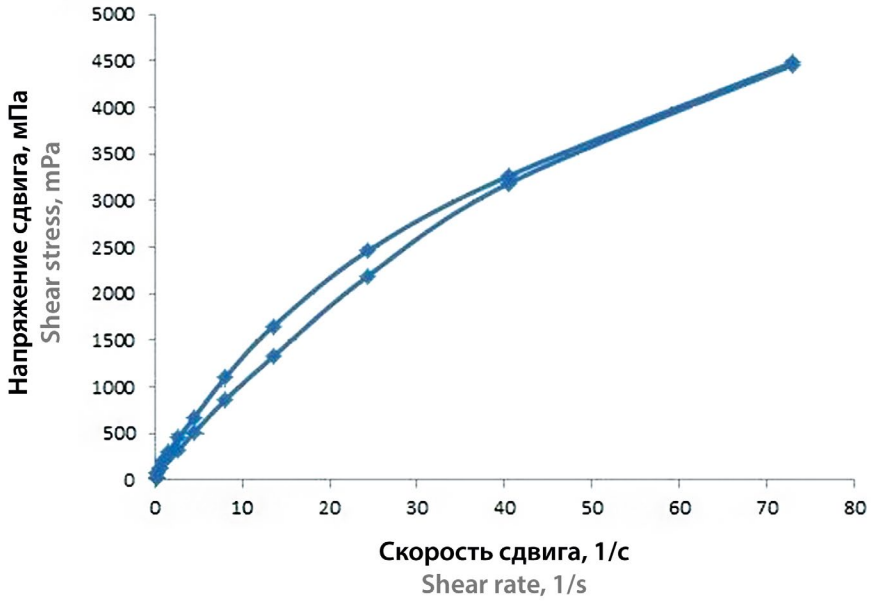


Рисунок 4. **Реограмма течения ТСД фукоидана**

Figure 4. **Flow rheogram of transdermal delivery system with fucoidan**

венного вещества, перешедшего в раствор, – корень квадратный от времени (R^2 0.9903) позволяет предположить, что высвобождение действующего вещества протекает путем диффузии. Таким образом, скорость высвобождения фукоидана описывается теоретической моделью Higuchi [11]. Водородный показатель образца 7 приближен к pH кожи человека (см. таблица 2).

При дальнейшей оценке реологических характеристик ТСД выявили, что у образцов № 9 и 10 невоз-

можно снять показания из-за густой консистенции. На основании полученных результатов провели расчет величин предельного напряжения сдвига и эффективной вязкости, построили зависимость напряжения сдвига от скорости сдвига (см. рисунок 4).

Как видно из данных рисунка 4, образец № 7 относится к неньютоновским типам течения и обладает пластическими свойствами. Восходящая кривая (см. рисунок 4) отражает процесс разрушения системы под влиянием механических воздействий. Нисходящая кривая демонстрирует сохранение остаточной деформации после разрушения структуры, что свидетельствует о наличии пластично-вязких и тиксотропных свойств образца № 7. Наличие петли гистерезиса свидетельствует о наличии в структуре системы тиксотропных свойств [27].

В результате проведенных исследований создали методологическую схему разработки ТСД фукоидана на основе подхода QbD (рисунок 5). Данная методологическая схема учитывает физико-химические и технологические особенности фукоидана и позволяет создать высококачественную ТСД, обеспечивающую стабильность и полное высвобождение действующего вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая специфические свойства фукоидана, он может быть применен в качестве альтернативы прямым антикоагулянтам (гепарину и т. п.) широко используемых в терапии тромбофлебитов и тромбозов. Для обеспечения глубокого (проникающего/резорбтивного) действия фукоидана разработана ТСД. Обобщив данные литературы и результаты собственных ранее проведенных исследований выбрали вспомогательные вещества для ТСД. В соответствии с принципом QbD, методом математического планирования эксперимента с последующим дисперсионным анализом, установили значимость влияния концентраций вспомогательных веществ на стабильность ТСД

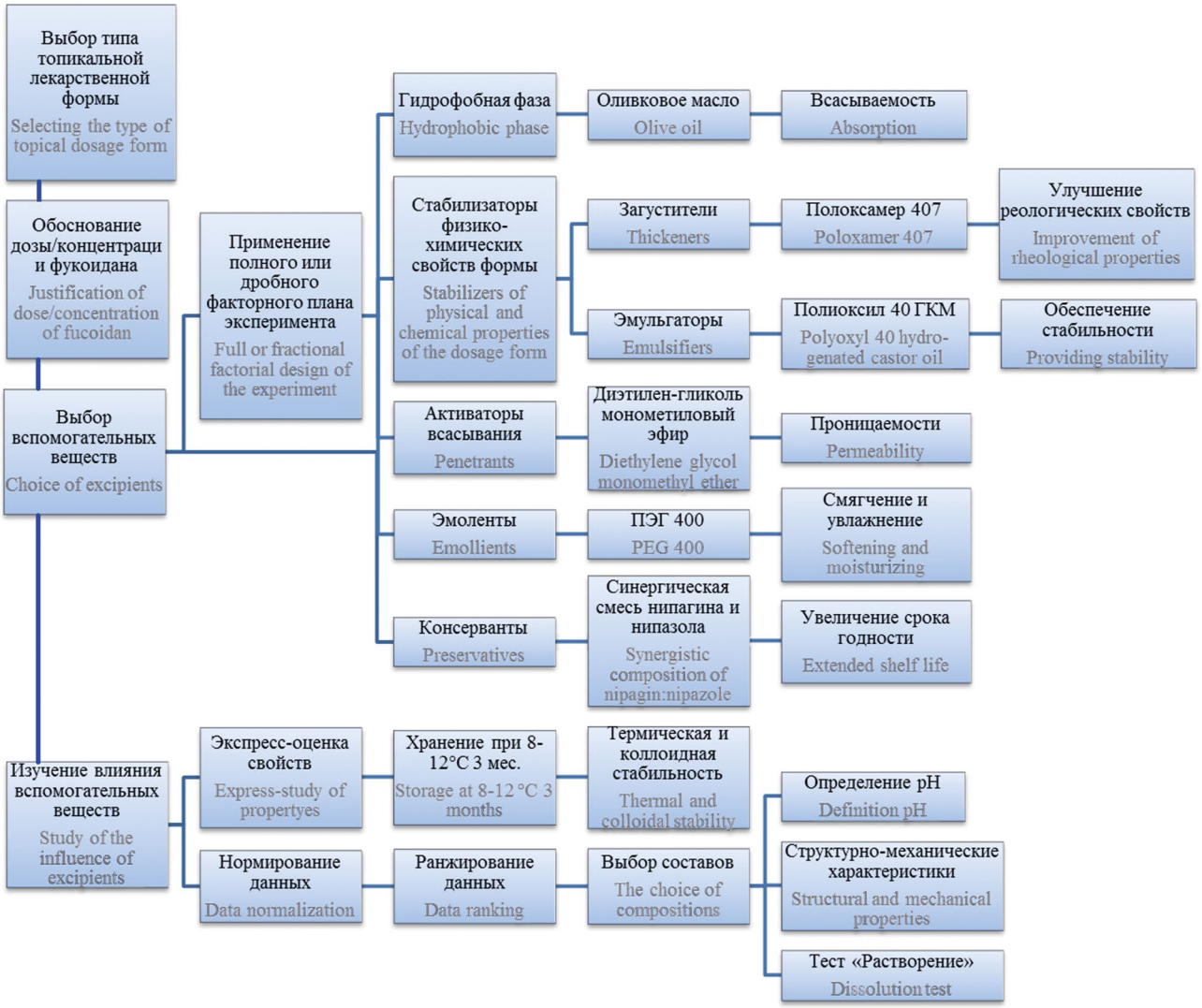


Рисунок 5. Методологическая схема разработки ТСД фукоидана

Figure 5. Methodology of development of transdermal delivery system with fucoidan

при хранении. Тесты на термическую и коллоидную стабильность выявили три наиболее устойчивых образца ТСД. Последующий тест на высвобождение фукоидана из ТСД и изучение реологических свойств привело к выбору оптимального состава трансдермальной системы доставки фукоидана. В результате проведения комплекса исследований экспериментально-теоретически обоснована методологическая схема разработки трансдермальной системы доставки морского полисахарида фукоидана в рамках подхода Quality by Design.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fitton J. H., Stringer D. N., Park A. Y., Karpiniec S. S. Therapies from fucoidan: New developments. *Mar Drugs.* 2019;17(10):571. DOI: 10.3390/md17100571.
2. Tanna B., Mishra A. Nutraceutical potential of seaweed polysaccharides: Structure, bioactivity, safety, and toxicity. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019;18(3):817–831. DOI: 10.1111/1541-4337.12441.
3. Wang Y., Xing M., Cao Q., Ji A., Liang H., Song S. Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. *Mar. Drugs*. 2019;17(3):183. DOI: 10.3390/md17030183.
4. Voskoboinik A., Butcher E., Sandhu A., Nguyen D. T., Tzou W., Della Rocca D. G., Natale A., Zado E. S., Marchlinski F. E., Aguilar M., Sauer W., Tedrow U. B., Gerstenfeld E. P. Direct thrombin inhibitors as an alternative to heparin during catheter ablation: A multicenter experience. *Clin Electrophysiol.* 2020;6(5):484–490. DOI: 10.1016/j.jacep.2019.12.003.
5. Pozharitskaya O. N., Obluchinskaya E. D., Shikov A. N. Mechanisms of bioactivities of fucoidan from the brown seaweed *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Mar Drugs.* 2020;18(5):275. DOI: 10.3390/md18050275.
6. Шараф А. Х., Бондарева Е. Д., Крышень К. Л., Пожарицкая О. Н., Облучинская Е. Д., Макарова М. Н. Мутагенные свойства субстанции фукоидана. *Фармация*. 2018;67(3):46–51. DOI: 10.29296/25419218-2018-03-09.
7. Порембская О. Я. Топические средства для лечения хронических заболеваний вен. *Состав как основа эффективности*. *Flebologia*. 2020;14(4):322–327. DOI: 10.17116/flebo202014041322.
8. Barbosa A. I., Coutinho A. J., Costa Lima S. A., Reis S. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: Fucoidan and chitosan as key players in the drug delivery match field. *Mar Drugs*. 2019;17(12):654. DOI: 10.3390/md17120654.
9. Yu L. X. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharm. Res.* 2008;25(4):781–791. DOI: 10.1007/s11095-007-9511-1.
10. Облучинская Е. Д. Сухой экстракт фукуса, способ его получения и антикоагулянтная мазь на его основе. Патент РФ на изобретение № RU 2506089 C1. 10.02.2014. Доступно по: https://www.freepatent.ru/patents/2506089. Ссылка активна на 11.10.2022.
11. Fotaki N., Klein S., editors. In vitro drug release testing of special dosage forms. Hoboken: John Wiley & Sons; 2019. 312 p.
12. Косман В. М., Облучинская Е. Д., Пожарицкая О. Н., Макарова М. Н., Шиков А. Н. Сквозная стандартизация субстанции фукоидана и препаратов на ее основе. *Фармация*. 2017; 66(6):20–24.
13. Мустафин Р. А., Насыбуллина Н. М., Поцелуева Л. А. Исследование реологических свойств лекарственных форм мелоксикама для наружного применения. *Успехи современного естествознания*. 2010;1:11–14.
14. Семкина О. А., Джавахян М. А., Левчук Т. А., Гагулашвили Л. И., Охотникова В. Ф. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов). *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;39(9):45–48.
15. Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Obluchinskaya E. D., Vuorela H. The pharmacokinetics of fucoidan after topical application to rats. *Mar Drugs.* 2019;17(12):687. DOI: 10.3390/md17120687.
16. Viljoen J. M., Cowley A., Du Preez J., Gerber M., Du Plessis J. Penetration enhancing effects of selected natural oils utilized in topical dosage forms. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(12):2045–2054. DOI: 10.3109/03639045.2015.1047847.
17. Venkatesan J., Bhatnagar I., Kim S.-K. Chitosan-Alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Mar Drugs*. 2014;12(1):300–316. DOI: 10.3390/md12010300.
18. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Демина Н. Б. Обзор современных гелеобразователей в технологии лекарственных форм. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(9):39–46.
19. Querobino S. M., de Faria N. C., Vigato A. A., da Silva B. G., Machado I. P., Costa M. S., Costa F. N., de Araujo D. R., Alberto-Silva C. Sodium alginate in oil-poloxamer organogels for intravaginal drug delivery: Influence on structural parameters, drug release mechanisms, cytotoxicity and in vitro antifungal activity. *Mater. Sci. Eng. C*. 2019;99:1350–1361. DOI: 10.1016/j.msec.2019.02.036.
20. Nascimento M. H. M., Franco M. K. K. D., Yokaichyia F., De Paula E., Lombello C. B., De Araujo D. R. Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: Influence on physico-chemical properties and structural requirements for sustained drug-release. *Int. J. Biol. Macromolecules*. 2018;111:1245–1254. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.064.
21. Ramya K. A., Kodavaty J., Dorishetty P., Setti M., Deshpande A. P. Characterizing the yielding processes in pluronic-hyaluronic acid thermoreversible gelling systems using oscillatory rheology. *J Rheol*. 2019;63(2):215–228. DOI: 10.1122/1.5045073.
22. Pandey A., Mittal A., Chauhan N., Alam S. Role of surfactants as penetration enhancer in transdermal drug delivery system. *J. Mol. Pharm. Org. Process Res*. 2014;2(2):113. DOI: 10.4172/2329-9053.1000113.
23. Dragicevic N., Maibach H. I., editors. Percutaneous penetration enhancers drug penetration into/through the skin. Berlin: Springer Nature; 2017. 869 p.
24. Савельева К. Р., Андреевичева Т. Ю., Персанова Л. В., Остапюк О. А., Поляков С. В., Шестаков В. Н. Разработка технологии и методов контроля бифункциональной мази. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(4):50–54.
25. Williams A. C., Barry B. W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004;56(5):603–618. DOI: 10.1016/j.addr.2003.10.025.
26. Hadgraft J., Lane M. E. Advanced topical formulations (ATF). *Int. J. Pharm*. 2016;514(1):52–57. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.065.
27. Молохова Е. И., Сорокина Ю. В., Липин Д. Е. Оптимизация состава мази с фитоэкдистероидами серпистена. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):89–95. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-89-95.

REFERENCES

1. Fitton J. H., Stringer D. N., Park A. Y., Karpiniec S. S. Therapies from fucoidan: New developments. *Mar Drugs*. 2019;17(10):571. DOI: 10.3390/md17100571.
2. Tanna B., Mishra A. Nutraceutical potential of seaweed polysaccharides: Structure, bioactivity, safety, and toxicity. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019;18(3):817–831. DOI: 10.1111/1541-4337.12441.
3. Wang Y., Xing M., Cao Q., Ji A., Liang H., Song S. Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. *Mar. Drugs*. 2019;17(3):183. DOI: 10.3390/md17030183.
4. Voskoboinik A., Butcher E., Sandhu A., Nguyen D. T., Tzou W., Della Rocca D. G., Natale A., Zado E. S., Marchlinski F. E., Aguilar M., Sauer W., Tedrow U. B., Gerstenfeld E. P. Direct thrombin inhibitors as an alternative to heparin during catheter ablation: A multicenter experience. *Clin Electrophysiol.* 2020;6(5):484–490. DOI: 10.1016/j.jacep.2019.12.003.
5. Pozharitskaya O. N., Obluchinskaya E. D., Shikov A. N. Mechanisms of bioactivities of fucoidan from the brown seaweed *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Mar Drugs*. 2020;18(5):275. DOI: 10.3390/md18050275.
6. Sharaf A. Kh., Bondareva E. D., Kryshen K. L., Pozharitskaya O. N., Obluchinskaya E. D., Makarova M. N. Mutagenic properties of the substance fucoidan. *Pharmacy.* 2018;67(3):46–51. (In Russ.) DOI: 10/29296/25419218-2018-03-09.
7. Porembskaya O. Ya. Topical agents for the treatment of chronic venous diseases. Composition as the basis of efficiency. *Flebologia*. 2020;14(4):322–327. (In Russ.) DOI: 10.17116/flebo202014041322.
8. Barbosa A. I., Coutinho A. J., Costa Lima S. A., Reis S. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: Fucoidan and chi-

tosan as key players in the drug delivery match field. *Mar Drugs*. 2019;17(12):654. DOI: 10.3390/md17120654.
9. Yu L. X. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharm. Res*. 2008;25(4):781–791. DOI: 10.1007/s11095-007-9511-1.
10. Obluchinskaya E. D. Dry fucus extract, method for preparing it, and base anticoagulant ointment. Patent RUS № 2506089 C1. 10.02.2014. Available at https://www.freepatent.ru/patents/2506089. Accessed 11.10.2022. (In Russ.)
11. Fotaki N., Klein S., editors. In vitro drug release testing of special dosage forms. Hoboken: John Wiley & Sons; 2019. 312 p.
12. Kosman V. M., Obluchinskaya E. D., Pozharitskaya O. N., Makarova M. N., Shikov A. N. Through standardization of the substance fucoidan and its based preparations. *Pharmacy*. 2017;66(6):20–24. (In Russ.)
13. Mustafin R. A., Nasibullina N. M., Potselueva L. A. Examination of rheological properties of meloxicam dosages forms for outward application. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya*. 2010;1:11–14. (In Russ.)
14. Semkina O. A., Dzhavakhyan M. A., Gagulashvili L. I., Okhotnikova V. F., Levchuk T. A. Auxiliary substances used in technology of soft medicinal forms: ointments, gels, liniments, and creams. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2005;39(9):497–499. (In Russ.) DOI: 10.1007/s11094-006-0008-8.
15. Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Obluchinskaya E. D., Vuorela H. The pharmacokinetics of fucoidan after topical application to rats. *Mar Drugs*. 2019;17(12):687. DOI: 10.3390/md17120687.
16. Viljoen J. M., Cowley A., Du Preez J., Gerber M., Du Plessis J. Penetration enhancing effects of selected natural oils utilized in topical dosage forms. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(12):2045–2054. DOI: 10.3109/03639045.2015.1047847.
17. Venkatesan J., Bhatnagar I., Kim S.-K. Chitosan-Alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering. *Mar Drugs*. 2014;12(1):300–316. DOI: 10.3390/md12010300.
18. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Demina N. B. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(9):627–634. (In Russ.) DOI: 10.1007/s11094-015-1342-5.
19. Querobino S. M., de Faria N. C., Vigato A. A., da Silva B. G., Machado I. P., Costa M. S., Costa F. N., de Araujo D. R., Alberto-Silva C. Sodium alginate in oil-poloxamer organogels for intravaginal drug delivery: Influence on structural parameters, drug release mechanisms, cytotoxicity and in vitro antifungal activity. *Mater. Sci. Eng. C*. 2019;99:1350–1361. DOI: 10.1016/j.msec.2019.02.036.
20. Nascimento M. H. M., Franco M. K. K. D., Yokaichyia F., De Paula E., Lombello C. B., De Araujo D. R. Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: Influence on physico-chemical properties and structural requirements for sustained drug-release. *Int. J. Biol. Macromolecules*. 2018;111:1245–1254. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.064.
21. Ramya K. A., Kodavaty J., Dorishetty P., Setti M., Deshpande A. P. Characterizing the yielding processes in pluronic-hyaluronic acid thermoreversible gelling systems using oscillatory rheology. *J Rheol*. 2019;63(2):215–228. DOI: 10.1122/1.5045073.
22. Pandey A., Mittal A., Chauhan N., Alam S. Role of surfactants as penetration enhancer in transdermal drug delivery system. *J. Mol. Pharm. Org. Process Res*. 2014;2(2):113. DOI: 10.4172/2329-9053.1000113.
23. Dragicevic N., Maibach H. I., editors. Percutaneous penetration enhancers drug penetration into/through the skin. Berlin: Springer Nature; 2017. 869 p.
24. Saveleva K. R., Andreevicheva T. Y., Persanova L. V., Ostapyuk O. A., Polyakov S. V., Shestakov V. N. Development of technology and methods of control of bifunctional ointment. *Drug development & registration*. 2017;(4):50–54. (In Russ.)
25. Williams A. C., Barry B. W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2004;56(5):603–618. DOI: 10.1016/j.addr.2003.10.025.
26. Hadgraft J., Lane M. E. Advanced topical formulations (ATF). *Int. J. Pharm*. 2016;514(1):52–57. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.05.065.
27. Molokhova E. I., Sorokina Yu. V., Lipin D. E. Optimization of the composition of the ointment with phytoecdysteroids serpisten. *Drug Development & Registration*. 2021;10(4):89–95. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-89-95.

IPhEB

Международная выставка и форум
по фармацевтике и биотехнологиям

Санкт-Петербург – лучшее место для бизнеса

11–13 апреля 2023

Санкт-Петербург, Экспофорум, павильон Н

gotoipheb.ru



11 стран

3000+ посетителей

100+ экспонентов

Международное событие для участников фармацевтического и смежных рынков (БАД и здоровое питание)

признанная платформа для встречи с ведущими фармацевтическими компаниями со всего мира на одной площадке

Поддержка:

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА

СПХФУ с 1919 года на службе науке и здоровью нации

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

Организатор:

РЕСТЭК® выставочное объединение

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-70-75
УДК 615.456; 615.277.3

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Получение водорастворимой формы гидрофобного производного индолокарбазола с использованием комплекса солюбилизаторов

А. П. Колпаксиди[1, 2]✉, М. В. Дмитриева[1], Л. Л. Николаева[1, 2], О. Л. Орлова[1], И. И. Краснюк[2]

[1] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина) 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 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:** Колпаксиди Александр Павлович. **E-mail:** aleksandrkolpaksidi@gmail.com

ORCID: А. П. Колпаксиди – https://orcid.org/0000-0001-9388-1019; М. В. Дмитриева – https://orcid.org/0000-0001-6740-5692;
Л. Л. Николавева – https://orcid.org/0000-0001-8003-8241; О. Л. Орлова – https://orcid.org/0000-0002-4558-0083; И. И. Краснюк – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Статья поступила: 14.02.2022 **Статья принята в печать:** 23.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. ЛХС-1269 – производное индолокарбазола, обладающее высокой противоопухолевой активностью. В связи с гидрофобными свойствами активной субстанции для получения инъекционной лекарственной формы (ЛФ) требуется использование органических сорастворителей – диметилсульфоксида (ДМСО) и этилового спирта. Однако включение органических растворителей в состав ЛФ несет потенциальный риск возникновения побочных эффектов в результате применения препарата.

Цель. Подбор композиции вспомогательных веществ для получения водного раствора гидрофобного производного индолокарбазола, позволяющей максимально снизить концентрацию органических растворителей в составе ЛФ.

Материалы и методы. Объект исследования – активная субстанция ЛХС-1269 серии 010320, произведенная в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Для получения модельных составов применяли следующие вспомогательные вещества: Kollidon® 17 PF, Kollisolv® PEG-400, Kolliphor® P 188, Montanox™ 20, ДМСО ч.д.а., спирт этиловый 95 % ФС.2.1.0036.15, спирт бензиловый х.ч., вода для инъекций ФС.2.2.0019.18. Для отвешивания ЛХС-1269 и вспомогательных веществ использованы весы аналитические OHAUS Analytical Plus AP100S и весы лабораторные AND DL-120. Растворение и смешивание компонентов проводили на магнитной мешалке IKA® C-MAG HS 4.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования были получены и оценены 2 группы модельных композиций, включающих в качестве солюбилизатора комплекс из двух и более вспомогательных веществ. Первая группа составов содержала ДМСО в концентрации 5 % и этиловый спирт в концентрациях от 0 до 15 %. Композиции второй группы включали ДМСО от 0 до 4 %. В результате установлено, что добавление 5 % Kolliphor® P 188 в состав раствора позволяет снизить содержание спирта этилового до 5 %. При этом при дальнейшем снижении содержания этанола наблюдается помутнение раствора и выпадение осадка. Уменьшения концентрации ДМСО в ЛФ до 2 % удалось добиться путем использования комбинации 20 % этанола и комплекса солюбилизаторов – Kollidon® 17 (20 %), Kollisolv® PEG-400 (20 %) и Kolliphor® P 188 (5 %). При этом полное растворение активной субстанции без ДМСО наблюдалось при компенсации данного органического растворителя путем введения дополнительных вспомогательных веществ – Montanox™ 20 (5 %) и бензола (2 %).

Заключение. В результате проведенных исследований подобраны композиции вспомогательных веществ из класса солюбилизаторов, позволяющих получить водный раствор гидрофобного соединения ЛХС-1269 с минимальной концентрацией органических растворителей.

Ключевые слова: гидрофобное производное индолокарбазола, ЛХС-1269, лекарственная форма, органический растворитель, солюбилизаторы, ДМСО, спирт этиловый

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

Вклад авторов. А. П. Колпаксиди, М. В. Дмитриева и Л. Л. Николаева осуществили проведение экспериментов, планирование и написание статьи. О. Л. Орлова сделала дизайн и организацию исследования. И. И. Краснюк осуществил дизайн исследования, проверку окончательной версии статьи.

Финансирование. Грант Президента РФ МК-366.2022.3 «Создание инновационного отечественного лекарственного препарата из класса производных индолокарбазола, обладающего мультитаргетным противоопухолевым и антиагиогенным действием».

Для цитирования: Колпаксиди А. П., Дмитриева М. В., Николаева Л. Л., Орлова О. Л., Краснюк И. И. Получение водорастворимой формы гидрофобного производного индолокарбазола с использованием комплекса солюбилизаторов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):70–75. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-70-75

Obtaining a Water-soluble Form of Hydrophobic Indolelocarbazole Derivative Using Solubilizer Complex

Alexander P. Kolpaksidi[1, 2]✉, Maria V. Dmitrieva[1], Lyudmila L. Nikolaeva[1, 2], Olga L. Orlova[1], Ivan I. Krasniuk[2]

[1] FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, 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 P. Kolpaksidi. **E-mail:** aleksandrkolpaksidi@gmail.com

© Колпаксиди А. П., Дмитриева М. В., Николаева Л. Л., Орлова О. Л., Краснюк И. И., 2023
© Kolpaksidi A. P., Dmitrieva M. V., Nikolaeva L. L., Orlova O. L., Krasniuk I. I., 2023

ORCID: Alexander P. Kolpaksidi – https://orcid.org/0000-0001-9388-1019; Maria V. Dmitrieva – https://orcid.org/0000-0001-6740-5692;
Lyudmila L. Nikolaeva – https://orcid.org/0000-0001-8003-8241; Olga L. Orlova – https://orcid.org/0000-0002-4558-0083; Ivan I. Krasniuk – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Received: 14.02.2022 **Revised:** 23.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. LHS-1269 is an indolocarbazole derivative with high antitumor activity. Due to the hydrophobic properties of the active substance, the use of organic co-solvents – dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethanol – is required to obtain an injectable dosage form (DP). However, the inclusion of organic solvents in the composition of the DF carries a potential risk of side effects as a result of the use of the drug.

Aim. Selection of auxiliary substances for obtaining an aqueous solution of hydrophobic indolecarbazole derivative, which allows minimizing the concentration of organic solvents in the composition of DF.

Materials and methods. The object of the study is the active substance LHS-1269 series 010320, produced in the Chemical Synthesis Laboratory of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. The following auxiliary substances were used to obtain model compositions: Kollidon® 17 PF, Kollisolv® PEG-400, Kolliphor® P 188, Montanox™ 20, DMSO (p.a.), ethanol 95 % (standardized according to pharmacopoeia quality standard ФС.2.2.0019.18 of The State Pharmacopoeia of the Russian Federation). Analytical scales OHAUS Analytical Plus AP 100S and laboratory scales AND DL-120 were used for weighing LHS-1269 and auxiliary substances. The dissolution and mixing of the components was carried out on an IKA® C-MAG HS 4 magnetic stirrer.

Results and discussion. In the course of the study, 2 groups of model compositions were obtained and estimated, comprising a complex of two or more auxiliary substances as a solubilizer. The first group of formulations contained DMSO at a concentration of 5 % and ethanol at concentrations from 0 to 15 %. The compositions of the second group included DMSO from 0 to 4 %. As a result, it was found that the addition of 5 % Kolliphor® P 188 to the composition of the solution reduces the content of ethanol to 5 %. In this case, with further decrease in ethanol, turbidity of the solution and precipitation are observed. Reducing the concentration of DMSO in the DF to 2 % was achieved by using a combination of 20 % ethanol and solubilizer complex – Kollidon® 17 (20 %), Kollisolv® PEG-400 (20 %) and Kolliphor® P 188 (5 %). In this case, the total dissolution of the active substance without DMSO was observed when compensating for the organic solvent by introducing additional auxiliary substances – Montanox™ 20 (5 %) and benzene (2 %).

Conclusion. As a result of the research, the compositions of the auxiliary substances of solubilizers are selected, allowing to obtain an aqueous solution of the hydrophobic compound LHS-1269 with a minimum concentration of organic solvents.

Keywords: hydrophobic derivative of indolocarbazole, LHS-1269, dosage form, organic solvent, solubilizers, DMSO, ethanol

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 P. Kolpaksidi, Maria V. Dmitrieva and Lyudmila L. Nikolaeva carried out the experiments, planning and writing of the article. Olga L. Orlova made the design and organization of research. Ivan I. Krasniuk carried out the design of the study, checking the final version of the article.

Funding. Grant of the President of the Russian Federation MK-366.2022.3 «Creation of an innovative domestic drug from the class of indolocarbazole derivatives with multi-target antitumor and antiagiogenic effect».

For citation: Kolpaksidi A. P., Dmitrieva M. V., Nikolaeva L. L., Orlova O. L., Krasniuk I. I. Obtaining a water-soluble form of hydrophobic indolelocarbazole derivative using solubilizer complex. *Drug development & registration*. 2023;12(1):70–75. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-70-75

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДМСО	диметилсульфоксид.
ЛФ	лекарственная форма.
ЛВ	лекарственное вещество.
DMSO	dimethyl sulfoxide.
DP	dosage form.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на обширные исследования в области обнаружения и разработки противоопухолевых препаратов, показатель успешности их внедрения в течение многих лет оставался стабильно низким. Установлено, что только 1 из 5000–10 000 потенциальных противоопухолевых препаратов получает одобрение FDA, и лишь 5 % из поступающих на I фазу клинических испытаний препаратов утверждаются в конечном итоге. Одной из причин такого высокого числа отказов для новых противоопухолевых препаратов является их плохая фармакокинетика, которая в значительной степени связана с нерастворимостью активной субстанции в воде. Было подсчитано, что низкую растворимость в воде имеют около 75 % новых кандидатов на разработку лекарственного препарата, большая часть из которых являются противоопухолевыми препаратами [1].

В НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России было синтезировано гидрофобное гликозидное производное индолокарбазола ЛХС-1269 – N-{12-(β-D-ксилопиранозил)-5,7-диоксоиндоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-6-ил}пиридин-2-карбоксамид) (рисунок 1), обладающее высокой противоопухолевой активностью в отношении ряда асцитных и солидных форм опухолей, а также антиангиогенным действием [2–3]. С учетом растворимости активной субстанции разработана лекарственная форма (ЛФ) ЛХС-1269 в виде концентрата для приготовления раствора для инъекций, которая содержит в качестве вспомогательных веществ органические растворители диметилсульфоксид (ДМСО) и спирт этиловый 95 % и солюбилизатор Kollidon® 17 в массовом соотношении ЛХС-1269/ДМСО/этанол/Kollidon® 1/11/32/40 [4]. Получение ЛФ нераствори-

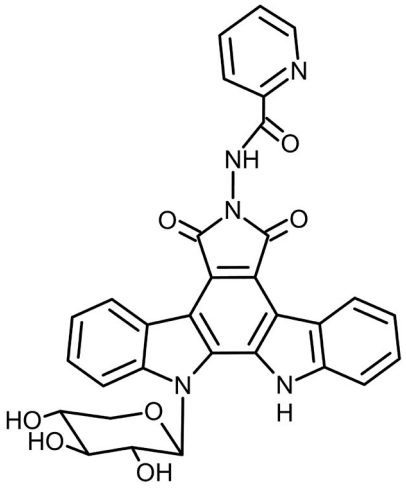


Рисунок 1. Структурная формула ЛХС-1269 [3]

Figure 1. Structural formula of LCS-1269 [3]

мых в воде ЛВ с использованием сорастворителей является одним из старейших и широко используемых технологических подходов, особенно для жидких составов, предназначенных для перорального и внутривенного введения. За счет добавления сорастворителей снижается диэлектрическая проницаемость, что способствует повышению солюбилизации неполярных молекул [5, 6]. Однако повышение растворимости – не единственный критерий использования органических растворителей, так как их потенциальная токсичность является одним из ключевых факторов, ограничивающим их применение в фармацевтической промышленности [7]. Поэтому весьма актуальной задачей на этапе разработки водорастворимой формы гидрофобного ЛВ является подбор солюбилизирующей композиции, позволяющей максимально снизить концентрацию органических растворителей или полностью исключить их из состава ЛФ.

Цель настоящей работы заключалась в подборе композиции вспомогательных компонентов для получения водного раствора исследуемого гидрофобного ЛВ, позволяющей максимально снизить концентрацию органических растворителей или полностью исключить их из состава ЛФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и реактивы: субстанция ЛХС-1269 серии 010320 (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России); Kollidon® 17 PF (BASF, Германия), Kolliphor® P 188 BIO (BASF, Германия), Kollisolv® PEG-400 (BASF, Германия), Montanox™ 20 (SEPPIC, Франция); вода для инъекции ФС.2.2.0019.18, ДМСО ч.д.а. (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), спирт этиловый 95 % ФС.2.1.0036.15 (ООО «Гиппократ», Россия), бензиловый спирт х.ч. (АО «ЭКОС-1», Россия).

Оборудование. Весы лабораторные DL-120 (AND, Япония), весы аналитические OHAUS Analytical Plus AP100S (OHAUS Corporation, США), магнитная мешалка IKA® C-MAG HS 4 (IKA Werke GmbH & Co. KG, Германия), система получения воды для инъекций УВОИ-МФ-1812 (АО «НПК МЕДИАНА-ФИЛЬТР», Россия).

Методы. При приготовлении модельных растворов исследуемого производного индолокарбазола использованы методы взвешивания, солюбилизации, растворения и фильтрации. Более подробно технология получения раствора ЛХС-1269 представлена в разделе «Результаты и обсуждение».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для увеличения растворимости труднорастворимых или практически нерастворимых в воде ЛВ используют вспомогательные вещества из группы солюбилизаторов, которые улучшают их смачиваемость и водопроницаемость. Таким образом, солюбилизаторы дают возможность получать ЛФ с высокоэффективными ЛВ, обладающих гидрофобными свойствами. Способность этих соединений к солюбилизации зависит от различных факторов: природы ЛВ, типа и количества солюбилизатора, температуры и др. При разработке состава водорастворимой формы ЛХС-1269 в качестве солюбилизаторов исследовали различные вещества и их смеси: Kollidon® 17 – низкомолекулярный повидон, Kollisolv® PEG-400 – полимер этиленгликоля; Kolliphor® P 188 – полоксамер, блоксополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена; Montanox™ 20 – оксиэтилированный сорбитан. Также в качестве сорастворителя в некоторых моделях использовали спирт бензиловый в концентрации 2 %, обладающий хорошей растворяющей способностью, умеренной токсичностью, высокой стабильностью и свойствами консерванта.

Разработка составов водного раствора ЛХС-1269 с низкой концентрацией спирта этилового

Спирт этиловый в различных концентрациях широко применяется в производстве настоек, экстрактов и ЛФ для наружного применения, в качестве комплексного растворителя в ЛФ для парентерального применения, а также может выполнять функцию консерванта[1] [8]. Ранее нами было показано [4], что присутствие этанола в препарате в концентрации 20 %, используемого в качестве сорастворителя гидрофобной субстанции ЛХС-1269, значительно влияет на процесс лиофилизации раствора. Поэтому на первоначальном этапе проводили подбор вспомогательных веществ из класса солюбилизаторов и их комбинаций в качестве замены спирта этилового с целью

[1] ФС.2.1.0036.15 «Спирт этиловый 95%, 96%». Доступно по: https://pharmacopoeia.ru/fs-2-1-0036-15-spirt-etilovyj-95-96/ Ссылка активна на 06.02.2022.

уменьшения концентрации или исключения из модели инъекционной ЛФ ЛХС-1269 данного органического растворителя. Для этого субстанцию ЛХС-1269 растворяли в ДМСО в массовом соотношении 1:11 (концентрация в смеси 5 %) и добавляли рассчитанный объем этанола в соответствии с прописями, указанными в таблице 1. Далее при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при скорости вращения элемента 250–300 об/мин вводили исследуемые солюбилизаторы. Образующуюся смесь действующего и вспомогательных веществ доводили водой для инъекций до получения раствора с концентрацией ЛХС 5 мг/мл.

Таблица 1. Концентрации спирта и солюбилизаторов в модельных композициях ЛФ ЛХС-1269

Table 1. Concentrations of ethanol and solubilizers in model compositions of dosage form (DF) LHS-1269

№ модели Model No.	Состав вспомогательных компонентов модели ЛФ Composition of auxiliary components of the DF model		Внешний вид Appearance
	Компонент Component	Концентрация, % Concentration, %	
1	Спирт этиловый Ethanol	15	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Kollidon® 17	10	
	Kollisolv® PEG-400	5	
	Kolliphor® P 188	5	
2	Спирт этиловый Ethanol	15	Прозрачный раствор желтого цвета A transparent yellow solution
	Kollidon® 17	20	
	Kolliphor® P 188	5	
3	Спирт этиловый Ethanol	10	
	Kollidon® 17	20	
	Kolliphor® P 188	5	
4	Спирт этиловый Ethanol	5	
	Kollidon® 17	20	
	Kolliphor® P 188	5	
5	Kollidon® 17	20	Прозрачный раствор желтого цвета, быстро мутнеет A transparent yellow solution that quickly becomes cloudy
	Kolliphor® P 188	5	

Установлено, что добавление Kolliphor® P 188 в концентрации 5 % в состав раствора позволяет снизить содержание спирта этилового до 5 % (модель 4). При приготовлении композиции без этанола (модель 5) первоначально отмечается получение прозрачного раствора. Однако спустя несколько минут полученный раствор мутнеет с образованием осадка и становится вновь прозрачным только при добавлении этанола до общей концентрации 5 %. Таким образом, полное исключение спирта этилового из состава модели ЛФ ЛХС-1269 нецелесообразно.

Разработка составов водного раствора ЛХС-1269 без ДМСО

ДМСО широко используется в качестве универсального растворителя в готовых ЛФ. Следует учитывать, что ДМСО способен проявлять специфическую терапевтическую активность, в частности усиливать противоопухолевый эффект некоторых препаратов. Однако, с присутствием ДМСО в ЛФ различных препаратов могут быть связаны многие проявления токсичности. Основными путями ослабления или предотвращения ДМСО-индуцированной токсичности являются подходы, с помощью которых содержание ДМСО уменьшается или полностью аннулируется: снижение концентрации разными способами, замена растворителя, синтез новых растворителей, не уступающих ДМСО [9].

С учетом вышесказанного на следующем этапе работы готовили растворы ЛХС-1269 с более низкой концентрацией ДМСО или без его использования в качестве растворителя активной субстанции (таблица 2). Для этого активную субстанцию при наличии в составе смешивали с ДМСО (модели 1–3), этанолом (модели 9–13), спиртом бензиловым (модели 4, 6, 8) и при постоянном перемешивании на магнитной мешалке вводили вспомогательные вещества согласно прописям. Образующиеся смеси разводили водой для инъекций до получения раствора с концентрацией ЛХС-1269 5 мг/мл. При отсутствии органических растворителей к навеске ЛХС постепенно добавляли рассчитанные количества солюбизаторов и воду для инъекций.

Таблица 2. Композиции ЛФ ЛХС-1269 с низкой концентрацией ДМСО и без ДМСО

Table 2. Compositions of DF LHS-1269 with a low concentration of DMSO and without DMSO

№ модели Model No.	Состав компонентов модели ЛФ Composition of components of the DF model		Внешний вид Appearance
	Компонент Component	Концентрация, % Concentration, %	
1	ДМСО DMSO	4	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	5	
	Kollidon® 17	20	
	Kolliphor® P 188	5	
2	ДМСО DMSO	4	
	Спирт этиловый Ethanol	5	
	Kollidon® 17	20	
	Kolliphor® P 188	5	

№ модели Model No.	Состав компонентов модели ЛФ Composition of components of the DF model		Внешний вид Appearance
	Компонент Component	Концентрация, % Concentration, %	
3	ДМСО DMSO	2	Прозрачный раствор желтого цвета A transparent yellow solution
	Спирт этиловый Ethanol	20	
	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	20	
	Kolliphor® P 188	5	
4	Спирт бензиловый Benzyl alcohol	2	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Kollidon® 17	11	
	Kollisolv® PEG-400	45	
5	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG 400	10	
	Kolliphor® P 188	5	
6	Спирт бензиловый Benzyl alcohol	2	
	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	10	
	Kolliphor® P 188	5	
7	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	10	
	Montanox™ 20	10	
8	Спирт бензиловый Benzyl alcohol	2	
	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	10	
	Montanox™ 20	10	
9	Спирт этиловый Ethanol	10	
	Спирт бензиловый Benzyl alcohol	2	
	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	10	
	Kolliphor® P 188	5	
	Montanox™ 20	10	
10	Спирт этиловый Ethanol	10	
	Спирт бензиловый Benzyl alcohol	2	
	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	15	
	Kolliphor® P 188	5	
	Montanox™ 20	5	
11	Спирт этиловый Ethanol	15	
	Спирт бензиловый Benzyl alcohol	2	
	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	15	
	Kolliphor® P 188	5	
	Montanox™ 20	5	
12	Спирт этиловый Ethanol	20	Прозрачный раствор желтого цвета A transparent yellow solution
	Спирт бензиловый Benzyl alcohol	2	
	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	15	
	Kolliphor® P 188	5	
	Montanox™ 20	5	
13	Спирт этиловый Ethanol	20	Мутный раствор желтого цвета A cloudy yellow solution
	Спирт бензиловый Benzyl alcohol	2	
	Kollidon® 17	20	
	Kollisolv® PEG-400	15	
	Kolliphor® P 188	5	

В результате было получено и проанализировано 13 модельных составов с различными вариациями комбинаций вспомогательных веществ. Прозрачный водный раствор ЛХС-1269 с более низким содержанием ДМСО (2 %) от первоначального (5 %) получен при использовании композиции 3, включающей 20 % этанол и комплекс солюбилизаторов – Kollidon® 17, Kollisolv® PEG-400 и Kolliphor® P 188. Исключения ДМСО из состава ЛФ удалось добиться при приготовлении раствора активной субстанции по прописи 12, где отсутствие данного органического растворителя компенсировано путем введения дополнительных вспомогательных веществ – Montanox™ 20 (5 %) и бензилового спирта (2 %).

Таким образом, на основе полученных результатов для биологического изучения были отобраны 3 новые композиции ЛФ ЛХС-1269 следующих составов:

Композиция № 1	ЛХС-1269 – 0,5 % ДМСО – 5 % Спирт этиловый – 5 % Kollidon® 17 – 20 % Kolliphor® P 188 – 5 %
Композиция № 2	ЛХС-1269 – 0,5 % ДМСО – 2 % Спирт этиловый – 20 % Kollidon® 17 – 20 % Kollisolv® PEG-400 – 20 % Kolliphor® P 188 – 5 %

Композиция № 3	ЛХС-1269 – 0,5 % Спирт этиловый – 20 % Спирт бензиловый – 2 % Kollidon® 17 – 20 % Kollisolv® PEG-400 – 15 % Kolliphor® P 188 – 5 % Montanox™ 20 – 5 %

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований подобраны модельные комбинации вспомогательных веществ для получения водорастворимой формы гидрофобного производного индолокарбазола ЛХС-1269 с концентрацией активного вещества 5 мг/мл с минимальным содержанием органических растворителей – ДМСО и спирта этилового. Полученные образцы моделей ЛФ переданы для биологических исследований в подразделения научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gala U. H., Miller D. A., Williams R. O. III. Harnessing the therapeutic potential of anticancer drugs through amorphous solid dispersions. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020;1873(1):188319. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188319.
2. Голубева И. С., Еремина В. А., Моисеева Н. И., Эктова Л. В., Яворская Н. П. Производное класса N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионов – N-{12-(β-D-ксилопиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил}пиридин-2-карбоксамид, обладающее цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ на изобретение RU 2667906 C1. 25.09.2018. Доступно по: https://elibrary.ru/item.asp?id=37360265. Ссылка активна на 06.02.2022.
3. Shprakh Z. S., Budko A. A., Kozin D. A., Ektova L. V., Gusev D. V., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V. Development and validation of HPLC method for analysis of indolocarbazole derivative LCS-1269. *Pharmacia.* 2021;68(2):427–431. DOI: 10.3897/pharmacia.68.e63457.
4. Dmitrieva M. V., Kolpaksidi A. P., Orlova O. L., Ignatyeva E. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Krasnyuk I. I. Development of a technology for producing a stable injectable dosage form of a hydrophobic indolocarbazole derivative. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(6):232–235. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i6.42685.
5. Kalepu S., Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):442–453. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.07.003.
6. Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Дмитриева М. В., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Лаврухин Н. И., Бунятян Н. Д. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(2):52–59.
7. Cysewski P., Przybyłek M., Rozalski R. Experimental and theoretical screening for green solvents improving sulfamethizole solubility. *Materials (Basel).* 2021;14(20):5915. DOI: 10.3390/ma14205915.
8. Олефир Ю. В, Хубиева А. Ю, Ковалева Е. Л., Митькина Л. И., Стружкова А. А., Савин Е. В. Обеспечение качества этилового спирта как лекарственного средства. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(1):6–18. DOI: 10.30895/1991-2919-2020-10-1-6-18.
9. Galvao J., Davis B., Tilley M., Normando E., Duchen M. R., Cordeiro M. F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 2014;28(3):1317–1330. DOI: 10.1096/fj.13-235440.

REFERENCES

1. Gala U. H., Miller D. A., Williams R. O. III. Harnessing the therapeutic potential of anticancer drugs through amorphous solid dispersions. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020;1873(1):188319. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188319.
2. Golubeva I. S., Eremina V. A., Moiseeva N. I., Ektova L. V., Yavorskaya N. P. A derivative of the N-glycoside class of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-5,7-diones – N-{12-(β-D-xylopyranosyl)-5,7-dioxo-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-6-yl}pyridin-2-carboxamide, which has cytotoxic and antitumor activity. Patent RUS RU 2667906 C1. 25.09.2018. Available at: https://elibrary.ru/item.asp?id=37360265. Accessed: 06.02.2022. (In Russ.)
3. Shprakh Z. S., Budko A. A., Kozin D. A., Ektova L. V., Gusev D. V., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V. Development and validation of HPLC method for analysis of indolocarbazole derivative LCS-1269. *Pharmacia.* 2021;68(2):427–431. DOI: 10.3897/pharmacia.68.e63457.
4. Dmitrieva M. V., Kolpaksidi A. P., Orlova O. L., Ignatyeva E. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Krasnyuk I. I. Development of a technology for producing a stable injectable dosage form of a hydrophobic indolocarbazole derivative. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(6):232–235. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i6.42685.
5. Kalepu S., Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):442–453. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.07.003.
6. Gulyakin I. D., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Dmitrieva M. V., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Orlova O. L., Polozkova A. P., Lavrukhin N. I., Bunyatyan N. D. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. *Drug development & registration*. 2016;(2):52–59. (In Russ.)
7. Cysewski P., Przybyłek M., Rozalski R. Experimental and theoretical screening for green solvents improving sulfamethizole solubility. *Materials (Basel).* 2021;14(20):5915. DOI: 10.3390/ma14205915.
8. Olefir Yu. V., Khubieva A. Yu., Kovaleva E. L., Mit'kina L. I., Struzhkova A. A., Savin E. V. Quality control of ethyl alcohol used as a medicinal product. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(1):6–18. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2020-10-1-6-18.
9. Galvao J., Davis B., Tilley M., Normando E., Duchen M. R., Cordeiro M. F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 2014;28(3):1317–1330. DOI: 10.1096/fj.13-235440.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-76-83
УДК 615.074; 615.324

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения подлинности и количественного содержания эноксапарина натрия в инъекционных препаратах методом ВЭЖХ

Е. А. Пшеничнов[1]✉, К. В. Кондрашева[2]

[1] СП ООО «Jurabek Laboratories», 100003, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Алмазар, д. 165
[2] Институт микробиологии академии наук Республики Узбекистан, 100128, Узбекистан, г. Ташкент, ул. А. Кадыри, д. 7Б

✉ **Контактное лицо:** Пшеничнов Егор Александрович. **E-mail:** egor.p@jurabek.uz

ORCID: Е. А. Пшеничнов – https://orcid.org/0000-0003-1893-8876; К. В. Кондрашева – https://orcid.org/0000-0003-3741-7304.

Статья поступила: 24.02.2022 **Статья принята в печать:** 16.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Препараты эноксапарина натрия включены в актуальные протоколы лечения COVID-19. При увеличении объема выпуска таких препаратов лаборатории контроля качества испытывают потребность в доступных и точных методиках идентификации и количественного определения активного вещества в лекарственных средствах. Учитывая, что фармакопейные методы требуют дорогостоящих стандартов, реагентов, недоступных многим лабораториям, разработка более доступного метода позволит ускорить и удешевить процесс контроля качества препаратов, содержащих эноксапарин натрия.

Цель. Разработка и валидация простого, экономичного, точного метода гельпроникающей высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением рефрактометрического детектора для оценки эноксапарина натрия в инъекционных препаратах.

Материалы и методы. Объектом исследования явились образцы субстанции и коммерческих препаратов, содержащих эноксапарин натрия. Определение подлинности и количественного содержания активного вещества проводили методом гельпроникающей ВЭЖХ на хроматографе 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), оснащенном дифференциальным рефрактометрическим детектором.

Результаты и обсуждение. В ходе работы проанализированы стандартные валидационные характеристики: специфичность, линейность, прецизионность и правильность метода. Анализ данных показал высокую специфичность и пригодность разработанной методики критериям приемлемости для хроматографических систем. Метод рекомендован к использованию для рутинного контроля готовых лекарственных средств или полупродукта, содержащих от 25 до 200 мг/мл эноксапарина натрия.

Заключение. Разработанный метод является пригодным для использования в рутинном контроле качества инъекционных препаратов, содержащих эноксапарин натрия в качестве действующего вещества.

Ключевые слова: эноксапарин натрия, гельпроникающая ВЭЖХ, подлинность, количественное определение, валидация

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

Вклад авторов. Е. А. Пшеничнов проводил подбор условий хроматографирования, подготовку и анализ образцов, статистическую обработку данных, участвовал в написании и корректировке статьи. К. В. Кондрашева проводила анализ материалов, интерпретацию данных, оформление и корректировку статьи.

Для цитирования: Пшеничнов Е. А., Кондрашева К. В. Разработка и валидация методики определения подлинности и количественного содержания эноксапарина натрия в инъекционных препаратах методом ВЭЖХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):76–83. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-76-83

Development and Validation of Analytical HPLC Method for Identification and Assay of Enoxaparin Sodium in Injectable Preparations

Egor A. Pshenichnov[1]✉, Kseniya V. Kondrasheva[2]

[1] JV «Jurabek Laboratories» Ltd., 165, Almazar str., Tashkent, 100003, Uzbekistan
[2] Institute of Microbiology, 7B, A. Kadyri str., Tashkent, 100128, Uzbekistan

✉ **Corresponding author:** Egor A. Pshenichnov. **E-mail:** egor.p@jurabek.uz

ORCID: Egor A. Pshenichnov – https://orcid.org/0000-0003-1893-8876; Kseniya V. Kondrasheva – https://orcid.org/0000-0003-3741-7304.

Received: 24.02.2022 **Revised:** 16.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Enoxaparin sodium-containing drugs are included in relevant protocols for COVID-19 therapy. An increase in the production volume of such drugs leads to a demand for available and precise methods of identification and quantitative measurement of the active ingredient in the preparations. Considering the fact that pharmacopoeial methods require significant amount of expensive standards and reagents that are unavailable for numerous laboratories, it is relevant to develop a more available method that will accelerate and make cheaper the process of quality control for enoxaparin sodium-containing preparations.

Aim. To develop and validate a simple, economic, and precise method of gel-permeation HPLC with the application of a refractive index detector for the evaluation of enoxaparin sodium in preparations for injection.

© Пшеничнов Е. А., Кондрашева К. В., 2023
© Pshenichnov E. A., Kondrasheva K. V., 2023

Materials and methods. Samples of enoxaparin sodium-containing substances and commercial preparations were studied. The identification and quantitative content of the active ingredient were performed by the method of gel-permeation HPLC using a 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA) chromatograph equipped with a refractive index detector.
Results and discussion. The authors analyzed standard validation characteristics: specificity, linearity, precision, and accuracy of the method. The analysis revealed high specificity and suitability of the proposed method to chromatographic symmetrical multiprocessing systems. The method is recommended for routine control of finished and semi-finished pharmaceutical preparations containing from 25 to 200 mg/ml of enoxaparin sodium-containing.
Conclusion. The proposed method can be used for routine quality control of enoxaparin sodium-containing preparations for injection.

Keywords: enoxaparin sodium, gel permeation HPLC, identification, assay, 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. Egor A. Pshenichnov performed the selection of chromatography conditions and analysis of samples, statistical data processing, participated in writing and correcting the manuscript. Kseniya V. Kondrasheva analyzed the materials, interpreted the data, designed and corrected the manuscript.

For citation: Pshenichnov E. A., Kondrasheva K. V. Development and validation of analytical HPLC method for identification and assay of enoxaparin sodium in injectable preparations. *Drug development & registration*. 2023;12(1):76–83. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-76-83

ВВЕДЕНИЕ

Актуальные на сегодняшний день протоколы лечения заболевания COVID-19, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2[1], включают антикоагулянты прямого действия, в том числе, содержащие в качестве основного действующего вещества (API) эноксапарин натрия[2].

Согласно требованиям Фармакопеи США, подлинность эноксапарина натрия в API и его инъекционных препаратах устанавливается спектрофотометрически, путем определения максимума поглощения; на основании сравнения спектров ^{13}C ЯМР стандартного и испытуемого растворов; по отношению числовых значений активности анти-фактора Xa к активности анти-фактора IIa и определению молекулярной массы методом эксклюзионной хроматографии[3]. Количественное определение рекомендуется проводить фотоколориметрическим методом по образованию окрашенных соединений при взаимодействии хромогенных реагентов с комплексами эноксапарин – фактор свертывания крови Xa и эноксапарин – фактор свертывания крови IIa. Эти методы трудоемки, требуют наличия специального аналитического оборудования и дорогостоящих факторов свертывания крови, недоступных многим лабораториям контроля качества. Кроме этого, спектрофотометрические методы не применимы для препаратов, содержащих вспомогательные вещества, например, бензиловый спирт. Поэтому для испытательных лабораторий фармацевтических предприятий и регуляторных органов необходимо внедрение более доступных, специфичных и универсальных методик идентификации и количественного определения эноксапарина в лекарственных препаратах.

В настоящее время подробно описаны современные способы определения активности гепаринов в зависимости от их молекулярной массы [1], включая коагулометрический и хромогенный методы. Предложен УФ-спектрофотометрический метод количественной оценки эноксапарина натрия по определению анти-Xa и анти-IIa активности в условиях *in vitro* (анализ лекарственного средства) и *in vivo* (анализ плазмы крови кролика) при длине волны 405 нм [2]. А также описана менее затратная по времени и реактивам методика количественного определения непосредственно эноксапарина натрия в растворе. Анализ проводили спектрофотометрически при длине волны 234 нм, но специфичность данного метода не представлена [3].

Учитывая сложную структуру низкомолекулярных гепаринов, был предложен метод масс-спектрометрии для выяснения тонкой структуры веществ [4], что, несомненно, важно во время разработки препаратов-генериков или дополнительного контроля качества нового сырья, но не всегда подходит для рутинного анализа.

[1] Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Available at: https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it. Accessed: 24.03.2022.

[2] Протокол лечения COVID-19 медицинского центра МГУ. Доступно по: http://mc.msu.ru/protokol-COVID-MNOC.pdf. Ссылка активна на 24.03.2022.

[3] USP–NF. Available at: https://www.uspnf.com/ Accessed: 24.03.2022.

Одним из наиболее распространенных и точных методов в современном фармацевтическом анализе является метод хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) и разновидность этого метода – гельпроникающая ВЭЖХ (ГПХ)[1]. Еще в 1991 году Kristensen с соавт. предложил использование данного метода для рутинного определения молекулярной массы и молекулярно-массового распределения низкомолекулярных гепаринов [5]. В последние годы проделано достаточное количество исследований, доказывающих надежность эксклюзионной хроматографии для контроля качества данной группы веществ. Так, Radivojša Matanović с соавт. предлагает простой и достоверный метод для количественного определения интактного гепарина в фармацевтических препаратах [6]. Имеются рекомендации фирмы Agilent для проведения ГПХ-анализа биологических полимеров, например, гепарина[2].

Использование метода ГПХ с детекцией по рефрактометрическому индексу отличается высокой специфичностью за счет возможности оценить молекулярную массу образца эноксапарина и его молекулярно-массовое распределение, а также определить концентрацию исследуемого вещества в растворе, не прибегая к опосредованному методу определения его активности. Специфичность метода позволяет одновременно проводить количественное определение и испытание подлинности анализируемых препаратов, при этом, исключая влияние вспомогательных веществ.

Цель работы. Подбор хроматографических условий и валидация методики определения эноксапарина натрия в водных растворах методом ВЭЖХ для рутинных анализов в лабораториях контроля качества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приборы и оборудование

- Хроматограф высокого давления 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), оснащенный дифференциальным рефрактометрическим детектором.
- Колонка хроматографическая PL aquagel-OH 30 (8 мкм, 300 × 7,5 мм) (Agilent Technologies, США).
- Программное обеспечение OpenLAB CDS ChemStation ver. A.01.04 и Agilent GPC/SEC Software ver. A.02.01 (Agilent Technologies, США).

Реактивы

- Натрия нитрат (Sigma-Aldrich, США, кат. № S5506), натрия фосфат однозамещенный (Supelco Inc., США, кат. № 52074), кислота ортофосфорная (Supelco Inc., США, кат. № 49685), натрия гидроксид (Sigma-Aldrich, США, кат. № S8045), вода очищенная.
- Сертифицированные стандартные образцы для калибровки колонки: декстран 4 (M_w = 3609 г/моль, EDQM D0733000, Batch 2), декстран 10 (M_w = {8800 ÷ 10450} г/моль, EDQM D0734000, Batch 2) и полиэтиленгликоль-1500 (M_w = 1400 г/моль, USP 1546503, Lot. F0F009).

Приготовление подвижных фаз для хроматографии

1. 1000 мл воды очищенной фильтруют через мембранный фильтр с размерами пор 0,45 мкм.
2. 17,0 г натрия нитрата и 1,2 г натрия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и растворяют в 800 мл воды очищенной, доводят pH до 3,0 кислотой ортофосфорной. Полученный раствор доводят водой очищенной до метки, фильтруют через мембранный фильтр с размерами пор 0,45 мкм.
3. 17,0 г натрия нитрата и 1,2 г натрия фосфата однозамещенного помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и растворяют в 800 мл воды очищенной, pH доводят 0,1 М натрия гидроксидом до 7,0. Полученный раствор доводят водой очищенной до метки, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Приготовление растворов стандартных образцов для калибровки колонки

По 20 мг каждого стандартного образца для калибровки колонки тщательно растворяют в 1 мл подвижной фазы для хроматографии. Растворы используют свежеприготовленными.

Приготовление испытуемых растворов

Коммерческие образцы субстанции (API) эноксапарина натрия (Hebei Changshan Biochemical Pharmaceutical Co., Ltd., Китай, серия NES190603, срок годности до 06.2022) и препаратов, содержащих эноксапарин натрия в качестве действующего вещества, «Evaparin», раствор для инъекций 300 мг / 3 мл (Intas Pharmaceuticals Ltd., Индия, серия L4421006, срок годности до 06.2023), Клексан®, раствор для инъекций 4000 IU (Sanofi S.p.A., Франция, серия AS438, срок годности до 03.2023) и «Эноксапарин-JL», раствор для инъекций 4000 МЕ («Jurabek Laboratories» MCHJ, Узбекистан, серия 0010520, срок годности до 06.2022) разбавляют подвижной фазой для хроматографии до получения конечных концентраций эноксапарина натрия 10–200 мг/мл.

[1] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Available at: https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition. Accessed: 24.03.2022.

[2] Your reference guide to the analysis of biopharmaceuticals and biomolecules. Available at: https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/5990-9384EN_SEC.pdf. Accessed: 24.03.2022.

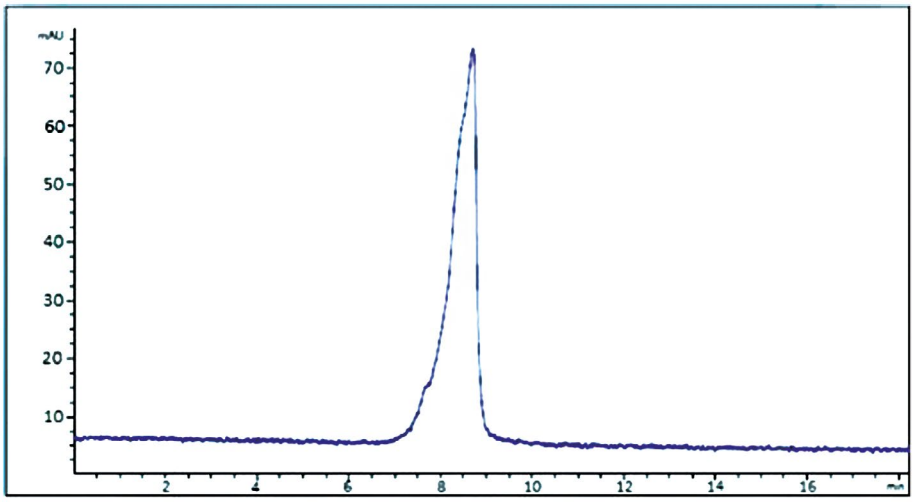


Рисунок 1. **Хроматограмма эноксапарина натрия (10 мг/мл); подвижная фаза – вода очищенная**

Figure 1. **Chromatogram of enoxaparin sodium (10 mg/ml); mobile phase – pure water**

Условия хроматографирования

В качестве основы для подбора условий хроматографирования использовали метод количественного определение гепарина, предложенный фирмой Agilent[1] с некоторыми модификациями:

- Хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 300 × 7,5 мм, заполненная сорбентом PL aquagel-OH 30 с размером частиц 8 мкм.
- Подвижная фаза:
  1) вода очищенная;
  2) буфер с pH 3,0;
  3) буфер с pH 7,0.
- Скорость потока подвижной фазы: 0,6 мл/мин.
- Объем пробы: 20 мкл.
- Детектирование: дифференциальная рефрактометрия.
- Температура колонки: 30 °C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор методики определения эноксапарина натрия в образцах парентеральных препаратов

С целью подбора оптимальной подвижной фазы для наиболее эффективного хроматографирования раствора эноксапарина натрия были исследованы вода очищенная и водно-солевые буферы с нейтральным и кислым значениями pH. Скорость потока устанавливали в соответствии с рекомендациями для выбранного типа хроматографической колонки (0,6 мл/мин).

При использовании в качестве подвижной фазы воды очищенной типичная хроматограмма эноксапарина натрия представляла собой один несимметричный пик (рисунок 1).

При использовании солевого буфера с кислым pH наблюдался значительный гидролиз эноксапарина натрия с образованием большого отрицательного пика на хроматограмме (рисунок 2).

Наиболее эффективное хроматографирование было получено при использовании солевого буфера того же состава, но с нейтральным pH (рисунок 3). В этой связи, для дальнейших исследований была выбрана подвижная фаза 3 – буфер с pH 7,0.

Методика с выбранной подвижной фазой была воспроизведена при анализе растворов API и готовых лекарственных форм эноксапарина натрия:

- «Evaparin», раствор для инъекций 300 мг / 3 мл (Intas Pharmaceuticals Ltd., Индия).
- Клексан®, раствор для инъекций 4000 IU (Sanofi S.p.A., Франция).
- «Эноксапарин-JL», раствор для инъекций 4000 МЕ («Jurabek Laboratories» МСНЈ, Узбекистан).

В результате, для всех образцов была получена характерная хроматограмма, идентичная представленной на рисунке 3.

Валидация методики

С целью изучения пригодности выбранной хроматографической системы в качестве метода количественного определения эноксапарина натрия в водных растворах нами проведена его валидация, в ходе которой определяли стандартные метрологические характеристики, к которым относятся специфичность, линейность, прецизионность и правильность [7].

[1] Your reference guide to the analysis of biopharmaceuticals and biomolecules. Available at: https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/5990-9384EN_SEC.pdf. Accessed: 24.03.2022.

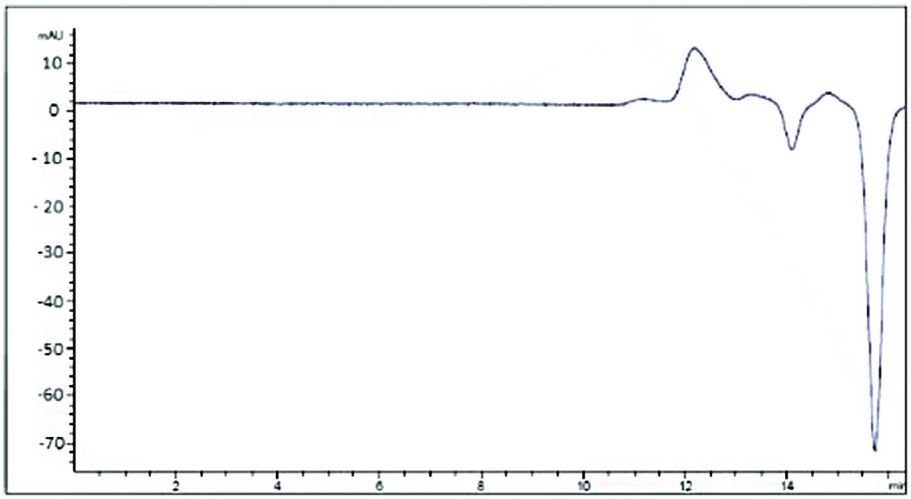


Рисунок 2. **Хроматограмма эноксапарина натрия (10 мг/мл), подвижная фаза – буфер с pH 3,0**

Figure 2. **Chromatogram of enoxaparin sodium (10 mg/ml); mobile phase – buffer solution, pH 3.0**

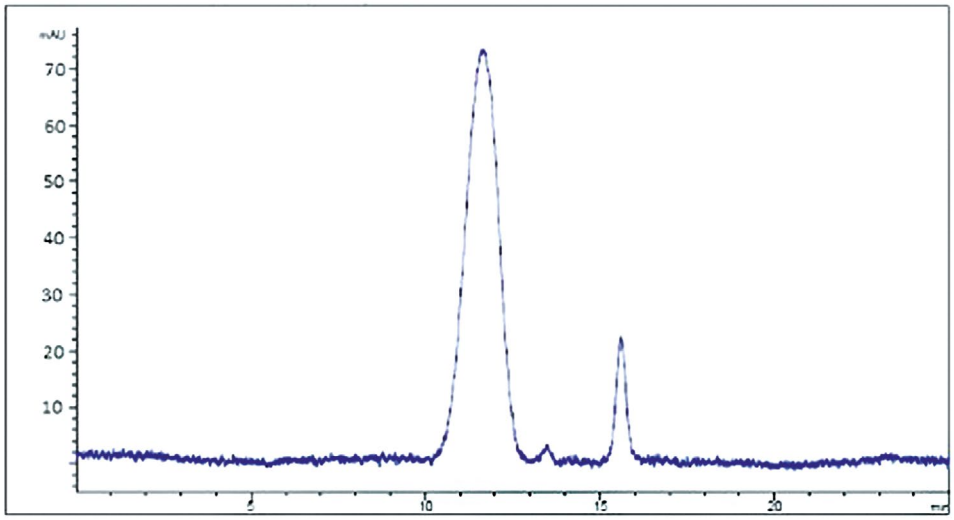


Рисунок 3. **Хроматограмма эноксапарина натрия (10 мг/мл), подвижная фаза – буфер с pH 7,0**

Figure 3. **Chromatogram of enoxaparin sodium (10 mg/ml); mobile phase – buffer-solution, pH 7.0**

Специфичность

Специфичность метода, необходимую как для подлинности, так и для количественной оценки, подтверждали путем определения молекулярной массы и молекулярно-массового распределения эноксапарина натрия с использованием прикладной программы Agilent GPC/SEC Software.

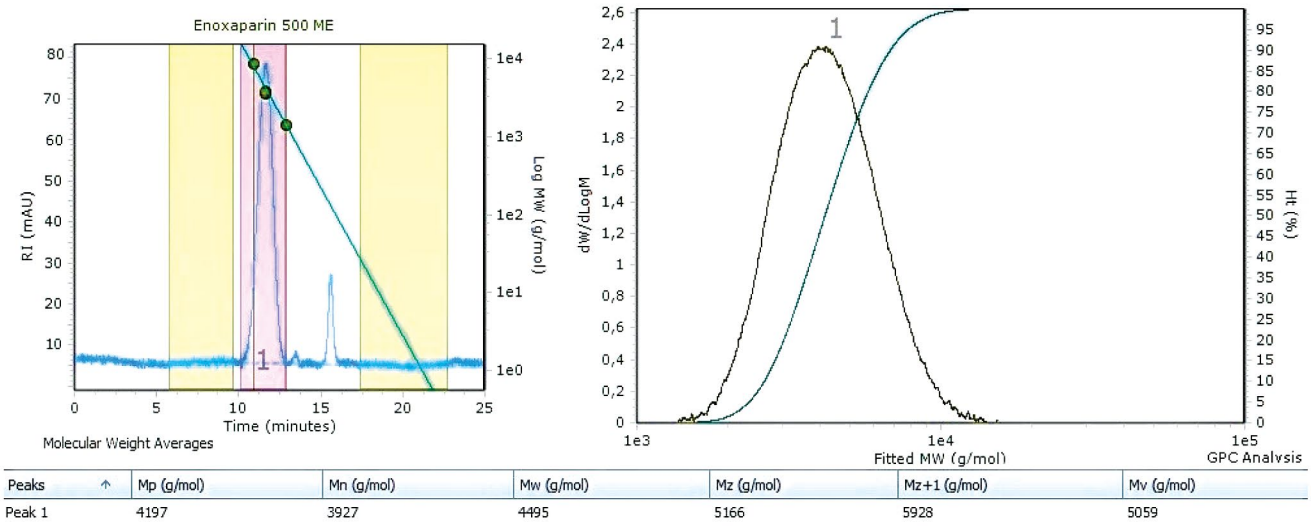
Для калибровки хроматографической колонки были использованы сертифицированные стандартные образцы полиэтиленгликоля и декстранов с точно известными молекулярными массами (рисунок 4).

Согласно полученным данным, основной пик на хроматограмме раствора эноксапарина натрия соответствовал средней относительной молекулярной массе M_w = 4495 г/моль (75 %).

Эти данные полностью удовлетворяют требованиям Фармакопеи США[1] и Европейской фармакопеи[2] к характеристике эноксапарина натрия по процентному распределению средней относительной молекулярной массы в пределах установленного диапазона.

[1] USP–NF. Available at: https://www.uspnf.com/ Accessed: 24.03.2022.

[2] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Available at: https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition. Accessed: 24.03.2022.



Peaks	Mp (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	Mz (g/mol)	Mz+1 (g/mol)	Mv (g/mol)
Peak 1	4197	3927	4495	5166	5928	5059

Рисунок 4. **Определение молекулярной массы и молекулярно-массового распределения эноксапарина натрия**

Figure 4. **Determination of molecular mass and molecular-mass distribution of enoxaparin sodium**

При анализе готовой лекарственной формы эноксапарина натрия, содержащей в качестве вспомогательного вещества спирт бензиловый [«Evaparin», раствор для инъекций 300 мг / 3 мл (Intas Pharmaceuticals Ltd., Индия)], влияние данного компонента на результаты хроматографического разделения не наблюдалось.

Полученные данные подтверждают специфичность выбранного метода хроматографического анализа и позволяют однозначно оценить определяемое вещество в присутствии вспомогательных компонентов.

Линейность

Линейность метода оценивали по зависимости площади пика от концентрации эноксапарина натрия в диапазоне концентраций эноксапарина натрия 25–200 мг/мл (1000–8000 МЕ) (рисунок 5).

Полученные статистические характеристики линейности метода, представленные в таблице 1, как и графические данные (рисунок 5) позволяют заключить, что зависимость площади пика от концентрации эноксапарина натрия в растворе носит линейный характер.

Таблица 1. **Статистические характеристики линейности метода**

Table 1. **Statistical characteristics of the method linearity**

Статистические характеристики Statistical characteristics	**Результаты** **Results**
Наклон (*a*) Slope (*a*)	94,0
Отрезок на оси ординат (*b*) Section on vertical axis (*b*)	7988
Коэффициент корреляции (*r*) Correlation coefficient (*r*)	0,9997



Рисунок 5. **График зависимости площади пика от содержания эноксапарина натрия в растворе**

Figure 5. **Typical relationship between the peak area and concentration of enoxaparin sodium in solution**

Прецизионность

Внутрилабораторную прецизионность оценивали статистически: были обработаны результаты двух параллельных определений, выполненных разными операторами в один день, в одной лаборатории и на одном и том же оборудовании. Определения проводились при шестикратной повторности из одинакового разведения препарата (4000 МЕ/мл) (таблица 2). Как видно из данных, представленных в таблице 2, между результатами, полученными двумя операторами, статистически значимых различий не наблюдалось.

Критерии достоверности гипотезы [7] для данного метода составили 1,027 и 0,774, соответственно.

Таблица 2. Статистические характеристики сходимости метода

Table 2. Statistical characteristics of the method precision

№	Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results	
		Оператор 1 Operator 1	Оператор 2 Operator 2
1	Объем выборки (*n*) Sample size (*n*)	6	6
2	Минимальное значение, МЕ/мл Minimal value, IU/ml	3990	3995
3	Максимальное значение, МЕ/мл Maximal value, IU/ml	4005	4007
4	Среднее значение, МЕ/мл Average value, IU/ml	3998	4000
5	Стандартное отклонение Standard deviation	4,779	4,843
6	Коэффициент вариации Variation coefficient	0,1195	0,1211
7	Нижняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Lower limit of confidence interval (P = 95 %)	3993	3995
8	Верхняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Upper limit of confidence interval (P = 95 %)	4003	4005

Правильность

Правильность метода оценивали путем определения фактора отклика трех разведений препарата (соотношение между значением площади хроматографического пика и соответствующим количеством эноксапарина натрия), соответствующих 120%-му, 100%-му и 80%-му содержанию эноксапарина натрия по отношению к исходному содержанию (6000 МЕ/мл) в препарате (определения выполнялись для трех образцов на каждом уровне содержания эноксапарина натрия). Полученные статистические характеристики правильности метода, представленные в таблице 3, удовлетворяют требованиям, предъявляемым к хроматографическим системам [7].

Таблица 3. Статистические характеристики правильности метода

Table 3. Statistical characteristics of the method accuracy

№	Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results
1	Объем выборки (*n*) Sample size (*n*)	9
2	Минимальное значение, МЕ/мл Minimal value, IU/ml	99,56
3	Максимальное значение, МЕ/мл Maximal value, IU/ml	100,08
4	Среднее значение, МЕ/мл Average value, IU/ml	99,88
5	Стандартное отклонение Standard deviation	0,224
6	Коэффициент вариации Variation coefficient	0,22
7	Нижняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Lower limit of confidence interval (P = 95 %)	99,71
8	Верхняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Upper limit of confidence interval (P = 95 %)	100,06

Принимая во внимание критерии приемлемости результатов валидации [7], рекомендуемые для хроматографических методов анализа (таблица 4),

Таблица 4. Метрологические характеристики метода

Table 4. Metrologic characterization of the method

Параметр валидации Validation parameter	Критерии приемлемости Acceptance criteria	Результаты проверки Results
Линейность Linearity	Коэффициент корреляции ≥0,99 Correlation coefficient ≥0.99	0,9997
Внутрилабораторная прецизионность Laboratory precision	Критерий $F \leq 5{,}05$. Критерий $t \leq 2{,}228$ Criteria $F \leq 5.05$ Criteria $t \leq 2.228$	$F = 1{,}027$ $t = 0{,}774$
Правильность Accuracy	Фактор отклика: среднее значение 97,5–102,5 %. Доверительный диапазон должен включать 100%-е значение. Коэффициент вариации ≤2,0 % Response factor: average value 97.5–102.5 %. Confidence interval includes the value of 100 %. Variation coefficient ≤2.0 %.	Среднее значение: 99,88. Нижняя граница доверительного интервала (при P = 95 %): 99,71. Верхняя граница доверительного интервала (при P = 95 %): 100,06. Коэффициент вариации 0,22 %. Average value: 99.88. Lower limit of confidence interval (P = 95 %): 99.71. Upper limit of confidence interval (P = 95 %): 100.06. Variation coefficient 0.22 %

полученные нами данные метрологических характеристик позволяют сделать вывод о том, что предложенный метод подтверждения подлинности и количественного определения эноксапарина натрия в водных растворах можно считать с высокой степенью надежности пригодным для применения в заданных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный метод гельпроникающей хроматографии для определения подлинности и количественного содержания эноксапарина натрия соответствует критериям достоверности, предъявляемым к хроматографическим методам анализа лекарственных средств.

Метод оказался простым, высокоточным и воспроизводимым. По итогам валидации методика признана специфичной и пригодной для использования в рутинном контроле качества инъекционных препаратов, содержащих эноксапарин натрия в качестве действующего вещества. Метод внесен в нормативный документ на отечественный лекарственный препарат «Эноксапарин-JL», раствор для инъекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берковский А. Л., Сергеева Е. В., Суворов А. В., Мелкумян А. Л., Козлов А. А., Нешкова Е. А., Яровая Г. А. Методы определения активности гепарина. М.: ГБОУ ДПО РМАПО; 2015. 64 с.
2. Маргаева Б. Ю., Шохин И. Е. Разработка, валидация и апробация методик определения анти-X_a- и анти-IIA-активности эноксапарина натрия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(4):190–196.
3. Sahu S., Lariya N. K. Development and Validation of Spectrophotometric Method for the Estimation of Enoxaparin sodium in marketed formulation. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2019;9(4-s):1236–1239. DOI: 10.22270/jddt.v9i4-s.3972.
4. Wang Zh., Chi L. Recent advances in mass spectrometry analysis of low molecular weight heparins. *Chinese Chemical Letters*, 2018;29(1):11–18. DOI: 10.1016/j.cclet.2017.08.050.
5. Kristensen H. I., Tromborg E. M., Nielsen J. R., Nielsen J. I., Johansen K. B., Ostergaard P. B. Development and validation of a size exclusion chromatography method for determination of molecular masses and molecular mass distribution in low molecular weight heparin. *Thrombosis research*. 1991;64(2):131–141. DOI: 10.1016/0049-3848(91)90113-b.
6. Matanović M. R., Grabnarm I., Grabnar P. A., Roškar R. Development and validation of a simple and sensitive size-exclusion chromatography method for quantitative determination of heparin in pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica*. 2015;65:(1)43–52. DOI: 10.1515/acph-2015-0010.
7. Береговых В. В. ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. М: Литтера; 2008. 132 с.

REFERENCES

1. Berkovskiy A. L., Sergeeva E. V., Suvorov A. V., Melkumyan A. L., Kozlov A. A., Neshkova E. A., Yarovaya G. A. Methods of determination of heparin activity. Moscow: GBOU DPO RMAPO; 2015. 64 p. (In Russ.)
2. Margaeva B. Yu., Shohin I. E. Development, validation and application of anti-Xa- and anti-IIa-enoxaparine sodium assay. *Drug development & registration*. 2016;(4):190–196. (In Russ.)
3. Sahu S., Lariya N. K. Development and Validation of Spectrophotometric Method for the Estimation of Enoxaparin sodium in marketed formulation. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2019;9(4-s):1236–1239. DOI: 10.22270/jddt.v9i4-s.3972.
4. Wang Zh., Chi L. Recent advances in mass spectrometry analysis of low molecular weight heparins. *Chinese Chemical Letters*, 2018;29(1):11–18. DOI: 10.1016/j.cclet.2017.08.050.
5. Kristensen H. I., Tromborg E. M., Nielsen J. R., Nielsen J. I., Johansen K. B., Ostergaard P. B. Development and validation of a size exclusion chromatography method for determination of molecular masses and molecular mass distribution in low molecular weight heparin. *Thrombosis research*. 1991;64(2):131–141. DOI: 10.1016/0049-3848(91)90113-b.
6. Matanović M. R., Grabnarm I., Grabnar P. A., Roškar R. Development and validation of a simple and sensitive size-exclusion chromatography method for quantitative determination of heparin in pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica*. 2015;65:(1)43–52. DOI: 10.1515/acph-2015-0010.
7. Beregovykh V. V., editor. Validation of analytical methods for medicines manufacturers. Moscow: Littera; 2008. 132 p. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-84-94
УДК 615.19.072

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение химического состава плодов облепихи крушиновидной, произрастающей на территории Центрального Черноземья

О. В. Тринеева✉

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Тринеева Ольга Валерьевна. **E-mail:** trineevaov@mail.ru

ORCID: О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 10.01.2022 **Статья принята в печать:** 18.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Химический состав растений является совокупностью всех первичных и вторичных метаболитов и может рассматриваться как результат реализации генетической информации, «связующее звено» между генотипом и фенотипом. Комплекс биологически активных веществ (БАВ) большинства лекарственных растений и получаемых на их основе лекарственных растительных препаратов представляет собой многокомпонентную систему, находящуюся во взаимодействии, состав которой не всегда известен полностью. Облепиха крушиновидная – одно из ценных растений, имеющее широкий ареал распространения. Плоды облепихи содержат большое количество классов различных БАВ. Исследования изменчивости химического состава в зависимости от климатических условий произрастания, заготовки и сушки с целью накопления и обобщения информации для выработки унифицированных научно обоснованных норм показателей качества сырья является актуальным направлением для изучения.

Цель. Целью настоящей работы являлось изучение химического состава плодов облепихи крушиновидной, произрастающей на территории Центрального Черноземья.

Материалы и методы. Сырьем для проведения анализа служили цельные свежие плоды облепихи крушиновидной, заготовленные на территории Центрального Черноземья РФ (Воронежская область). В работе методом ТСХ проведено исследование состава различных групп БАВ и их идентификация в извлечениях из изучаемого сырья. В процессе комплексного изучения химического состава плодов проведено определение каротиноидов, флавоноидов, дубильных веществ, аминокислот, гидроксикоричных кислот, антоцианов, органических кислот, сахаров, некоторых макроэлементов и витаминов.

Результаты и обсуждение. Плоды облепихи крушиновидной, произрастающей в условиях Центрального Черноземья, накапливают в значительных количествах свободные аминокислоты, дубильные вещества, органические кислоты и полисахариды. Методом капиллярного электрофореза в плодах облепихи крушиновидной исследован состав свободных водорастворимых простых сахаров, органических кислот, витаминов группы В, а также полный аминокислотный состав. Установлено значительное содержание рибофлавина и холина, а также яблочной и янтарной кислот. Результаты ВЭЖХ-анализа показали, что флавоноиды в плодах облепихи крушиновидной, произрастающей в условиях Центрального Черноземья представлены флавонолгликозидами – производными кверцетина, кемпферола и изорамнетина. В качестве хемомаркеров могут быть использованы минорные флаволгликозиды 3-рутинозид-7-рамнозиды изорамнетина, кверцетина и кемпферола, 3-софорозид-7-рамнозиды кверцетина и кемпферола, рутин, 3-глюкозид и 3-рамнозид изорамнетина.

Заключение. Полученные данные о компонентном составе фенольной фракции плодов исследуемых образцов облепихи крушиновидной схожи с литературными данными об облепихе того же вида различных сортов, заготовленных в условиях Средней полосы РФ (Московская область).

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, тонкослойная хроматография, химический состав, капиллярный электрофорез, ВЭЖХ-ДМД-МС

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

Вклад авторов. Автор осуществлял заготовку и сушку образцов сырья, пробоподготовку к проведению анализа, им проведены исследования состава БАВ анализируемых плодов с применением различных современных методов анализа, написал текст статьи, заключение и обсуждение результатов.

Для цитирования: Тринеева О. В. Изучение химического состава плодов облепихи крушиновидной, произрастающей на территории Центрального Черноземья. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):84–94. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-84-94

Study of the Chemical Composition of the Fruits of Sea Buckthorn Rockthroom, Growing in the Territory of the Central Black Earth Region

Olga V. Trineeva✉

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

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

ORCID: Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 10.01.2022 **Revised:** 18.01.2023 **Published:** 24.02.2023

© Тринеева О. В., 2023
© Trineeva O. V., 2023

Abstract
Introduction. The chemical composition of plants is a combination of all primary and secondary metabolites and can be considered as the result of the implementation of genetic information, a «link» between the genotype and phenotype. The complex of biologically active substances (BAS) of most medicinal plants and medicinal herbal preparations derived from them is a multicomponent system that is in interaction, the composition of which is not always fully known. Sea buckthorn is one of the valuable plants with a wide distribution area. Sea buckthorn fruits contain a large number of classes of various BAS. The study of the variability of the chemical composition depending on the climatic conditions of growth, harvesting and drying in order to accumulate and generalize information for the development of unified scientifically based standards for raw material quality indicators is an important area for study.
Aim. The purpose of this work was to study the chemical composition of the fruits of sea buckthorn, which grows in the Central Chernozem region.
Materials and methods. The raw materials for the analysis were whole fresh fruits of sea buckthorn, harvested in the territory of the Central black earth region of the Russian Federation (Voronezh region). In the work, the TLC method was used to study the composition of various groups of BAS and their identification in extracts from the studied raw materials. In the process of a comprehensive study of the chemical composition of fruits, the determination of carotenoids, flavonoids, tannins, amino acids, hydroxycinnamic acids, anthocyanins, organic acids, sugars, some macroelements and vitamins was carried out.
Results and discussion. The fruits of sea buckthorn, growing in the conditions of the Central black earth region, accumulate free amino acids, tannins, organic acids and polysaccharides in significant quantities. The composition of free water-soluble simple sugars, organic acids, B vitamins, as well as the complete amino acid composition was studied in the fruits of sea buckthorn using capillary electrophoresis. A significant content of riboflavin and choline, as well as malic and succinic acids has been established. The results of HPLC analysis showed that flavonoids in the fruits of sea buckthorn growing in the conditions of the Central black earth region are represented by flavonol glycosides – derivatives of quercetin, kaempferol and isorhamnetin. Minor flavolglycosides 3-rutinoside-7-rhamnosides of isorhamnetin, quercetin and kaempferol, 3-sophoroside-7-rhamnosides of quercetin and kaempferol, rutin, 3-glucoside and 3-rhamnoside of isorhamnetin can be used as chemomarkers.
Conclusion. The obtained data on the component composition of the phenolic fraction of the fruits of the studied samples of sea buckthorn are similar to the literature data on sea buckthorn of the same species of various varieties harvested in the conditions of the Central zone of the Russian Federation (Moscow region).

Keywords: sea buckthorn, thin layer chromatography, chemical composition, capillary electrophoresis, HPLC-DMD-MS

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

Contribution of the authors. The author carried out the preparation and drying of samples of raw materials, sample preparation for analysis, he conducted studies of the composition of BAS of the analyzed fruits using various modern methods of analysis, wrote the text of the article, the conclusion and discussion of the results.

For citation: Trineeva O. V. Study of the chemical composition of the fruits of sea buckthorh rockthroom, growing in the territory of the Central Black earth region. *Drug development & registration*. 2023;12(1):84–94. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-84-94

ВВЕДЕНИЕ

Химический состав растений является совокупностью всех первичных и вторичных метаболитов и может рассматриваться как результат реализации генетической информации, «связующее звено» между генотипом и фенотипом [1]. Комплекс биологически активных веществ (БАВ) большинства лекарственных растений и получаемых на их основе лекарственных растительных препаратов представляет собой многокомпонентную систему, находящуюся во взаимодействии, состав которой не всегда известен полностью.

Облепиха крушиновидная – одно из ценных растений, имеющее широкий ареал распространения [2–13]. Плоды облепихи пока не выпускаются в виде индивидуального лекарственного растительного сырья (ЛРС) в фильтр-пакетах и пачках различной расфасовки, однако масляный экстракт плодов является как самостоятельным препаратом, так и составной частью некоторых комплексных растительных препаратов регенерирующего действия. Плоды облепихи крушиновидной являются официнальным ЛРС. Подготовленный проект ФС на данный вид сырья находится в стадии публичного обсуждения и вывешен на сайте МЗ РФ [14].

Одним из ключевых вопросов является вопрос выбора группы БАВ для оценки качества ЛРС. Комплекс БАВ ЛРС облепихи включает большое количество классов различных веществ [2–13]. Известно также, что проявление территориальной вариабельности в качественном и количественном составе БАВ может отразиться на качестве сырья, используемого для производства фитопрепаратов и БАД. Поэтому исследования изменчивости химического состава в зависимости от климатических условий произрастания, заготовки и сушки с целью накопления и обобщения информации для выработки унифицированных научно обоснованных норм показателей качества сырья является актуальным направлением для изучения [1].

Цель работы – изучение химического состава плодов облепихи крушиновидной, произрастающей на территории Центрального Черноземья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сырьем для проведения анализа служили цельные свежие плоды облепихи крушиновидной, заготовленные на территории Центрального Черноземья

РФ (Воронежская область) в период с 2013 по 2020 гг. Сбор сырья осуществляли согласно требованиям ГФ РФ XIV, ОФС «Плоды»[1, 2]. В работе обобщены и систематизированы данные по результатам многолетнего исследования [15–34].

Идентификацию БАВ в изучаемом сырье проводили методом ТСХ по ранее разработанным и описанным методикам [15–18, 23, 25–27, 31–34] в трех повторностях в сравнении с достоверными стандартными образцами (эргокальциферол (ФСП 42-0008018000), β-каротин (ВФС 42-3128-98), токоферола ацетата (ФС 42-7843-97), ретинола ацетат (ФС 42-7811-97), а также чистые субстанции рутина, кверцетина, танина, галловой кислоты, аскорбиновой кислоты, глюкозы, фруктозы, ксилозы, рамнозы, аминокислот, органических кислот, предоставленные АО «ВЕКТОН» (Россия). Пробы на ТСХ-пластинки наносили с помощью микрошприцев объемом 1 и 10 мкл (МШ-10, МШ-1, Россия). Для приготовления элюентов использовали растворители марки х.ч. (АО «ВЕКТОН», Россия).

Приготовление реактивов, детектирующих реагентов, титрованных растворов проводили в соответствии с рекомендациями ГФ XIII–XIV[3, 4] изданий из субстанций марки х.ч. и ч.д.а. (АО «ВЕКТОН», Россия).

Антиоксидантную активность **(**АОА) определяли методом перманганатометрического титрования по известной методике Т. В. Максимовой [19].

Определение экстрактивных веществ проводили по ОФС ГФ РФ XIV изд. [21] по методике 1.

Количественное определение суммы различных БАВ в пересчете на тот или иной компонент проводилось спектрофотометрически (СФМ) и титриметрически по ранее разработанным методикам [20, 22, 24, 28–30].

Для определения состава свободных органических кислот, сахаров, витамина B_4 (холина), а также полного аминокислотного состава изучаемых объектов исследования проводили методом капиллярного электрофореза. Определение витаминов B_1 (тиамин), B_2 (рибофлавин), B_3 (пантотеновая кислота) осуществляли в варианте капиллярного зонного электрофореза. Витамин B_5 (никотиновая кислота) определяли методом мицеллярной электрокинетической хроматографии на приборе «Капель®-105/105М» (ГК «Люмэкс», Россия) в стандартных рекомендованных условиях анализа [35].

Анализ соединений фенольной фракции изучаемого ЛРС методом ВЭЖХ-ДМД-МС. Исследования проводились с использованием системы Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), оснащенной бинарным насосом, дегазатором, термостатируемым автосемплером, термостатом колонок, ДМД спектрофотометрическим Agilent 1100 Series Diode Array (Agilent Technologies, США) и времяпролетным (TOF) МС-детектором Agilent 6200 TOF LC/MS (Agilent Technologies, США). Идентификацию и определение содержания БАВ проводили по методике, разработанной ранее [36].

Стандарты и растворители. В качестве стандартных образцов использовались коммерчески доступные индивидуальные вещества: рутин (≥94 %, Sigma-Aldrich, США), гиперозид (≥95 %, HWI ANALYTIK GmbH, Германия), изокверцитрин (≥94 %, HWI ANALYTIK GmbH, Германия), кемпферол-3-глюкозид (≥95 %, Phytolab GmbH & Co. KG, Германия). В работе были использованы следующие растворители/реактивы: вода очищенная (получена с помощью системы Milli-Q Advantage A10, Millipore, США), ацетонитрил (UPLC/HPLC grade производства PanReac AppliChem, Германия), метанол (UPLC/HPLC grade производства J.T. Baker, Avantor™ Performance Materials, Inc. (США), муравьиная кислота 98–100 % (Merck, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили по программе STATISTICA 7.0 и методике ОФС ГФ XIV изд.[5]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования осуществляли разделение и идентификацию в извлечениях из изучаемого ЛРС различных групп БАВ методом ТСХ. Результаты изучения качественного состава БАВ плодов облепихи крушиновидной, полученных различными способами, представлены в таблице 1. Следует отметить, что вид хроматограмм извлечений из плодов различных годов заготовки в данном регионе, полученных в одинаковых условиях анализа и пробоподготовки [15–18, 23, 25–27, 31–34], не имел отличий в качественном составе.

Полученные результаты качественного фитохимического состава плодов облепихи крушиновидной, произрастающих в климатических условиях Воронежской области, важны с точки зрения накопления и обобщения информации о его вариабельности в зависимости от эколого-географических факторов места заготовки для выработки унифицированных требований к качеству данного сырья. Для выявления маркерных БАВ в составе комплекса требуется дополнительное сравнение с данными других регионов.

[1] Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Доступно по: http://www.femb.ru/feml. Ссылка активна на 14.06.2022.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Доступно по: http:// femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 14.06.2022.

[3] Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Доступно по: http://www.femb.ru/feml. Ссылка активна на 14.06.2022.

[4] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Доступно по: http:// femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 14.06.2022.

[5] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Доступно по: http:// femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 14.06.2022.

Таблица 1. Результаты изучения качественного состава БАВ на хроматограммах извлечений из плодов облепихи крушиновидной [15–18, 23, 25–27, 31–34]

Table 1. Results of studying qualitative composition of biologically active substances on chromatograms of extracts from fruits of sea buckthorn [15–18, 23, 25–27, 31–34]

№ п/п No. p/p	Группа БАВ Group of BAS	Вид зон Type of zones	Идентифицированные БАВ в сравнении с достоверными стандартными образцами Identified BAS in comparison with reliable standard samples
1	Органические кислоты Organic acids	3 желтых пятна на синем фоне 3 yellow spots on a blue background	Щавелевая (R_f = 0,13 ± 0,02), винная (R_f = 0,35 ± 0,02), яблочная (R_f = 0,78 ± 0,02) кислоты Oxalic (R_f = 0.13 ± 0.02), tartaric R_f = 0.35 ± 0.02), malic (R_f = 0.78 ± 0.02) acids
2	Флавоноиды Flavonoids	6 зон характерного свечения в УФ-свете (0,08 ± 0,02; 0,19 ± 0,02; 0,32 ± 0,02; 0,54 ± 0,02; 0,64 ± 0,02; 0,80 ± 0,02) 6 spots of typical glow in UV-light (0.08 ± 0.02; 0.19 ± 0.02; 0.32 ± 0.02; 0.54 ± 0.02; 0.64 ± 0.02; 0.80 ± 0.02)	Рутин (R_f = 0,54 ± 0,02), гиперозид (R_f = 0,64 ± 0,02), кверцетин (R_f = 0,80 ± 0,02) Rutin (R_f = 0.54 ± 0.02), hyperoside (R_f = 0.64 ± 0.02), quercetin (R_f = 0.80 ± 0.02)
3	Свободные аминокислоты Free amino acids	7 зон от желто-оранжевых до розовых и малиновых на белом фоне (0,26 ± 0,02; 0,32 ± 0,02; 0,35 ± 0,01; 0,42 ± 0,02; 0,46 ± 0,005; 0,58 ± 0,005; 0,68с± 0,02) From yellow-orange to pink and crimson on a white background (0.26 ± 0.02; 0.32 ± 0.02; 0.35 ± 0.01; 0.42 ± 0.02; 0.46 ± 0.005; 0.58 ± 0.005; 0.68 ± 0.02)	Пролин (R_f = 0,32 ± 0,02), глицин (R_f = 0,35 ± 0,01), глутаминовая кислота (R_f = 0,46 ± 0,005), лейцин (R_f = 0,58 ± 0,005) Proline (R_f = 0.32 ± 0.02), glycine (R_f = 0.35 ± 0.01), glutamic acid (R_f = 0.46 ± 0.005), leucine (R_f = 0.58 ± 0.005)
4	Дубильные вещества гидролизуемой группы Tannins of the hydrolyzable group	Серо-синяя зона на белом фоне слабой интенсивности Gray-blue zone on a white background of low intensity	Галловая кислота (R_f = 0,83 ± 0,02) Gallic acid (R_f = 0.83 ± 0.02)
5	Моносахара Monosugar	Желто-коричневая, розовая и желто-оранжевая зоны на белом фоне Yellow-brown, pink and yellow-orange zones on a white background	Глюкоза (R_f = 0,28 ± 0,02), ксилоза (R_f = 0,43 ± 0,02) и рамноза (R_f = 0,52 ± 0,02) Glucose (R_f = 0.28 ± 0.02), xylose (R_f = 0.43 ± 0.02), ramnose (R_f = 0.52 ± 0.02)
6	Лейкоантоцианы Leukoanthocyanins	1 красная (R_f = 0,20 ± 0,02), 2 голубовато-синие (R_f = 0,47 ± 0,02; 0,67 ± 0,02) и 1 желтая (R_f = 0,83 ± 0,02) зоны на белом фоне 1 red (R_f = 0.20 ± 0.02), 2 bluish-blue (R_f = 0.47 ± 0.02; 0.67 ± 0.02) and 1 yellow (R_f = 0.83 ± 0.02) zones on a white background	4 зоны БАВ антоциановой природы 4 zones of biologically active substances of anthocyanin nature
7	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	Зона белые на розовом фоне Zone white on pink background	Аскорбиновая кислота (R_f = 0,42 ± 0,01) Ascorbic acid (R_f = 0.42 ± 0.01)
8	Жирорастворимые витамины Fat soluble vitamins	8 темно-синих зон на желто-зеленом фоне (R_f = 0,01 ± 0,005; 0,06 ± 0,02; 0,11 ± 0,02; 0,17 ± 0,02; 0,19 ± 0,02; 0,63 ± 0,02; 0,78 ± 0,02; 0,99 ± 0,01) 8 dark blue zones on a yellow-green background (R_f = 0.01 ± 0.005; 0.06 ± 0.02; 0.11 ± 0.02; 0.17 ± 0.02; 0.19 ± 0.02; 0.63 ± 0.02; 0.78 ± 0.02; 0.99 ± 0.01)	Витамин D_2 (R_f = 0,63 ± 0,02), витамин Е (R_f = 0,78 ± 0,02), β-каротин (R_f = 0,99 ± 0,01) Vitamin D_2 (R_f = 0.63 ± 0.02), vitamin E (R_f = 0.78 ± 0.02), β-carotene (R_f = 0.99 ± 0.01)
9	Каротиноиды Carotenoids	7 желто-оранжевых зон на белом фоне (R_f = 0,071 ± 0,02; 0,129 ± 0,01; 0,176 ± 0,01; 0,235 ± 0,01; 0,553 ± 0,02; 0,600 ± 0,02; 0,980 ± 0,02) 7 yellow-orange zones on a white background (R_f = 0.071 ± 0.02; 0.129 ± 0.01; 0.176 ± 0.01; 0.235 ± 0.01; 0.553 ± 0.02; 0.600 ± 0.02; 0.980 ± 0.02)	β-каротин (R_f = 0,98 ± 0,02) β-carotene (R_f = 0.98 ± 0.02)

В процессе комплексного изучения метаболома исследуемого ЛРС (каротиноидов, флавоноидов, дубильных веществ (ДВ), аминокислот (АК), гидроксикоричных кислот (ГКК), антоцианов, органических кислот, сахаров, некоторых макроэлементов и витаминов) были разработаны и валидированы методики определения основных групп БАВ [20, 22, 24, 28–30]. Следует уточнить, что исследования проводились для каждой группы БАВ не менее 2 лет заготовки. Результаты имели сопоставимые значения (данных о различном содержании БАВ в разные года заготовки, отличающиеся на порядок или в разы выявлено не было). Каждое определение проводили не менее 6 раз. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Параметры получения извлечений, использованные в количественном анализе, обеспечивающие полноту экстракции каждой группы БАВ, такие как степень измельченности сырья, соотношения сырья и экстрагента, время (мин) и кратность экстракции, обобщены и представлены в таблице 3.

Таблица 2. Определение комплекса БАВ в плодах облепихи крушиновидной (здесь и далее в пересчете на абсолютно сухое сырье) ($n \geq 6$)

Table 2. Determination of the BAS complex in the fruits of sea buckthorn (hereinafter, in terms of absolutely dry raw materials) ($n \geq 6$)

№ п/п No. p/p	БАВ BAS	Содержание БАВ, % BAS content, %	Метод анализа Method of analysis
1	Сумма органических кислот Sum of organic acids	12,874 ± 0,161	Титриметрия (в пересчете на кислоту яблочную) Titrimetry (in terms of malic acid)
2	Сумма гидроксикоричных кислот Sum of hydroxycinnamic acids	0,210 ± 0,011	СФМ (в пересчете на кислоту хлорогеновую) Spectrophotometry (in terms of chlorogenic acid)
3	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	0,064 ± 0,003	Титриметрия Titrimetry
4	Антиокислительная активность, мг/г Antioxidant activity, mg/g	17,130 ± 0,130	Титриметрия (в пересчете на кверцетин) Titrimetry (in terms of quercetin)
5	Сумма каротиноидов The amount of carotenoids	51,190 ± 1,920 мг%	СФМ (в пересчете на β-каротин) Spectrophotometry (in terms of β-carotene)
7	Сумма антоциановых соединений The sum of anthocyanin compounds	2,831 ± 0,113	СФМ (в пересчете на цианидин-3-о-глюкозид) Spectrophotometry (in terms of cyanidin-3-o-glucoside)
8	Сумма дубильных веществ The amount of tannins	6,614 ± 0,487	Перманганатометрия Permanganatometry
		0,534 ± 0,015	СФМ (в пересчете на танин) Spectrophotometry (in terms of tannin)
9	Сумма свободных аминокислот The sum of free amino acids	4,860 ± 0,333	СФМ (в пересчете на кислоту глутаминовую) Spectrophotometry (in terms of glutamic acid)
10	Сумма флавоноидов The sum of flavonoids	1,085 ± 0,121	СФМ (в пересчете на рутин) Spectrophotometry (in terms of rutin)
11	Сумма полисахаридов и простых сахаров The sum of polysaccharides and simple sugars	20,901 ± 3,057	СФМ (Пикриновый метод, в пересчете на глюкозу) Spectrophotometry (Picrine method, in terms of glucose)
12	Кальций Calcium	1,050 ± 0,092	Комплексонометрия Complexometry
13	Танин и кислота галловая при совместном присутствии Tannin and gallic acid in the joint presence	0,202 (танина); 0,8999 (кислоты галловой) 0,202 (tannin); 0,8999 (gallic acid)	СФМ Spectrophotometry
14	Экстрактивные вещества Extractive substances	57,940 ± 3,320	ОФС ГФ XIV (методика 1) General pharmacopoeial monograph State pharmacopoeia of Russian Federation XIV (method 1)

Таблица 3. Оптимальные параметры выделения БАВ из плодов облепихи крушиновидной [20, 22, 24, 28–30]

Table 3. Optimal parameters of BAS isolation from fruits of sea buckthorn [20, 22, 24, 28–30]

№ п/п No. p/p	БАВ BAS	Результаты определения Results of determination			
		Экстрагент Extractant	ЛРС: экстрагент Medicinal plant raw materials: extractant	Время экстракции, мин Extraction time, min	Кратность экстракции Extraction rate
1	Кальций Calcium	разведеная HCl Diluted HCl	1:50	60	2
2	Сумма каротиноидов Amount carotenoids	95%-й этанол 95 % ethanol	1:100	90	1
3	Сумма антоциановых соединений Sum of anthocyanin compounds	подкисленный 80%-й этанол acidified 80 % ethanol	1:100	180	1
4	Сумма дубильных веществ Sum of tannins	вода water	1:200	30	1
5	Сумма свободных аминокислот Sum of free amino acids	вода water	1:70	60	2
6	Сумма флавоноидов Sum of flavonoids	70%-й этанол 70 % ethanol	1:30	45	1
7	Сумма полисахаридов и простых сахаров The sum of polysaccharides and simple sugars	вода: конц. HCl (10:1) water: conc. HCl (10:1)	1,5:80	90	2

Следует отметить, что плоды облепихи крушиновидной, произрастающей в условиях Центрального Черноземья, накапливают в значительных количествах свободные аминокислоты, каротиноиды, вещества полифенольной природы (флавоноиды, антоциановые и дубильные соединения), органические кислоты и полисахариды. Содержание суммы каротиноидов соответствует требованиям проекта ФС для ГФ РФ XIV издания [14].

В случае лекарственных растений выявление хемомаркеров имеет практическую значимость и может использоваться для отличия друг от друга морфологически сходных близких видов [1]. Поэтому для исследования полного состава и количественного содержания метаболома, изучаемое ЛРС анализировали селективными методами капиллярного электрофореза и ВЭЖХ-ДМД-МС. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты определения различных групп БАВ методом капиллярного электрофореза в плодах облепихи крушиновидной [35]

Table 4. Results of determination of various groups of biologically active substances by capillary electrophoresis in fruits of sea buckthorn [35]

№ п/п No. p/p	Группа БАВ BAS group	Содержание БАВ BAS content
Органические кислоты, % *Organic acids, %*		
1	Яблочная кислота Malic acid	8,92 ± 0,71
2	Янтарная кислота Succinic acid	0,37 ± 0,03
3	Масляная кислота Butyric acid	Менее 0,05 Less than 0,05
4	Молочная кислота Lactic acid	Менее 0,12 Less than 0,12
Аминокислоты (незаменимая аминокислота), %* *Amino acids (* essential amino acid), %*		
1	Аргинин Arginine	0,80 ± 0,06
2	Лизин* Lysine*	0,14 ± 0,01
3	Тирозин Tyrosine	0,36 ± 0,03
4	Фенилаланин* Phenylalanine*	0,43 ± 0,04
5	Гистидин Histidine	0,22 ± 0,02
6	Лейцин* Leucine*	0,43 ± 0,04
7	Изолейцин* Isoleucine*	0,22 ± 0,02
8	Метионин* Methionine*	0,07 ± 0,006
9	Валин* Valine*	0,22 ± 0,02
10	Пролин Proline	0,72 ± 0,06
11	Треонин* Threonine*	0,29 ± 0,02
12	Серин Serine	0,36 ± 0,03
13	Аланин Alanine	0,14 ± 0,01
14	Глицин Glycine	0,22 ± 0,02
15	Цистин Cystine	Менее 0,007 Less than 0,007
16	Глутаминовая кислота Glutamic acid	0,07 ± 0,006
17	Аспарагиновая кислота Aspartic acid	0,29 ± 0,02
Витамины группы В, мг/кг *Vitamins of group B, mg/kg*		
1	B_1	Менее 0,086 Less than 0,086
2	B_2	6,11 ± 0,49
3	B_3	Менее 5,0 Less than 5.0
4	B_4	39,72
5	B_5	Менее 10 Less than 10
Простые сахара, % *Simple sugars, %*		
1	Фруктоза Fructose	1,096 ± 0,091
2	Глюкоза Glucose	0,234 ± 0,019
3	Сахароза Sucrose	9,521 ± 0,762

Таким образом, методом капиллярного электрофореза выявлено достаточное количество водорастворимых простых сахаров (фруктозы и сахарозы) в плодах облепихи крушиновидной (рисунок 3). В исследуемом сырье преобладают аргинин и пролин. Содержание свободных и связанных аминокислот в плодах составляет 4,99 % (в пересчете на абсолютно сухое сырье), в т. ч. и незаменимые аминокислоты. Установлено значительное содержание рибофлавина и холина, а также яблочной и янтарной кислот.

Исследование содержания и состава флавоноидов в изучаемом ЛРС проводилось с помощью метода ВЭЖХ-ДМД-МС (рисунки 1 и 2 и 3). Флавоноиды в плодах облепихи крушиновидной, произрастающей в условиях Центрального Черноземья представлены 13-ю флавонолгликозидами – производные кверцетина, кемпферола и изорамнетина, основными из которых были изорамнетин-3-рутинозид (18,2 % от суммы флавоноиов), изорамнетин-3-софорозид-7-рам-



Рисунок 1. **Хроматограмма извлечения из плодов облепихи крушиновидной при λ = 350 нм**

1 – кверцетин-3-софорозид-7-рамнозид; 2 – кверцетин-3-рутинозид-7-рамнозид; 3 – кемпферол-3-софорозид-7-рамнозид; 4 – кверцетин-3-рутинозид-7-глюкуронид; 5 – изорамнетин-3-софорозид-7-рамнозид; 6 – изорамнетин-3-рутинозид-7-рамнозид; 7 – неидентифицированный флавонолгликозид; 8 – изорамнетин-3-глюкозид-7-рамнозид; 9 – рутин; 10 – изорамнетин-3-рутинозид; 11 – изорамнетин-3-глюкозид; 12 – изорамнетин-3-рамнозид; 13 – изорамнетин

Figure 1. **Chromatogram of sea buckthorn extract from fruits at λ = 350 nm**

1 – quercetin-3-sophoroside-7-rhamnoside; 2 – quercetin-3-rutinoside-7-rhamnoside; 3 – kaempferol-3-sophoroside-7-rhamnoside; 4 – quercetin-3-rutinoside-7-glucuronide; 5 – isorhamnetin-3-sophoroside-7-rhamnoside; 6 – isorhamnetin-3-rutinoside-7-rhamnoside; 7 – unidentified flavonol glycoside; 8 – isorhamnetin-3-glucoside-7-rhamnoside; 9 – rutin; 10 – isorhamnetin-3- rutinoside; 11 – isorhamnetin-3-glucoside; 12 – isorhamnetin-3-rhamnoside; 13 – isorhamnetin

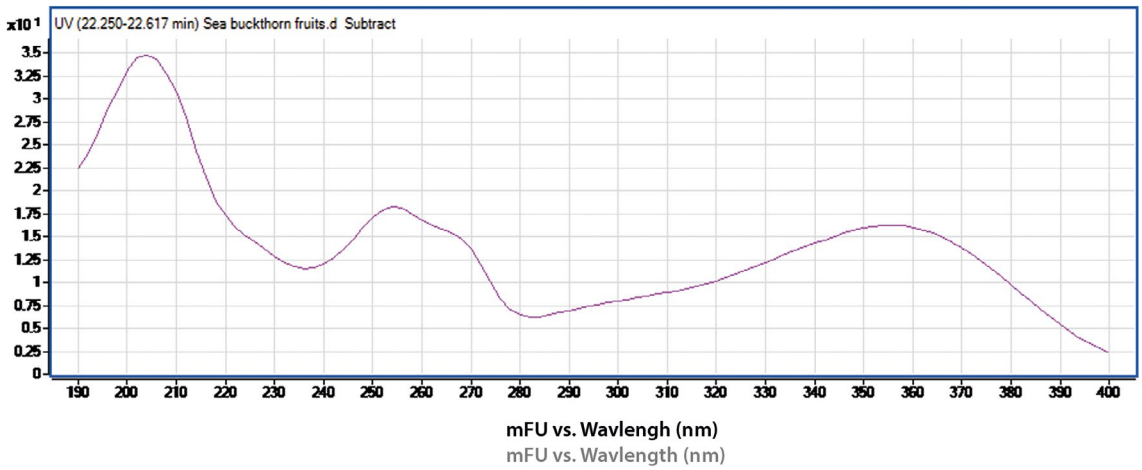


Рисунок 2. **Спектр поглощения изорамнетин-3-рутинозида**

Figure 2. **Absorption spectrum of isorhamnetin-3-rutinoside**

нозид (13,1 %) и изорамнетин-3-глюкозид-7-рамнозид (12,6 %). Среди минорных соединений идентифицированы 3-рутинозид-7-рамнозиды изорамнетина, кверцетина и кемпферола, 3-софорозид-7-рамнозиды кверцетина и кемпферола, рутин, 3-глюкозид и 3-рамнозид изорамнетина. Содержание флавоноидов в плодах облепихи крушиновидной представлены в таблице 5. Содержание суммы флавоноидов в исследуемых плодах по данным селективного ВЭЖХ-ДМД-МС-анализа составило 2,217 мг/г. Присутствие кверцетин-3-рутинозид-7-глюкуронида в облепихе установлено впервые.

Полученные данные о профиле флавоноидов в плодах исследуемых образцов облепихи крушиновидной схожи с литературными данными о сортовой вариации накопления флавоноидов в сырье того же вида, заготовленных в условиях средней полосы РФ (Московская область).

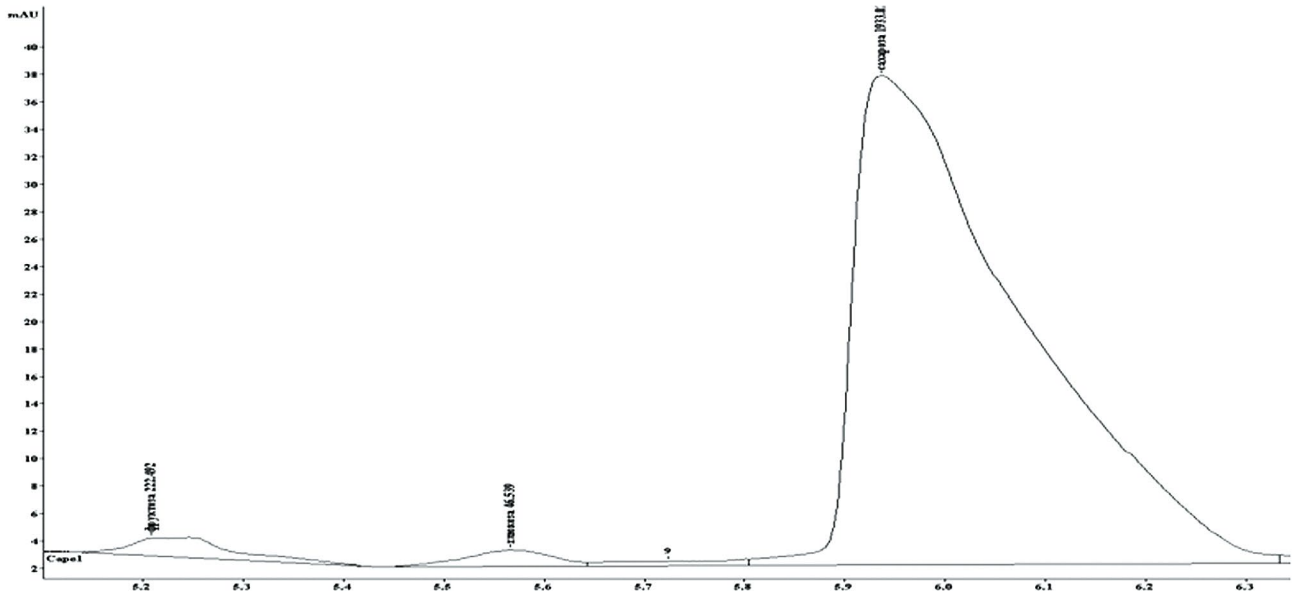


Рисунок 3. Электрофореграмма сахаров плодов облепихи крушиновидной (последовательность пиков: фруктоза, глюкоза, сахароза)

Figure 3. Electrophoregram of sugars of sea buckthorn fruits (sequence of peaks: fructose, glucose, sucrose)

Таблица 5. Результаты ВЭЖХ-ДМД-МС-анализа флавоноидов в плодах облепихи крушиновидной

Table 5. Results of HPLC-DMD-MS analysis of flavonoids in sea buckthorn fruits

№ п/п No. p/p	Флавоноиды Flavonoids	Содержание, мг/г Content, mg/g
1	Кверцетин-3-софорозид-7-рамнозид. Сирингетин-гликозид Quercetin-3-sophoroside-7-rhamnoside. Syringetin glycoside	0,21 ± 0,008
2	Кверцетин-3-рутинозид-7-рамнозид Quercetin-3-rutinoside-7-rhamnoside	0,14 ± 0,006
3	Кемпферол-3-софорозид-7-рамнозид Caempferol-3-sophoroside-7-rhamnoside	0,15 ± 0,006
4	Кверцетин-3-рутинозид-7-глюкуронид Quercetin-3-rutinoside-7-glucuronide	0,17 ± 0,007
5	Изорамнетин-3-софорозид-7-рамнозид Isoramnetin-3-sophoroside-7-rhamnoside	0,30 ± 0,012
6	Изорамнетин-3-рутинозид-7-рамнозид Isoramnetin-3-rutinoside-7-rhamnoside	0,11 ± 0,004
7	Неидентифицированный флавонолгликозид Unidentified flavonol glycoside	0,12 ± 0,005
8	Изорамнетин-3-глюкозид-7-рамнозид Isoramnetin-3-glucoside-7-rhamnoside	0,28 ± 0,011
9	Рутин Rutin	0,14 ± 0,006
10	Изорамнетин-3-рутинозид Isoramnetin-3-rutinoside	0,41 ± 0,016
11	Изорамнетин-3-глюкозид Isoramnetin-3-glucoside	0,14 ± 0,006
12	Изорамнетин-3-рамнозид Isoramnetin-3-rhamnoside	0,062 ± 0,002
13	Изорамнетин Isoramnetin	0,025 ± 0,001

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе методом ТСХ проведено исследование состава различных групп БАВ и их идентификация в извлечениях из изучаемого сырья. В процессе комплексного изучения фитохимического состава исследуемого ЛРС проведено определение каротиноидов, флавоноидов, дубильных веществ, аминокислот, гидроксикоричных кислот, антоцианов, органических кислот, сахаров, некоторых макроэлементов и витаминов. Плоды облепихи крушиновидной, произрастающей в условиях Центрального Черноземья, накапливают в значительных количествах свободные аминокислоты, каротиноиды, вещества полифенольной природы (флавоноиды, антоциановые и дубильные соединения), органические кислоты и полисахариды. Содержание суммы каротиноидов соответствует требованиям проекта ФС для ГФ РФ XIV издания.

Методом капиллярного электрофореза в плодах облепихи крушиновидной исследован состав свободных водорастворимых простых сахаров, органических кислот, витаминов группы В, а также полный аминокислотный состав. Установлено значительное содержание рибофлавина и холина, а также яблочной и янтарной кислот. Флавоноиды в плодах облепихи крушиновидной, произрастающей в условиях Центрального Черноземья представлены флавонолгликозидами – производными кверцетина, кемпферола и изорамнетина. В качестве хемомаркеров могут быть использованы минорные флавонолгликозиды 3-рутинозид-7-рамнозиды изорамнетина, кверцетина и кемпферола, 3-софорозид-7-рамнозиды кверцети-

на и кемпферола, рутин, 3-глюкозид и 3-рамнозид изорамнетина. Полученные данные о составе комплекса флавоноидов в плодах исследуемых образцов облепихи крушиновидной схожи с литературными данными о сортовой вариации накопления флавоноидов в сырье того же вида, заготовленных в условиях средней полосы РФ (Московская область). В различных зарубежных исследованиях [39-42] авторы выделили из плодов облепихи и идентифицировали флавоноиды 7-O-α-L-рамнозиды изорамнетина, кверцетина и кемпферола, содержащие в положении С-3 различные гликозидные остатки, в основном, софорозиды, рутинозиды и глюкозиды. Полученные данные о фитохимическом составе плодов облепихи крушиновидной, произрастающих в климатических условиях Центрального Черноземья (на примере Воронежской области), важны с точки зрения обобщения и систематизации информации о его вариабельности в зависимости от эколого-географических факторов региона заготовки. Для выявления в составе комплекса БАВ плодов маркерных компонентов вида требуется дополнительное сравнение с подобными данными других регионов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орлова А. А., Стругар Й., Штарк О. Ю., Жуков В. А., Лужанин В. Г., Повыдыш М. Н. Использование подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):97–105. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-97-105.
2. Тринеева О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе. Дис. ... д. фарм. наук. Москва. 2017. 441 с. Доступно по https://www.dissercat.com/content/teoreticheskie-i-metodologicheskie-podkhody-k-standartizatsii-i-otsenke-kachestva-lekarstven. Ссылка активна на 14.06.2022.
3. Тринеева О. В. Комплексное исследование содержания и специфического профиля БАВ плодов облепихи крушиновидной: монография. Воронеж: Издательский дом ВГУ; 2016. 224 с.
4. Kumar V., Sharma A., Bhardwaj R., Thukral A. T. Analysis of organic acids of tricarboxylic acid cycle in plants using GC-MS, and system modeling. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2017;8:20. DOI: 10.1186/s40543-017-0129-6.
5. Bayraktar V. Organic acids concentration in wine stocks after Saccharomyces cerevisiae fermentation. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(3):97–106.
6. Yadav A., Stobdan T., Chauhan O. P., Dwivedi S. K., Chaurasia O. P. Sea Buckthorn: A Multipurpose Medicinal Plant from Upper Himalayas. *Medicinal Plants*. 2019;1:399–426.
7. Nour V., Panaite T. D., Corbu A. R., Ropota M., Turcu R. P. Nutritional and Bioactive Compounds in Dried Sea-Buckthorn Pomace. *Erwerbs-Obstbau*. 2021;63:91–98. DOI: 10.1007/s10341-020-00539-1.
8. Kashyap P., Deepshikha, Riar C. S., Jindal N. Sea Buckthorn. Antioxidants in Fruits: Properties and Health Benefits. 2020;2:201–225. DOI: 10.1007/978-981-15-7285-2_11.
9. Wanchao C., Pengjuan C., Huaying S., Weiqing G., Chunwu Y., Hao J., Bin F., Decheng S. Comparative effects of salt and alkali stresses on organic acid accumulation and ionic balance of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Industrial Crops and Products*. 2009;30(3):351–358. DOI: 10.1016/j.indcrop.2009.06.007.
10. Скалий Л. П. Облепиха: Пособие для садоводов-любителей. М.: Изд-во «Ниола-Пресс»; 2007. 240 с.
11. Heyen S., Scholz-Böttcher B. M., Rabus R., Wilkes H. Method development and validation for the quantification of organic acids in microbial samples using anionic exchange solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020;412:7491–7503. DOI: 10.1007/s00216-020-02883-3.
12. Raffo A., Paoletti F., Antonelli M. Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) cultivars. *European Food Research and Technology*. 2004;219:360–368. DOI: 10.1007/s00217-004-0984-4.
13. Christaki E. Hippophae Rhamnoides L. (Sea Buckthorn): a Potential Source of Nutraceuticals. *Food and Public Health*. 2012;2:69–72. DOI: 10.5923/j.fph.20120203.02.
14. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Самылина И. А. Исследования по разработке проектов фармакопейных статей на плоды и масло облепихи крушиновидной. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2016;3:126–133.
15. Тринеева О. В., Сафонова И. И., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Идентификация органических кислот методом ТСХ в извлечениях из растительных объектов. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2013;6:896–901.
16. Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Определение жирорастворимых витаминов в растительных объектах методом ТСХ. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2014;14(1):144–149.
17. Тринеева О. В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*.. 2021;10(2):69–79. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
18. Тринеева О. В., Синкевич А. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Исследование аминокислотного состава извлечений из растительных объектов. Химия растительного сырья. 2015;2:141–148.
19. Тринеева О. В., Сафонова И. И., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Определение антиоксидантной активности извлечений из плодов облепихи крушиновидной. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2012;2:266–268.
20. Тринеева О. В., Сафонова И. И., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Определение флавоноидов в плодах облепихи крушиновидной. *Фармация*. 2012;7:18–21.
21. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Карлов П. М. Определение экстрактивных веществ в некоторых видах лекарственного растительного сырья. Вестник *ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2013;2:220–224.
22. Тринеева О. В., Сафонова И. И., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Органические кислоты в плодах облепихи крушиновидной. *Фармация*. 2013;7:7–10.
23. Мальцева А. А., Тринеева О. В., Чистякова А. С., Брежнева Т. А., Сливкин А. И., Сорокина А. А. Тонкослойная хроматография в анализе флавоноидов растительных объектов. *Фармация*. 2013;1:13–16.
24. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Казьмина М. А. Исследование спектральных характеристик антоциановых соединений облепихи крушиновидной. *Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация*. 2014;3:188–122.
25. Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Способ определения жирорастворимых витаминов А, D_2, Е и β-каротина при совместном присутствии методом ТСХ. Патент РФ на изобретение № RU 2530620. 10.10.2014. Доступно по https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet/ Ссылка активна на 12.06.2022.
26. Тринеева О. В., Синкевич А. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Определение аминокислот в лекарственном растительном сырье методом ТСХ (на примере листьев крапивы двудомной и плодов облепихи крушиновидной). *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(5):37–41.
27. Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Разделение жирорастворимых витаминов D2 и Е при совместном присутствии методом ТСХ. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2015;15(1):42–50.
28. Тринеева О. В., Самылина И. А., Сливкин А. И., Казьмина М. А. Разработка методики количественного определения антоциановых соединений в плодах облепихи крушиновидной. *Фармация*. 2015;7:9–7.

29. Тринеева О. В., Сливкин А. И. Определение кальция в плодах облепихи крушиновидной (H*ippophaes rhamnoides* L.). *Химия растительного сырья*. 2015;1:101–106.
30. Тринеева О. В. Шикунова Н. С., Сливкин А. И. Исследования по определению дубильных веществ в плодах облепихи крушиновидной. *Фармация*. 2016;3:16–21.
31. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Выбор оптимальных параметров разделения аминокислот в тонком слое сорбента. *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(1):47–52.
32. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф. Разделение и определение жирорастворимых витаминов А, D_2, Е и β-каротина при совместном присутствии методом ступенчатого элюирования в тонком слое сорбента. *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(2):51–56.
33. Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Сафонова И. И., Сливкин А. И., Назарова А. А., Синкевич А. В. Способ идентификации и количественного определения аскорбиновой кислоты. Патент РФ на изобретение № RU 2581456. 20.04.2016. Доступно по: https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet/ Ссылка активна на 12.06.2022.
34. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Сафонова Е. Ф., Назарова А. А., Шикунова Н. С. Способ определения полифенольных соединений методом ступенчатого элюирования в тонком слое сорбента. Патент РФ на изобретение № RU 2597661. 20.09.2016. Доступно по: https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet/ Ссылка активна на 12.06.2022.
35. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: ООО «Веда»; 2006. 212 с.
36. Zhogova A. A., Perova I. B., Samylina I. A., Ramenskaya G. V., Eller K. I. Identification and quantitative determination of the main biologically active substances in motherwort herb by HPLC–mass spectrometry. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2014;48(7):461–466. DOI: 10.1007/s11094-014-1132-5.
37. Rösch D., Krumbein A., Mügge C. Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MS(n). *J. Agric. Food Chem*. 2004;52(13):4039–4046.
38. Gutzeit D., Wray V., Winterhalter P. Preparative isolation and purification of flavonoids from sea buckthorn juice concen-trate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by high-speed counter-current chromatography. *Chromatographia*. 2006;65(12):1–7.
39. Arimboor R., Arumughan C. HPLC-DAD-MS/MS profiling of antioxidant glycosides in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2012;63(6):730–738.
40. Kim J.-S., Yu C.-Y., Kim M.-J. Phamalogical effect and component of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). *J Plant Biotechnol*. 2010;37:47–56. DOI: 10.5010/JPB.2010.37.1.047.

REFERENCES

1. Orlova A. A., Strugar J., Shtark O. Yu., Zhukov V. A., Luzhanin V. G., Povydysh M. N. Use of Metabolomic Approaches in Analysis of Medicinal Plants and Phytopreparations (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(1):97–105. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-97-105.
2. Trineeva O. V. Theoretical and methodological approaches to standardization and quality assessment of medicinal plant materials and oil extracts based on it. [Dissertation.] Moscow. 2017. 441 p. Available at: https://www.dissercat.com/content/teoreticheskie-i-metodologicheskie-podkhody-k-standartizatsii-i-otsenke-kachestva-lekarstven. Accessed: 14.06.2022. (In Russ.)
3. Trineeva O. V. Comprehensive study of the content and specific profile of biologically active substances in fruits of sea buckthorn: monograph. Voronezh: VSU Publishing House; 2016. 224 p. (In Russ.)
4. Kumar V., Sharma A., Bhardwaj R., Thukral A. T. Analysis of organic acids of tricarboxylic acid cycle in plants using GC-MS, and system modeling. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2017;8:20. DOI: 10.1186/s40543-017-0129-6.
5. Bayraktar V. Organic acids concentration in wine stocks after Saccharomyces cerevisiae fermentation. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(3):97–106.
6. Yadav A., Stobdan T., Chauhan O. P., Dwivedi S. K., Chaurasia O. P. Sea Buckthorn: A Multipurpose Medicinal Plant from Upper Himalayas. *Medicinal Plants*. 2019;1:399–426.
7. Nour V., Panaite T. D., Corbu A. R., Ropota M., Turcu R. P. Nutritional and Bioactive Compounds in Dried Sea-Buckthorn Pomace. *Erwerbs-Obstbau*. 2021;63:91–98. DOI: 10.1007/s10341-020-00539-1.
8. Kashyap P., Deepshikha, Riar C. S., Jindal N. Sea Buckthorn. Antioxidants in Fruits: Properties and Health Benefits. 2020;2:201–225. DOI: 10.1007/978-981-15-7285-2_11.
9. Wanchao C., Pengjuan C., Huaying S., Weiqing G., Chunwu Y., Hao J., Bin F., Decheng S. Comparative effects of salt and alkali stresses on organic acid accumulation and ionic balance of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Industrial Crops and Products*. 2009;30(3):351–358. DOI: 10.1016/j.indcrop.2009.06.007.
10. Skalii L. P. Sea buckthorn: A guide for amateur gardeners. Moscow: Publishing house "Niola-Press"; 2007. 240 p. (In Russ.)
11. Heyen S., Scholz-Böttcher B. M., Rabus R., Wilkes H. Method development and validation for the quantification of organic acids in microbial samples using anionic exchange solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020;412:7491–7503. DOI: 10.1007/s00216-020-02883-3.
12. Raffo A., Paoletti F., Antonelli M. Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) cultivars. *European Food Research and Technology*. 2004;219:360–368. DOI: 10.1007/s00217-004-0984-4.
13. Christaki E. Hippophae Rhamnoides L. (Sea Buckthorn): a Potential Source of Nutraceuticals. *Food and Public Health*. 2012;2:69–72. DOI: 10.5923/j.fph.20120203.02.
14. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Samylina I. A. Research on the development of draft pharmacopoeial articles on the fruits and oil of sea buckthorn. *Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2016;3:126–133. (In Russ.)
15. Trineeva O. V., Safonova I. I., Slivkin A. I., Safonova E. F. Identification of organic acids by TLC in extracts from plant objects. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2013;6:896–901. (In Russ.)
16. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determination of fat-soluble vitamins in plant objects by TLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2014;14(1):144–149. (In Russ.)
17. Trineeva O. V. Development of Theoretical Approaches to Determination of the Main Groups of Biologically Active Substances of Medicinal Plant Raw Materials by TLC Method. *Drug development & registration*. 2021;10(2):69–79. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
18. Trineeva O. V., Sinkevich A. V., Slivkin A. I., Safonova E. F. Study of the amino acid composition of extracts from plant objects. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja*. 2015;2:141–148. (In Russ.)
19. Trineeva O. V., Safonova I. I., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determination of antioxidant activity of extracts from sea buckthorn fruits. *Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2012;2:266–268. (In Russ.)
20. Trineeva O. V., Safonova I. I., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determination of flavonoids in the fruits of sea buckthorn. *Farmatsiya*. 2012;7:18–21. (In Russ.)
21. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Karlov P. M. Determination of extractive substances in some types of medicinal plant materials. *Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2013;2:220–224. (In Russ.)
22. Trineeva O. V., Safonova I. I., Safonova E. F., Slivkin A. I. Organic acids in the fruits of sea buckthorn. *Farmatsiya*. 2013;7:7–10. (In Russ.)
23. Mal'tseva A. A., Trineeva O. V., Chistyakova A. S., Brezhneva T. A., Slivkin A. I., Sorokina A. A. Thin layer chromatography in the analysis of flavonoids of plant objects. *Farmatsiya*. 2013;1:13–16. (In Russ.)

24. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Kaz'mina M. A. Study of the spectral characteristics of anthocyanin compounds of sea buckthorn. *Vestnik VGU. Ser. Khimiya. Biologiya. Farmatsiya.* 2014;3:188–122. (In Russ.)
25. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Method for determining fat-soluble vitamins A, D_2, E and β-carotene in the presence of TLC. Patent RUS № 2530620. 10.10.2014. Available at: https://www.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet/ Accessed: 06.12.2022. (In Russ.)
26. Trineeva O. V., Sinkevich A. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determination of amino acids in medicinal plant materials by TLC (on the example of stinging nettle leaves and fruits of sea buckthorn buckthorn). *Pharmaceutical chemistry journal.* 2015;49(5):37–41. (In Russ.)
27. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Separation of fat soluble vitamins D2 and E in co-presence by TLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2015;15(1):42–50. (In Russ.)
28. Trineeva O. V., Samylina I. A., Slivkin A. I., Kaz'mina M. A. Development of a method for the quantitative determination of anthocyanin compounds in the fruits of sea buckthorn. *Farmatsiya.* 2015;7:9–7. (In Russ.)
29. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Determination of calcium in the fruits of sea buckthorn (*Hippophaes rhamnoides* L.). *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja.* 2015;1:101–106. (In Russ.)
30. Trineeva O. V. Shikunova N. S., Slivkin A. I. Studies on the determination of tannins in the fruits of sea buckthorn. *Farmatsiya.* 2016;3:16–21. (In Russ.)
31. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Safonova E. F. Choice of optimal parameters for the separation of amino acids in a thin layer of sorbent. *Pharmaceutical chemistry journal.* 2016;50(1):47–52. (In Russ.)
32. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Safonova E. F. Separation and determination of fat-soluble vitamins A, D2, E and β-carotene in the presence of a step by step elution in a thin layer of sorbent. *Pharmaceutical chemistry journal.* 2016;50(2):51–56. (In Russ.)
33. Trineeva O. V., Safonova E. F., Safonova I. I., Slivkin A. I., Nazarova A. A., Sinkevich A. V. A method for the identification and quantification of ascorbic acid. Patent RUS № 2581456. 20.04.2016. Available at: https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet/ Accessed: 12.06.2022. (In Russ.)
34. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Safonova E. F., Nazarova A. A., Shikunova N. S. Method for the determination of polyphenolic compounds by stepwise elution in a thin layer of sorbent. Patent RUS № 2597661. 20.09.2016. Available at: https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet/ Accessed: 12.06.2022. (In Russ.)
35. Komarova N. V., Kamencev Ya. S. A practical guide to the use of Capillary capillary electrophoresis systems. St. Petersburg: LLC "Veda"; 2006. 212 p. (In Russ.)
36. Zhogova A. A., Perova I. B., Samylina I. A., Ramenskaya G. V., Eller K. I. Identification and quantitative determination of the main biologically active substances in motherwort herb by HPLC–mass spectrometry. *Pharmaceutical chemistry journal.* 2014;48(7):461–466. DOI: 10.1007/s11094-014-1132-5.
37. Rösch D., Krumbein A., Mügge C. Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MS(n). *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(13):4039–4046.
38. Gutzeit D., Wray V., Winterhalter P. Preparative isolation and purification of flavonoids from sea buckthorn juice concen-trate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by high-speed counter-current chromatography. *Chromatographia.* 2006;65(12):1–7.
39. Arimboor R., Arumughan C. HPLC-DAD-MS/MS profiling of antioxidant glycosides in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2012;63(6):730–738.
40. Kim J.-S., Yu C.-Y., Kim M.-J. Phamalogical effect and component of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). *J Plant Biotechnol.* 2010;37:47–56. DOI: 10.5010/JPB.2010.37.1.047.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-95-105
УДК 615.074

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Двойной протеолиз для определения N- и O-гликозилирования Fc-гибридного белка этанерцепта методом пептидного картирования

В. Г. Варзиева[1]✉, Н. В. Месонжник[1,2]✉✉, А. О. Белушенко[1], Н. Л. Бочкарева[1], С. А. Апполонова[1]

[1] ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[2] Научный центр мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Варзиева Валерия Георгиевна. **E-mail:** varzieva.valeria@gmail.com
✉✉ **Контактное лицо:** Месонжник Наталья Владимировна. **E-mail:** natalia.mesonzhnik@labworks.ru

ORCID: В. Г. Варзиева – https://orcid.org/0000-0002-9067-8717; Н. В. Месонжник – https://orcid.org/0000-0001-8860-5853; А. О. Белушенко – https://orcid.org/0000-0003-4656-7187; Н. Л. Бочкарева – https://orcid.org/0000-0001-8080-1665; С. А. Апполонова – https://orcid.org/0000-0002-9032-1558.

Статья поступила: 11.10.2022 **Статья принята в печать:** 25.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Современные биотехнологические препараты представлены преимущественно высокогликозилированными белками. Подавляющее большинство таких препаратов, выпускаемых отечественными биофармацевтическими компаниями, являются биоаналогами зарубежных препаратов. Основа разработки таких препаратов – аналитические исследования, направленные на подтверждение эквивалентности структур биоаналога и эталона. Наибольшую аналитическую сложность представляют Fc-слитые препараты, сочетающие в себе свойства эффекторных белков и кристаллизующегося фрагмента IgG1. Единственным биоаналогом такого вида, зарегистрированным в России, является этанерцепт, который был выбран в качестве объекта исследования. Существующие классические походы не позволяют точно и достоверно определять гликановый профиль таких препаратов. Разработка подходов и принципов таких исследований необходима, так как изменение структуры биоаналога в процессе производства может оказать большое влияние на его эффективность и безопасность.

Цель. Разработка подходов двойного протеолиза, позволяющих провести гликопептидное картирование Fc-слитого белка этанерцепта с использованием протеазы Arg-C.

Материалы и методы. Этанерцепт подвергался энзиматическому гидролизу с применением комбинаций трипсина с одной из двух протеаз (Arg-C или Asp-N). Образующиеся пептиды идентифицировались методом ВЭЖХ-МС/МСВР. Подтверждение структуры гликанов осуществлялось по фрагментным спектрам гликопептидов, полученным в режиме повышенной энергии столкновений (MS^E).

Результаты и обсуждение. Использование комбинации трипсина с Arg-C приводило к надежным результатам. Разработанный подход позволил определить большинство участков O-гликозилирования и установить типы O-гликанов этанерцепта. Показано, что для эффективного O-гликопептидного картирования необходима стадия N-дегликозилирования. N-гликопептидным картированием были идентифицированы основные формы N-гликанов каждого из трех участков N-гликозилирования (N149, N171, N317). Установлено, что применение комбинации трипсина с Arg-C позволяет идентифицировать трехантенные формы, несмотря на наличие в образующемся пептиде участка O-гликозилирования. Общий профиль N-гликозилирования, выраженный как процент от суммарного отклика всех идентифицированных гликоформ, показывает сопоставимость результатов при использовании разработанного подхода.

Заключение. В результате проведенного исследования нами были разработаны подходы гликопептидного картирования, включающие использование комбинаций протеаз, которые позволяют надежно и воспроизводимо определять локализацию участков и формы N- и O-гликозилирования этанерцепта. Разработанные подходы могут использоваться для проведения исследований сопоставимости биоподобных лекарственных средств, оценки качества при изменении технологии производства лекарственных препаратов (ЛП), при разработке новых биотехнологических ЛП.

Ключевые слова: пептидное картирование, биоаналоги, моноклональные антитела, Fc-слитые белки, трипсин, Arg-C, Asp-N

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

Вклад авторов. В. Г. Варзиева, Н. В. Месонжник, А. О. Белушенко придумали, разработали и выполнили эксперимент. Все авторы провели обработку полученных данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» № 075-15-2022-304.

Для цитирования: Варзиева В. Г., Месонжник Н. В., Белушенко А. О., Бочкарева Н. Л., Апполонова С. А. Двойной протеолиз для определения N- и O-гликозилирования Fc-гибридного белка этанерцепта методом пептидного картирования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):95–105. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-95-105

Double Proteolysis for N- and O-glycan Analysis of Fc-fusion Protein Etanercept

Valeria G. Varzieva[1]✉, Natalia V. Mesonzhnik[1,2]✉✉, Anton O. Belushenko[1], Natalia L. Bochkareva[1], Svetlana A. Appolonova[1]

© Варзиева В. Г., Месонжник Н. В., Белушенко А. О., Бочкарева Н. Л., Апполонова С. А., 2023
© Varzieva V. G., Mesonzhnik N. V., Belushenko A. O., Bochkareva N. L., Appolonova S. A., 2023

[1] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[2] World-Class Research Center «Digital Biodesign and Personalized Healthcare», 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:** Valeria G. Varzieva. **E-mail:** varzieva.valeria@gmail.com
✉✉ **Corresponding author:** Natalia V. Mesonzhnik. **E-mail:** natalia.mesonzhnik@labworks.ru

ORCID: Valeria G. Varzieva – https://orcid.org/0000-0002-9067-8717; Natalia V. Mesonzhnik – https://orcid.org/0000-0001-8860-5853;
Anton O. Belushenko – https://orcid.org/0000-0003-4656-7187; Natalia L. Bochkareva – https://orcid.org/0000-0001-8080-1665;
Svetlana A. Appolonova – https://orcid.org/0000-0002-9032-1558.

Received: 11.10.2022 **Revised:** 25.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Highly glycosylated proteins are the most abundant class of modern biopharmaceuticals. A majority of such therapeuticals produced by Russian biopharmaceutical companies is biosimilars. The foundation of biosimilar manufacturing is analytical assessment of structure equivalence to an original molecule. Fc-fusions present a challenge due to their structural properties. The only biosimilar of this kind registered in Russia is etanercept – a fusion of tumor necrosis factor receptor α and Fc-fragment of IgG1. Existing approaches widely used in protein analysis do not allow accurate and reliable description of glycoylation of these proteins. Development of new approaches and principles of such analysis is necessary, as the changes in biosimilar's molecular structure can seriously affect its efficacy and safety.

Aim. Development of double proteolysis approaches for glycopeptide mapping of Fc-fusion protein etanercept using Arg-C protease.

Materials and methods. Etanercept was subjected to enzymatic hydrolysis using trypsin in combination with Arg-C or Asp-N. The resulting peptides were analyzed using HPLC-MS system Xevo G2-XS QTOF (Waters Corporation, USA). The conformation of glycan structure was performed via analysis of fragment spectra of glycopeptides, acquired with high collision energy mode (MS^E). UNIFI (version 1.8) with biopharmasuetical assessment setting (Waters Corporation, USA) was used to analyze the peptide maps.

Results and discussion. It was found that using the combination of trypsin with protease Arg-C leads to reliable results Using the developed approach we successfully determined the majority of O-glycosylation sites and types of O-glycans. It was shown that for an effective O-glycopeptide maping N-deglycosylation stage is required. Most abundant N-glycan structures were identified for each of three N-glycosylation sites (N149, N171, N317). It was determined, that the combination of trypsin with Arg-C allows identification of three-antenna forms despite the presence of O-glycosylation site on the analyzed peptide. General N-glycosylation profile shows comparability of results for both approaches.

Conclusion. As a result of this research we developed glycopeptide mapping approaches in which a combination of proteases is used. Using these methods sites of N- and O-glycosilation and glycofoms of etanercept were accurately and reproducibly determined. Developed procedures can be applied to other types of Fc-fusion proteins, making it of broader appeal and benefit to the overall biopharmaceutical industry. These approaches provide comprehensive information useful for structure-function studies and of potential value for product comparability measurements and possibly even future manufacturing control strategies.

Keywords: peptide mapping, mass-spectrometry, glycosylation, fusion proteins, etanercept, Asp-N, Arg-C

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. Valeria G. Varzieva, Natalia V. Mesonzhnik and Anton O. Belushenko conceived, designed and performed the experiments. All authors compiled and analyzed data. All authors reviewed the manuscript and contributed in writing.

Funding. The work was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of a World-Class Research Centers "Digital Biodesign and Personalized Healthcare" № 075-15-2022-304.

For citation: Varzieva V. G., Mesonzhnik N. V., Belushenko A. O., Bochkareva N. L., Appolonova S. A. Double proteolysis for N- and O-glycan analysis of Fc-fusion protein etanercept. *Drug development & registration*. 2023;12(1):95–105. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-95-105

ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных препаратов (ЛП) – терапевтических белков на основе моноклональных антител (мАТ) представляет собой одно из наиболее перспективных направлений фармацевтической промышленности, что обусловлено высокими показателями их клинической эффективности и специфичности при лечении ряда заболеваний. На современном российском фармацевтическом рынке главной является тенденция к регистрации не оригинальных препаратов, а биоаналогов – более дешевых копий популярных зарубежных ЛП [1]. Современные препараты, имеющие в основе своей структуры IgG1, включают моноклональные антитела, биспецифичные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, токсин иммуно-конъюгаты и Fc-слитые белки[1].

В связи с особенностями воспроизводства таких белков в клетках-продуцентах, для их структуры характерно множество пост-трансляционных модификаций (ПТМ), которые возникают естественным об-

[1] Cruz E., Kayser V. Major Classes of Biotherapeutics. In: Ramzan I., editor. Biologics, Biosimilars, and Biobetters: An Introduction for Pharmacists, Physicians, and Other Health Practitioners [Internet]. New York: Wiley; 2020. Available at: http://dx.doi.org/10.1002/9781119564690.ch4. Accessed: 17.11.2022.

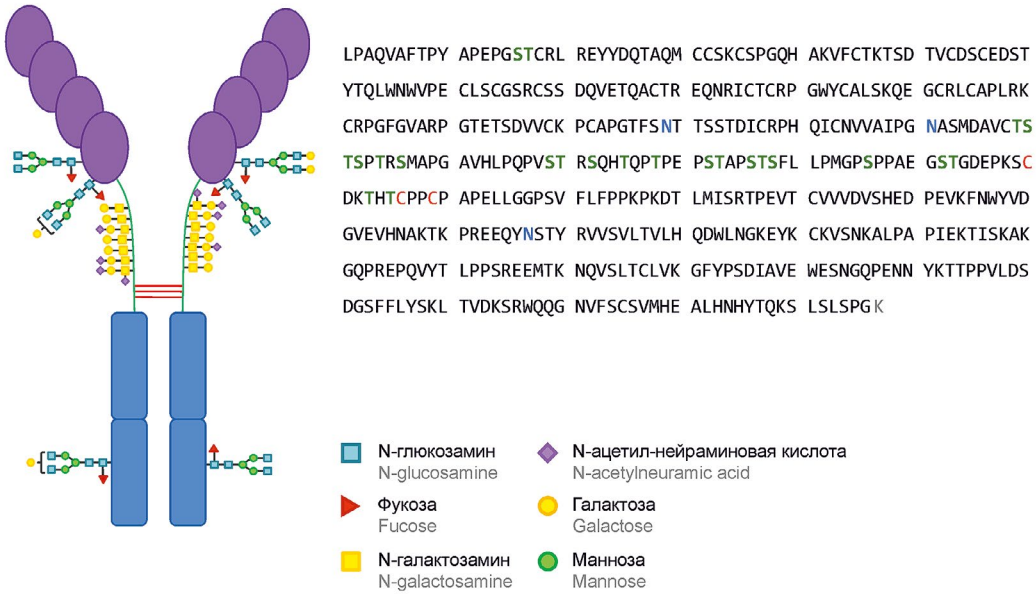


Рисунок 1. Первичная последовательность и дисульфидные связи этанерцепта.

Примечание. В первичной последовательности участки N-гликозилирования обозначены синим цветом; участки O-гликозилирования обозначены зеленым цветом; в наиболее распространенной протеоформе отсутствует С-концевой остаток лизина (выделено серым цветом); цистеины области межмолекулярных дисульфидных связей выделены красным цветом

Figure 1. Etanercept primary sequence and disulfide bonds.

Note. In the primary sequence, N-glycosylation sites are shown in blue; O-glycosylation sites are shown in green; the most common proteoform lacks a C-terminal lysine residue (highlighted in grey); cysteine regions of intermolecular disulfide bonds are highlighted in red

разом[1]. В то же время, они подвержены химическим изменениям в процессе производства и хранения готового ЛП [2]. К таким модификациям относятся окисление, дезамидирование, терминальные варианты аминокислотной последовательности, гликозилирование и др. [3, 4]. Все они могут оказывать сильное влияние на безопасность и эффективность ЛП [5, 6], и, следовательно, должны быть тщательно изучены и описаны.

Большое количество ПТМ является главной причиной того, что основой регистрации биоаналогов служат аналитические исследования, подразумевающие максимально полную характеризацию структуры препарата-кандидата в сравнении с оригинальным ЛП.

В связи с этим, особый интерес представляют Fc-слитые белки, структура которых состоит из эффекторного домена, чаще всего представленного эпитопным участком регуляторного белка, и Fc-фрагмента иммуноглобулина G1 [7]. Такое строение терапевтической молекулы обеспечивает высокую специфичность действия и продленный, в сравнении с молекулой эффекторного белка, период полувыведения. Главной особенностью таких ЛП является наличие множественных участков гликозилирования. Изменения в профиле гликозилирования существенно влияют на фармакокинетические параметры и вероятность развития побочных реакций [8].

Вследствие высокой гетерогенности структуры слитых белков, описание особенностей их молекулярного строения требует разработки подходов, специфичных к конкретному белку.

Этанерцепт (Энбрел, Pfizer, Inc.) представляет собой белок, состоящий из двух молекул внеклеточной лиганд-связывающей части рецептора фактора некроза опухоли альфа (TNFα), каждая из которых сшита с кристаллизующимся фрагментом IgG1 человека (рисунок 1). Рецепторная часть молекулы инактивирует TNFα, препятствуя развитию вызванного этим цитокином воспалительного процесса. Наличие в структуре этанерцепта Fc-фрагмента IgG1 значительно удлиняет его период полувыведения из организма. Область Fc содержит шарнирный участок, связующий константные регионы IgG1 – домены CH2 и CH3, домен CH1 отсутствует [9, 10].

В связи с особенностями производства этанерцепта в клеточных линиях китайского хомячка, конечный продукт представляет собой высокогликозилированный белок. Теоретические участки гликозилирования (рисунок 1) включают: 2 участка N-гликозилирования и 18 участков O-гликозилирования в TNFR-домене, 1 участок N-гликозилирования в Fc-домене. Многообразие числа и видов гликанов опреде-

[1] Colley K. J., Varki A., Haltiwanger R. S., Kinoshita T. Cellular Organization of Glycosylation. In: Essentials of Glycobiology 4th edition [Internet]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579926/ Accessed: 17.11.2022.

ляет макро- и микрогетерогенность структуры этанерцепта [11, 12].

Исследования, направленные на описание гликанового профиля Fc-слитых белков чаще всего проводятся методом пептидного картирования на платформе высокоэффективной жидкостной хроматографии тандемной масс-спекрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) [13–17]. Преимуществом данного метода является возможность характеризации сразу нескольких ПТМ за один анализ [18].

Характеризация гликозилирования с помощью пептидного картирования подразумевает расщепление белка на пептиды перед инструментальным анализом. Для большинства ЛП мАТ, которые содержат консенсусный участок гликозилирования в Fc-регионе, достаточным условием является применение классической протеазы трипсин, расщепляющей аминокислотные связи по а.к. аргинин и лизин в тех случаях, когда за ними не следует пролин. Обильное содержание этой аминокислоты в TNFR-регионе ограничивает возможности эффективного расщепления трипсином на участке R122–R185 последовательности этанерцепта [17]. В результате образуются высокомолекулярные пептиды, содержащие несколько участков гликозилирования.

Для получения меньших по длине и комплексности пептидов прибегают к двойному протеолизу. Такой подход включает использование, помимо трипсина, других протеаз, усиливающих разрывы по характерным для трипсина связям или же имеющих комплиментарность к другим остаткам аминокислот. Наиболее популярными протеазами являются Asp-N, имеющая дополнительную специфичность к аспарагиновой кислоте [19, 20], Lys-C, гидролизующая С-концевые связи с лизином [21] и Glu-C, специфичная к глутаминовой кислоте [22].

В данном исследовании, в качестве альтернативы предложена эндопротеаза Arg-C, гидролизующая аминокислотные связи по С-терминальному участку а.к. аргинин без ограничения по пролину [23]. Для установления ее эффективности, результаты гликопептидного картирования сравнивали с комбинацией трипсина с Asp-N.

Цель исследования: разработка подходов двойного протеолиза, позволяющих провести гликопептидное картирование Fc-слитого белка этанерцепта с использованием протеазы Arg-C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые образцы биологических препаратов перед анализом вынимали из морозильной камеры и размораживали в естественных условиях до температуры окружающей среды.

Подготовка проб. Этанерцепт (Энбрел лиофилизат для приготовления раствора, для подкожного введения 50 мг, срок годности до 02.2023 года, Pfizer, Inc., США) очищали с использованием ультрамембранных фильтров Amicon Ultra 0,5 мл – 30 кДа (Merck Millipore, Германия). Аликвоту ретентанта, содержащую 20 мкг белка в среде 25 мМ ТРИС-буфера (pH 7.5)/0.1 % Rapigest (Waters Corporation, США) термостатировали 15 мин при 80 °С. Дисульфидные связи восстанавливали дитиотреитолом (чистота ≥98 %, Sigma-Aldrich, США) (5 мМ в растворе) в течение 20 мин при 60 °С. Алкилирование проводили с использованием йодацетамида (чистота ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, США) (15 мМ в растворе), 45 мин в темноте.

Для О-гликопептидного картирования предварительно проводили N-дегликозилирование образца гликозидазой F (PNGase F, 10 000 ед/мл, чистота ≥95 %, Promega, США). Аликвоту, содержащую 20 мкг белка, обрабатывали 2 мкл PNGase F (20 мкг белка: 1 мкл PNGase F) 4 часа при 37 °С. N-дегликозилированный белок очищали с использованием ультрамембранных фильтров Amicon Ultra 0,5 мл – 30 кД.

Протеолиз с использованием трипсина (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США) проводили в среде 50 мМ бикарбоната аммония (pH 7.8) при соотношении фермент : субстрат 1 : 20 (w/w), в течение 4 часов при 37 °С. После трипсинолиза дополнительно проводили второе ферментативное расщепление с использованием Arg-C (Arg-C, Seq. Grade, Promega, США) или Asp-N (Asp-N, Seq. Grade, Roche, Германия).

Для Arg-C протеолиза предварительно в реакционную смесь добавляли ДТТ до концентрации восстанавливающего реагента – 5 мМ. Гидролиз проводили в течение 4 часов при 37 °С. Соотношение фермент : субстрат составляло 1 : 20 (w/w).

Протеолиз Asp-N проводили при соотношении фермент : субстрат 1 : 20 (w/w), в течение 16 часов, 37 °С.

Ферментативные реакции терминировали закислением pH среды, центрифугировали и переносили надосадочную жидкость в виалы для инструментального анализа.

Основное оборудование. Хроматограф жидкостной Waters Acquity UPLC с квадроуполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором Xevo G2-XS QTof (Waters Corporation, США).

Программно-аппаратный комплекс сбора и обработки результатов MassLynx Software версии 4.1 (Waters Corporation, США).

Данные обрабатывались с помощью ПО UNIFI (версия 1.8) с опцией для биофармацевтических исследований (Waters Corporation, США) в автоматическом и ручном режиме. Аннотация модифицированных пептидов осуществлялась по диагностическим B- и Y-ионам гликанов, а.к. последовательность подтверждалась по соотнесению сиквенс-специфичных b- и y-ионов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ О-гликопептидов этанерцепта

Для уменьшения комплексности образцов предварительно гидролизу трипсин/Arg-C было проведено удаление N-гликанов с помощью эндогликозидазы PNGase F.

Фрагментные масс-спектры в MS^E-режиме образованы диссоциацией активированной соударениями с инертным газом, что позволяет идентифицировать принадлежность пептида к гликозилированному виду по присутствию специфичных фрагментов остатков сахаров, оксониум-ионов [24, 25]. Как показано на рисунке 2 и в таблице 1 после ВЭЖХ-МСВР анализа исследуемого гидролизата было обнаружено 4 вида O-гликозилированных пептидов, три из которых локализованы в связующем регионе (T18, T19, T22) и один в области эффекторного домена этанерцепта (T1). Спектры MS^E обнаруженных гликопептидов исследовались вручную для подтверждения постулируемых структур.

Идентифицированные виды гликопептидов этанерцепта содержат O-гликаны с ядром типа 1 (C1) состава H1N1–Ser/Thr, удлиненного одной или двумя остатками сиаловой кислоты (рисунок 2). Пептиды LPAQVAFTPYAPEPGSTCR (T1), SMAPGAVHLPQPVSTR (T19) и THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK (T245) являются продуктами разрыва по специфичным трипсину связями, были идентифицированы ранее в комбинированных гидролизатах [17, 20]. O-гликопептид T1 имеет три потенциальных участка гликозилирования, которые представлены O-гликановыми формами N1H1S1 и N1H1S1 в положении T8 [26]. Пептид T19 имеет три потенциальных участка. Два участка гликозилированы в положениях S186, S199, S200 [17] структурами N1H1S1, N1/N1H1S1, N1H1/N1H1S1 и N1H1S1/N1H1S1. Гликопептиды T22 шарнирного региона представлены видами N1H1S1 и N1H1S2, которые располагаются на единственном участке T245. Согласно предыдущим исследованиям O-гликозилирование шарнирной области не было описано для IgG1, в то время как для Fc-слитых белков сообщалось о присутствии нескольких модифицированных участков [15–17, 20].

Пептиды T18 являются продуктами Arg-C-расщепления и гликозилированы формами N1H1S1 и N1H1S2. В исследовании [17] были идентифицированы три формы триптического пептида C(121)–R(185), содержащие единственное ядро C1 после десиалирования образцов. Вследствие высокой молекулярной массы исследуемого пептида, а также наличия множественных остатков пролина достоверно установить участок O-гликозилирования в исследовании [17] не удалось.

В ферментативном гидролизате Arg-C пептид T18 представлен в свободном и гликозилированном видах. На рисунке 3 представлены комбинированные MS^E-фрагментные спектры деконволюции пептида T18 (А) и его гликозилированного варианта (Б). Серии b- и y-ионов обоих фрагментных спектров подтверждают аминокислотную последовательность T18. Как показано на рисунке 3 (Б) фрагментация молекулярного иона гликопептида T18 (RT 24.12, *m/z* 1180.8611, 3^+) демонстрирует присутствие гликана по характер-

Таблица 1. Идентификация O-гликопептидов этанерцепта

Table 1. Etanercept O-glycopeptides identification

	Пептид/вид O-гликозилирования Peptide/O-glycosylation type	**Состав** Content	**RT**	**$[M+H]^+$** **(Δppm)**	**b/y**
T1	LPAQVAFTPYAPEPGSTCR	н/м n/m	24.71	2062.0062(0.0)	29
	LPAQVAFTPYAPEPGSTCR	N1H1S1	23.88	2718.2364(0.9)	12
	LPAQVAFTPYAPEPGSTCR	N1H1S2	23.75	3009.3310(0.6)	13
T18	PHQICNVVAIPGN*ASMDAVCTSTSPTR	н/м n/m	23.72	2884.3421(1.2)	39
	PHQICNVVAIPGN*ASMDAVCTSTSPTR	N1H1S1	24.12	3540.5687(0.7)	28
	PHQICNVVAIPGN*ASMDAVCTSTSPTR	N1H1S2	25.06	3831.6641(0.6)	18
T19	SMAPGAVHLPQPVSTR	н/м n/m	19.63	1647.8623(-0.7)	4
	SMAPGAVHLPQPVSTR	N1H1/N1H1S1	18.83/19.33	2669.2248(0.5) 2669.2237(0.1)	10/9
	SMAPGAVHLPQPVSTR	N1/N1H1S1	20.02	2507.1713(0.3)	8
	SMAPGAVHLPQPVSTR	N1H1S1/N1H1S1	20.23	2960.3213(0.9)	12
	SMAPGAVHLPQPVSTR	N1H1S1	20.73	2304.0920(0.4)	10
T22	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	н/м n/m	31.35	2844.4581(0.2)	36
	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	N1H1S1	32.90	3500.6875(0.7)	29
	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	N1H1S2	34.74	3791.7825(0.5)	12

Примечание. Моноизотопные массы ($M+H^+$) получены с использованием алгоритма MaxEnt 3, реализованным в ПО UNIFI. Времена удерживания соответствуют вершине пика выделенной ионной хроматограммы для каждого иона-прекурсора. Символом «*» отмечены участки аспарагина, дезамидированного в аспарагиновую кислоту после удаления N-гликанов. Сокращение «н/м» – немодифицированный пептид.

Note. Monoisotopic masses ($M+H^+$) were obtained using the MaxEnt 3 algorithm implemented in the UNIFI software. The retention times correspond to the top of the peak of the isolated ion chromatogram for each precursor ion. The symbol "*" marks the areas of asparagine deamidated to aspartic acid after the removal of N-glycans. The abbreviation "n/m" is an unmodified peptide.

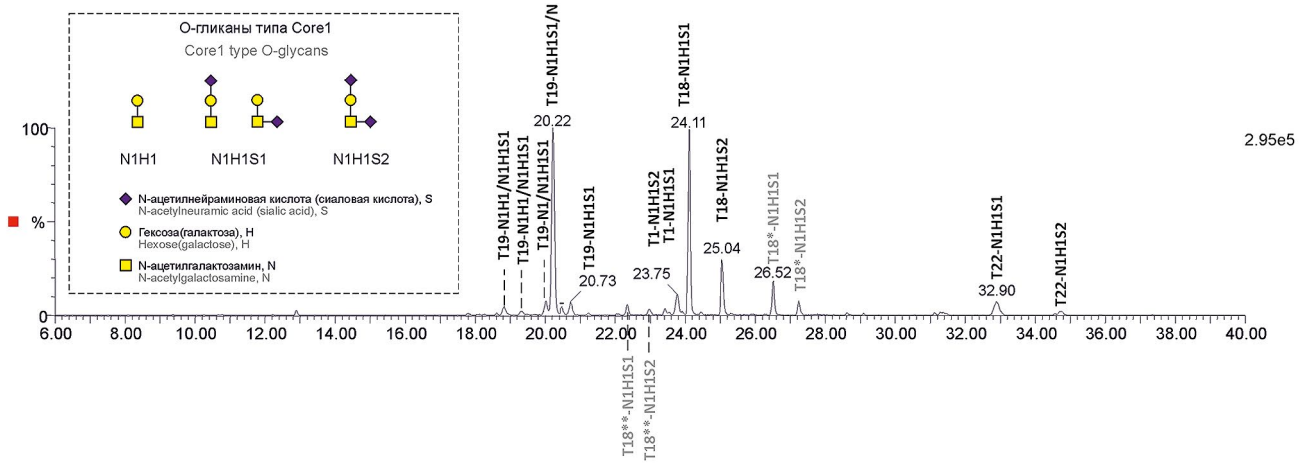


Рисунок 2. Масс-хроматограмма оксониум-ионов остатков моносахаридов (204.087$^+$, 366.14$^+$, 274.092$^+$, 292.103$^+$, 657.235$^+$, 819.288, 0.005 ppm), полученная после ВЭЖХ-МСВР анализа гидролизата трипсин/Arg-C + PNGase F.

Примечание. Оксониевые ионы с *m/z* = 204 и 366 соответствуют общим структурам [HexNAc]$^+$ и [HexHexNAc]$^+$ соответственно. Ионы с *m/z* = 292, 274 и 657 соответствуют сиалированным видам [Neu5Ac]$^+$, [Neu5Ac-H2O]$^+$ и [HexNAcHexNeu5Ac]$^+$. Символом «*» отмечены пептиды образованные разрывом связи H160/Q161

Figure 2. Mass chromatogram of oxonium ions of monosaccharide residues (204.087$^+$, 366.14$^+$, 274.092$^+$, 292.103$^+$, 657.235$^+$, 819.288, 0.005 ppm) obtained after HPLC-HRMS analysis of trypsin/Arg-C + PNGase F hydrolyzate.

Note. Oxonium ions with *m/z* = 204 and 366 correspond to the general structures [HexNAc]$^+$ and [HexHexNAc]$^+$, respectively. Ions with *m/z* = 292, 274 and 657 correspond to the sialylated species [Neu5Ac]$^+$, [Neu5Ac-H2O]$^+$ and [HexNAcHexNeu5Ac]$^+$. The symbol "*" marks the peptides formed by the cleavage of the H160/Q161 bond

ным низкомолекулярным оксониум-ионам *m/z* 204 (HexNAc$^+$), *m/z* 366 (HexHexNAc$^+$) и *m/z* 274 (NeuAc$^+$). Пики $[M + H]^+$ ионов 3249.4744 а.е.м., 3087.84207 а.е.м. и 2884.3401 а.е.м. свидетельствуют о разрывах Y-типа и наличии в структуре пептида моносиалированного гликана состава N1H1S1. На расположение гликозилированного участка в позиции T26 пептида (T184 а.к. цепи этанерцепта) указывает присутствие y_3-иона, кэппированного остатком HexNAc и видов с последовательным удлинением углеводной цепи остатками гексозы и нейраминовой кислоты.

Два дополнительных пика, обозначенных на рисунке 2 символом «*» представляют собой укороченные варианты пептида T18 по дополнительному участку H160/Q161. Набор гликозилированных по участку T184 вариантов пептида Q161–M174 идентичен полноразмерному пептиду.

Гликопептиды высокогликозилированного региона TNFRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPSPPAEGSTGDE PK идентифицированы не были, что согласуется с литературными данными [20]. Данный участок может содержать до 11-ти потенциальных сайтов O-гликозилирования, и был идентифицирован только после предварительного отщепления терминальных сиаловых кислот [17, 27].

Отсутствие гликозилирования на некоторых потенциальных участках можно объяснить конформационными особенностями белка. В ходе «сборки» гликанов в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи часть сайтов гликозилирования может оказаться недоступной для ферментов синтеза гликанов, а, следовательно, участки остаются незанятыми.

Для сравнения эффективности подхода трипсин/Arg-C был проведен ферментативный гидролиз с использованием комбинации трипсин/Asp-N. На рисунке 4 представлены данные относительного содержания O-гликопептидов этанерцепта, полученные при разных способах протеолиза.

Пептиды T1/D1 и T22/D34 показали наименьшую выраженность сиалирования. Относительное содержание гликозилированных форм T1/D1 суммарно составляло 5.9 % (Asp-N) и 6.6 % (Arg-C), гликозилированных видов T22 – 5.4 % (Asp-N) и 6.3 % (Arg-C). Более половины видов пептидов T18/D28 было гликозилировано согласно полученным данным: 46.7 % N1H1S1 и 11.2 % N1H1S2 для протеолиза Asp-N, 48.6 % N1H1S1 и 11.4 % N1H1S2 для протеолиза Arg-C. Агликон пептида T19/D29 детектировался на уровне менее 0.1 % при использовании обоих подходов. При этом наиболее выраженными были дважды гликозилированные виды данного гликопептида: N1H1S1/N1H1S1 64.6 % (Asp-N) или 67.6 % (Arg-C) и N1H1/N1H1S1 17.4 % (Asp-N) или 16.4 (Arg-C).

Следует отметить, что пептиды с дополнительным участком разрыва в положении H160/Q161 наблюдались также и в Asp-N/трипсин гидролизатах этанерцепта.

N-гликопептидное картирование

Исследование участков N-гликозилирования проводилось без предварительного десиалирования для возможности идентификации N-гликанов этанерцепта в нативном состоянии.

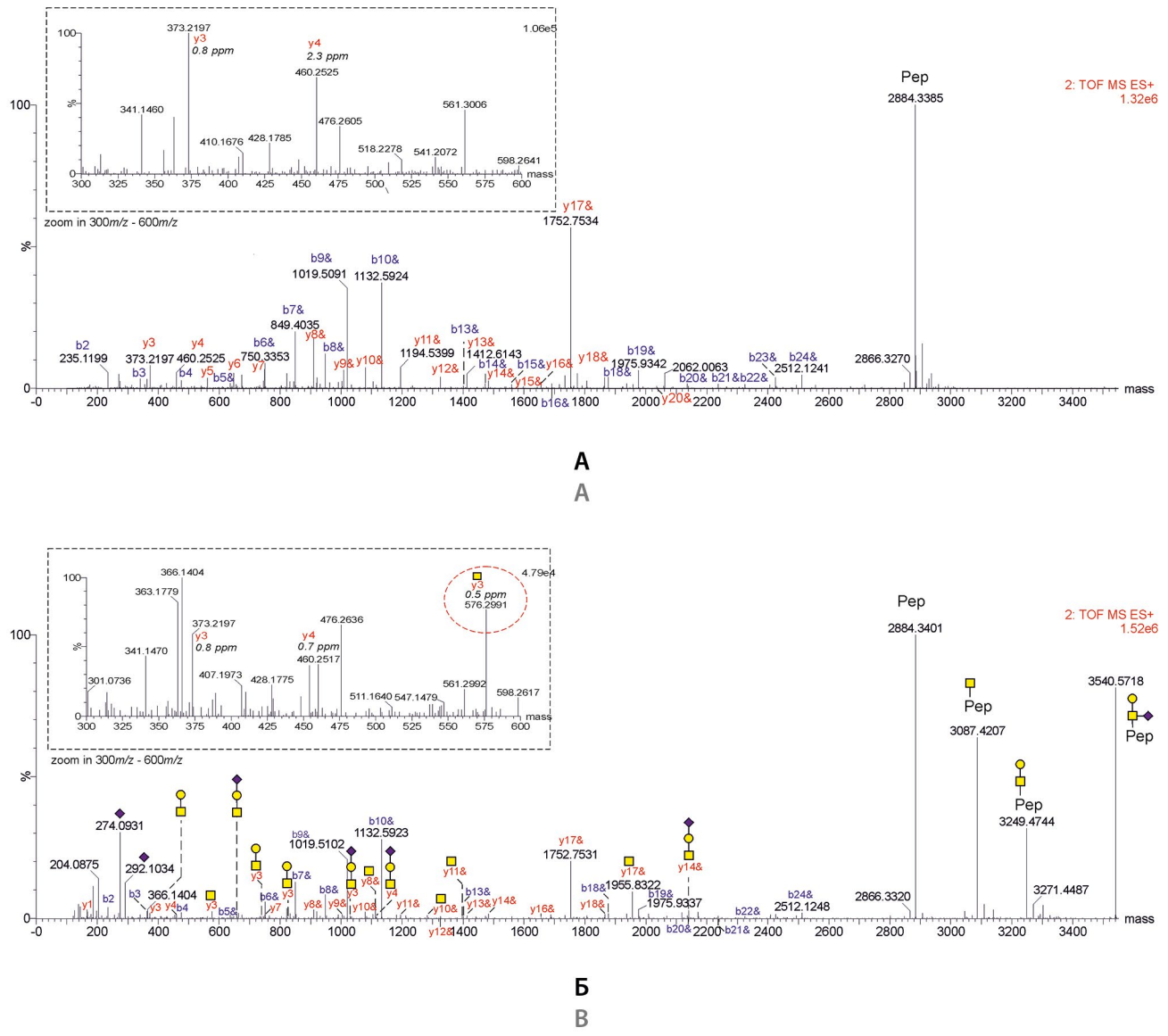


Рисунок 3. Комбинированные MS^E-спектры деконволюции пептида T18 (А) и его гликозилированного варианта (Б) в гидролизате Arg-C

Figure 3. Combined MS^E deconvolution spectra of T18 peptide (A) and it's glycosylated variant (B)

Fc-домен этанерцепта гликозилирован на участке N317, включенном в состав пептида EEQYNSTYR. Пептиды TNFR-региона, полученные в результате трипсин/Arg-C гидролиза, PGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICR и PHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTR, гликозилированы в положениях N149 и N171 соответственно. Список идентифицированных гликопептидов гидролизата трипсин/Arg-C представлен в таблице 2.

Профиль N-гликозилированных пептидов N-317 типичен для Fc-фрагмента большинства моноклональных антител, где основные типы гликанов представляют собой преимущественно несиалированые формы и однократно сиалированнный дигалактозилированный гликан G2F + S1. Обнаруженные гликановые структуры TNFR наоборот представляли в основном сиалированные виды. Участок N149 в большей степени гликозилирован афукозилированными, сиалированными гликанами и их вариантами, содержащими фукозу на первичном остатке N-ацетилглюкозамина. При использовании предложенного подхода с Arg-C на участке N149 была идентифицирована однократно галактозилированная и сиалированная гликоформа (G1F + S1), о присутствии данного вида гликозилирования так же сообщалось в предыдущих исследованиях [19, 20].

Особенностью подхода трипсин/Arg-C является идентификация пептидов, содержащих одновременно N-гликозилированный участок N171 и O-гликозилированный участок T184. На рисунке 5 представлена точная масс-хроматограмма выделенных максимальных ионов гликопептидов N171.

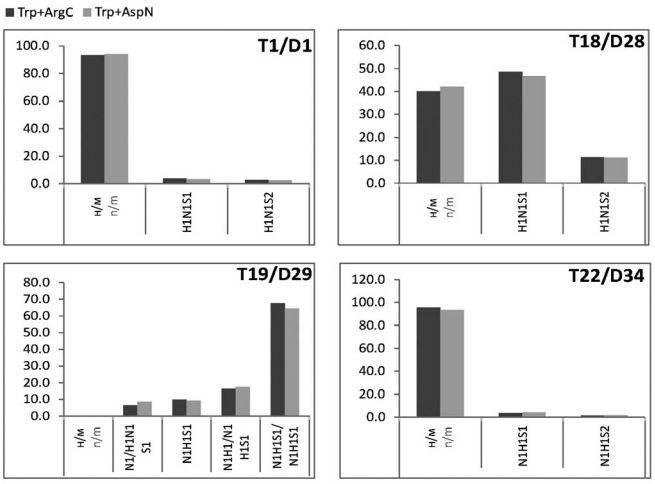


Рисунок 4. Относительное содержание О-гликозилированных участков этанерцепта в комбинированных гидролизатах трипсин/Arg-C и трипсин/Asp-N

Figure 4. Relative content of O-glycosylated sites in combined hydrolyzites trypsin/Arg-C and trypsin/Asp-N

Таблица 2. Гликоформы пептидов этанерцепта, идентифицированные в гидролизатах трипсин/Arg-C

Table 2. Etanercept glycopeptides, identified in trypsin/Arg-C hydrolisates

Вид Type	$[M+H]^+$ (Δppm), RT (мин) $[M+H]^+$ (Δppm), RT (min)			
	EEQYNSTYR	PGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICR	PHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTR	
	N317	N-149	N-171	N-171/T-184
Man5	2405.9311(-1.6), 6.64	4361.7995(-2.4), 17.17	4099.7709(-1.6), 21.13	4755.9954(-2.0), 22.07* _&
G0	2487.9857(-0.9), 7.02	4443.8511(-2.7), 17.23	–	–
G0-GN	2284.9039(-2.1). 7.02		–	–
G0F	2634.0443(-0.6), 7.27	4589.9069(-3.1), 17.17	4327.8793(-2.1), 21.23	4984.1061(-2.0), 22.14* 5275.2045(-1.3), 23.58&
G0F-GN	2430.9633(-1.3), 7.27		4124.8020 (-1.7), 21.23	4781.8102(-2.5), 22.11* 5072.1248(-1.4), 23.66&
G1	2650.0383(-0.9), 7.03	4605.9035(-2.7), 17.16	–	–
G1-GN	–	4402.8287(-1.8), 17.12	–	–
G1F	2796.0970(-0.6), 7.26	4751.9623(-2.4), 17.11	4489.9317(-2.1), 21.20	5146.1614(-1.5), 22.10* 5437.2547(-1.8), 23.53&
G1F-GN	2593.0171(-0.9), 7.26	4548.8856(-1.9), 17.06	4286.8622(0.1), 21.16	4943.0845(-1.0), 22.06* _&
G1F+S1	–	–	4780.9935 (2.3), 23.21	5437.2540(-1.9),24.23* 5728.3518(-1.4), 25.81&
G2	–	4767.9574(-2.4), 17.12	–	–
G2F	2958.1485(-1.0), 7.28	4914.0169(-2.0), 17.05	4651.9866(-1.6), 21.08	5308.2216(0.0), 21.62* 5599.3065(-1.9), 23.37&
G2+S1	–	5059.0548(-1.8), 18.69	–	–
G2F+S1	3249.2443(-0.8), 9.32	5205.1113(-2.1), 18.61	4943.0766(-2.6), 23.08	5599.3205(0.6), 22.73* 5890.3997(-2.2), 25.63&
G2+S2	–	5350.1521(-1.4), 20.48	–	–
G2F+S2	–	5496.2105(-1.3), 20.37 5496.2252(1.4), 20.75	5234.1790(-1.1), 25.44	5890.4204(1.3), 23.86* 6181.4959(-1.9), 28.21&
G3F+S1	–	4453.7520(-3.4), 17.66	5308.2089(-2.4), 22.34	–
G3F+S2	–	–	5599.3070(-1.8), 25.16	–

Примечание. Моноизотопные массы ($M+H^+$) получены с использованием алгоритма MaxEnt 3, реализованным в ПО UNIFI. Времена удерживания соответствуют вершине пика выделенной ионной хроматограммы для каждого иона-прекурсора. Надстрочными символами отмечены гликопептиды, содержащие дополнительный участок О-гликозилирования в положении Т184 состава N1H1S1 «*» или N1H1S2 «&».

Note. Monoisotopic masses ($M+H^+$) were obtained using the MaxEnt 3 algorithm implemented in the UNIFI software. The retention times correspond to the top of the peak of the isolated ion chromatogram for each precursor ion. Superscript symbols mark glycopeptides containing an additional O-glycosylation site at position T184 of the composition N1H1S1 "*" or N1H1S2 "&".

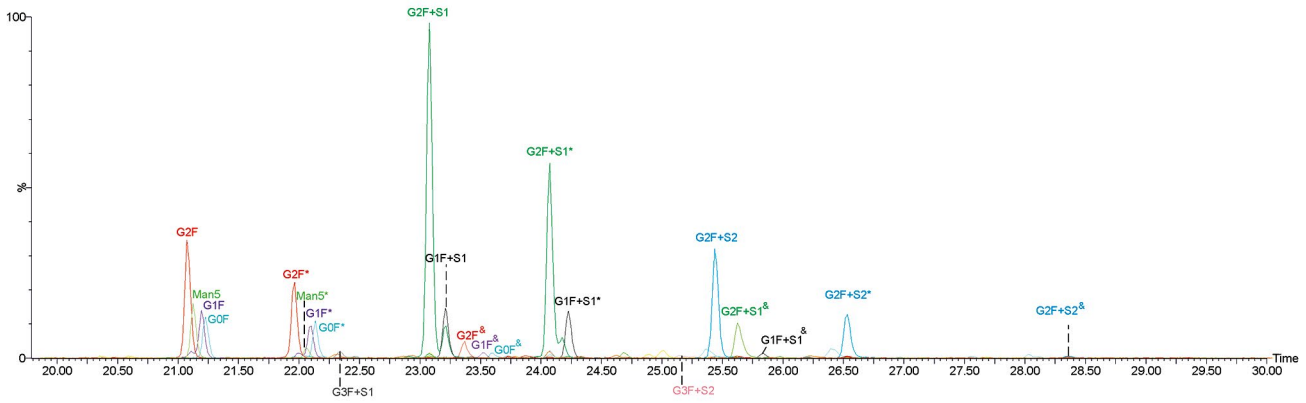


Рисунок 5. **Масс-хроматограмма N-гликопептидов участка N171 гидролизата трипсин/Arg-C.**

Примечание. Символами «*» и «&» обозначены смешанные формы гликопептидов, содержащие дополнительный O-гликан вида N1H1S1 или N1H1S2 соответственно

Figure 5. **Chromatogramm of site N171 N-glycopeptides in trypsin/Arg-C hydrolysite.**

Note. The symbols "*" and "&" denote mixed forms of glycopeptides containing an additional O-glycan of the N1H1S1 or N1H1S2 type, respectively

Образующиеся N-гликопептиды представляли собой формы G2F, моно- и дисиалированные варианты G2F, менее интенсивными вариантами были Man5, G0F, G1F и G1F + S1. Дополнительно были идентифицированы гибриды, представляющие собой те же варианты N-гликопептидов N171 с дополнительным участком O-гликозилирования в положении T184, окупированным видами N1H1S1 (*) и N1H1S2 (&).

Хроматографическое разделение основных гликопептидов N171 на обращенной фазе достигается за счет присутствия терминальных сиаловых кислот, которые сильнее удерживаются и элюируют позднее. Несиалированные формы разделяются в соответствии с количеством галактозных единиц [28, 29].

Согласно данным O-гликопептидного картирования было установлено, что ~40 % пептидов N171 ферментативного гидролизата трипсин/Arg-C представлены в свободном виде, тогда как O-гликозилированные варианты представляли собой ~50 % и ~10 % видов N1H1S1 и N1H1S2 соответственно. Как видно из рисунка 6 данное соотношение сохраняется для гибридных N- и O-гликоформ. Присутствие пептида, содержащего свободный участок T184, позволяет использовать подход трипсин/Arg-C для проведения оценки относительного содержания N-гликоформ участка N171.

Для сравнения эффективности подхода трипсин/Arg-C был проведен ферментативный гидролиз с использованием комбинации трипсин/Asp-N. На рисунке 7 приведены данные оценки относительного содержания гликозилированных форм пептидов этанерцепта, идентифицированных в образцах, полученных при различных способах ферментолиза.

Результаты количественной оценки профилей N-гликозилированных участков этанерцепта с использованием двух подходов демонстрируют сходные результаты. Следует отметить, что для оценки N-гликопептидов N171 в гидролизате трипсин/Arg-C использовался пептид, не содержащий O-гликанов.

Разработанный подход может стать альтернативой классическим методам проведения ферментативного гидролиза для пептидного картирования. Преимуществом использования Arg-C служит ее большая коммерческая доступность в сравнении с Asp-N. При этом разработанный подход обладает схожей эффективностью ферментолиза и достоверностью результатов.

Из данных следует, что эффективность идентификации отдельных сайтов гликозилирования методом ВЭЖХ-МСВР затрудняется с увеличением числа гликозилированных сайтов, включенных в индиви-

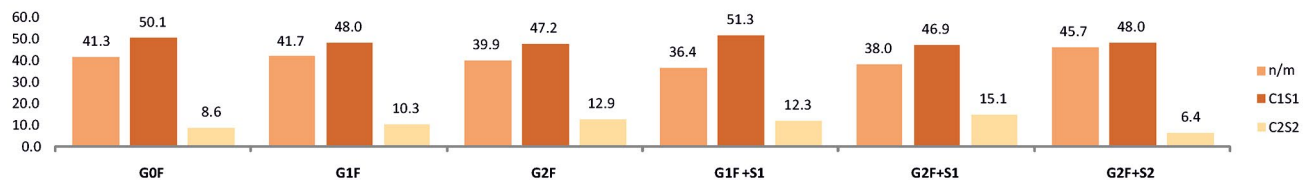


Рисунок 6. **Соотношение O-гликозилированных форм на участке T184 с указанием формы N-гликана N171**

Figure 6. **The ratio of O-glycosylated forms at the T184 site indicating the form of N-glycan N171**

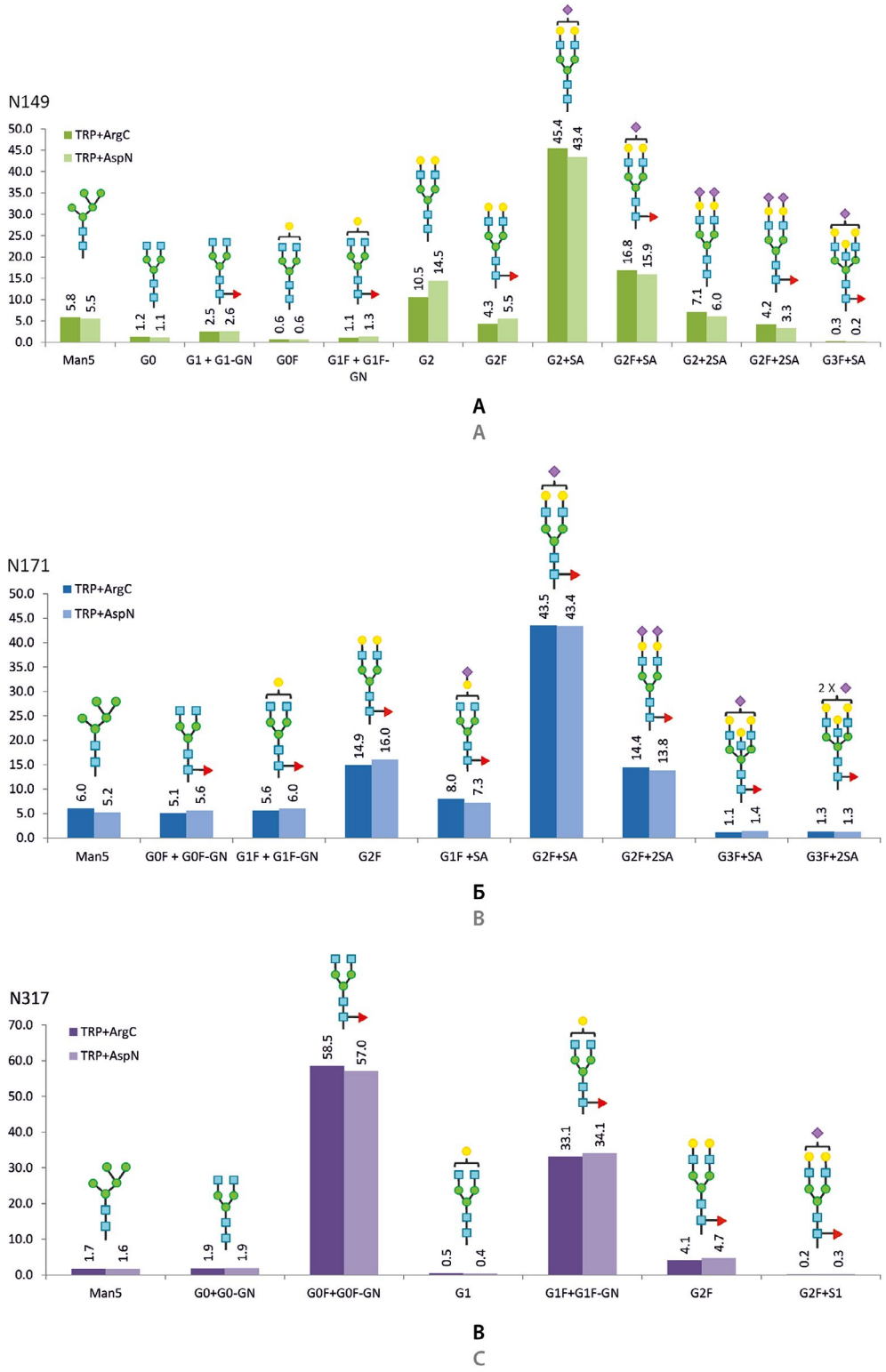


Рисунок 7. Сравнение относительного количества (%) гликозилированных форм пептидов этанерцепта, содержащих участки гликозилирования в положениях N149 (А), N171 (Б), N317 (В), в ферментативных гидролизатах

Figure 7. Comparison of relative content (%) of peptides, glycosylated at N149 (A), N171 (B), N317 (C) sites obtained using both approaches

дуальный пептид. Использование комбинаций трипсина и эндопротеиназ минимизирует комплексность образцов. Ограничением подхода трипсин/Arg-C является образование N/O-гликозилированного пептида. Однако после проведения предварительного O-гликопептидного картирования N-гликоформы данного участка могут быть идентифицированы однозначно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами были разработаны подходы гликопептидного картирования, включающие использование комбинации протеаз трипсин и Arg-C, которые позволяют надежно и воспроизводимо определять локализацию участков и формы N- и O-гликозилирования этанерцепта. Результаты научной работы могут использоваться для проведения исследований сопоставимости биоподобных лекарственных средств, оценки качества при изменении технологии производства ЛП, при разработке новых биотехнологических ЛП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kostin K. B., Shanava L. A. Key trends in the development of the Russian pharmaceutical market amidst uncertainty. *Journal of Economics, Entrepreneurship and Law*. 2022;12(5):1639–1658. (In Russ.) DOI: 10.18334/epp.12.5.114635.
2. Fischer S., Hoernschemeyer J., Mahler H.-C. Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(1):42–50. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.04.021.
3. Jefferis R. Posttranslational modifications and the immunogenicity of biotherapeutics. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:5358272. DOI: 10.1155/2016/5358272.
4. Xu Y., Wang D., Mason B., Rossomando T., Li N., Liu D., Cheung J. K., Xu W., Raghava S., Katiyar A., Nowak C., Xiang T., Dong D. D., Sun J., Beck A., Liu H. Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies. *MAbs*. 2019;11(2):239–264. DOI: 10.1080/19420862.2018.1553476.
5. Eon-Duval A., Broly H., Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnology Progress*. 2012;28(3):608–622. DOI: 10.1002/btpr.1548.
6. Kaur H. Characterization of glycosylation in monoclonal antibodies and its importance in therapeutic antibody development. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2021;41(2):300–315. DOI: 10.1080/07388551.2020.1869684.
7. Goffe B., Cather J. C. Etanercept: An overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003;49(2):105–111. DOI: 10.1016/mjd.2003.554.
8. Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(6):1866–1884. DOI: 10.1002/jps.24444.
9. Brockhaus M., Gentz R., Zlatko D., Lesslauer W., Lotscher H., Schlaeger E-J. Human TNF receptor fusion protein. US Patent 8063182. 2011. Available at: https://patents.google.com/patent/US8063182B1/ Accessed: 03.08.2022.
10. Tracey D., Klareskog L., Sasso E. H., Salfeld J. G., Tak P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008;117(2):244–279. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.10.001.
11. Gur A., Oktayoglu P. Advances in biologic agents for the treatment of rheumatoid arthritis. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 2010;9(1):24–34. DOI: 10.2174/187152310790711656.
12. Wohlschlager T., Scheffler K., Forstenlehner I. C., Skala W., Senn S., Damoc E., Holzmann J., Huber C. G. Native mass spectrometry combined with enzymatic dissection unravels glycoform heterogeneity of biopharmaceuticals. *Nature Communications*. 2018;9(1):1713. DOI: 10.1038/s41467-018-04061-7.
13. Fazel R., Guan Y., Vaziri B., Krisp C., Heikaus L., Saadati A., Hidayah S. N., Gaikwad M., Schlüter H. Structural and in vitro functional comparability analysis of Altebrel™, a proposed etanercept biosimilar: Focus on primary sequence and glycosylation. *Pharmaceuticals*. 2019;12(1):14. DOI: 10.3390/ph12010014.
14. Duivelshof B. L., Murisier A., Camperi J., Fekete S., Beck A., Guillarme D., D'Atri V. Therapeutic Fc-fusion proteins: Current analytical strategies. *Journal of Separation Science*. 2021;44(1):35–62. DOI: 10.1002/jssc.202000765.
15. Zhu L., Guo Q., Guo H., Liu T., Zheng Y., Gu P., Chen X., Wang H., Hou S., Guo Ya. Versatile characterization of glycosylation modification in CTLA4-Ig fusion proteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *MAbs*. 2014;6(6):1474–1485. DOI: 10.4161/mabs.36313.
16. Stavenhagen K., Gahoual R., Dominguez Vega E., Palmese A., Ederveen A. L. H., Cutillo F., Palinsky W., Bierau H., Wuhrer M. Site-specific N- and O-glycosylation analysis of atacicept. *MAbs*. 2019;11(6):1053–1063. DOI: 10.1080/19420862.2019.1630218.
17. Houel S., Hilliard M., Yu Y. Q., McLoughlin N., Martin S. M., Rudd P. M., Williams J. P., Chen W. N- and O-glycosylation analysis of etanercept using liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry equipped with electron-transfer dissociation functionality. *Analytical Chemistry*. 2014;86(1):576–584. DOI: 10.1021/ac402726h.
18. Graf T., Heinrich K., Grunert I., Wegele H., Haberger M., Bulau P., Leiss M. Recent advances in LC-MS based characterization of protein-based bio-therapeutics – mastering analytical challenges posed by the increasing format complexity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;186(113251):113251. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113251.
19. Cho I. H., Lee N., Song D., Jung S. Y., Bou-Assaf G., Sosic Z., Zhang W., Lyubarskaya Y. Evaluation of the structural, physicochemical, and biological characteristics of SB4, a biosimilar of etanercept. *MAbs*. 2016;8(6):1136–1155. DOI: 10.1080/19420862.2016.1193659.
20. Montacir O., Montacir H., Springer A., Hinderlich S., Mahboudi F., Saadati A., Parr M. K. Physicochemical characterization, glycosylation pattern and biosimilarity assessment of the fusion protein Etanercept. *The Protein Journal*. 2018;37(2):164–179. DOI: 10.1007/s10930-018-9757-y.
21. Kleemann G. R., Beierle J., Nichols A. C., Dillon T. M., Pipes G. D., Bondarenko P. V. Characterization of IgG1 immunoglobulins and peptide-Fc fusion proteins by limited proteolysis in conjunction with LC-MS. *Analytical Chemistry*. 2008;80(6):2001–2009. DOI: 10.1021/ac701629v.
22. Yu L., Xiao G., Zhang J., Remmele R. L., Eu M., Liu D. Identification and quantification of Fc fusion peptibody degradations by limited proteolysis method. *Analytical Biochemistry*. 2012;428(2):137–142. DOI: 10.1016/j.ab.2012.06.002.
23. Giansanti P., Tsiatsiani L., Low T. Y., Heck A. J. R. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nature Protocols*. 2016;11(5):993–1006. DOI: 10.1038/nprot.2016.057.
24. Carr S. A., Huddleston M. J., Bean M. F. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry: Analysis of N- and O-linked glycopeptides by LC-MS. *Protein Science*. 1993;2(2):183–196. DOI: 10.1002/pro.5560020207.
25. Huddleston M. J., Bean M. F., Carr S. A. Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests. *Analytical Chemistry*. 1993;65(7):877–884. DOI: 10.1021/ac00055a009.
26. Huang L.-J., Lin J.-H., Tsai J.-H., Chu Y.-Y., Chen Y.-W., Chen S.-L., Chen S.-H. Identification of protein O-glycosylation site and corresponding glycans using liquid chromatography-tandem mass spectrometry via mapping accurate mass and retention time shift. *Journal of Chromatography A*. 2014;1371:136–145. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.046.
27. Srikanth J., Agalyadevi R., Babu P. Targeted, Site-specific quantitation of N- and O-glycopeptides using 18O-labeling and product ion based mass spectrometry. *Glycoconjugate Journal*. 2017;34(1):95–105. DOI: 10.1007/s10719-016-9733-8.
28. Wang B., Tsybovsky Y., Palczewski K., Chance M. R. Reliable determination of site-specific in vivo protein N-glycosylation based on collision-induced MS/MS and chromatographic retention time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2014;25(5):729–741. DOI: 10.1007/s13361-013-0823-6.
29. Kozlik P., Goldman R., Sanda M. Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nano-LC. *Electrophoresis*. 2017;38(17):2193–2199. DOI: 10.1002/elps.201600547.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-106-113
УДК 615.072:322

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Выделение и идентификация агликонов флавоноидов некоторых видов рода *Astragalus* L. флоры Поволжья

У. А. Матвиенко[1]✉, Н. А. Дурнова[1], А. М. Полуянов[2], Н. В. Бобкова[2], В. Н. Туренко[2], В. В. Смирнов[2], Г. В. Раменская[2]

[1] ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ имени В. И. Разумовского» Минздрава России), 410012, Россия, г. Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112
[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:** Матвиенко Ульяна Андреевна. **E-mail:** matvienko.ulia2104@gmail.com

ORCID: У. А. Матвиенко – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165; Н. А. Дурнова – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519;
А. М. Полуянов – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; Н. В. Бобкова – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019;
В. Н. Туренко – https://orcid.org/0000-0003-1817-0844; В. В. Смирнов – https://orcid.org/0000-0002-8232-6682; Г. В. Раменская – https://orcid.org/0000-0001-8779-3573.

Статья поступила: 05.09.2022 **Статья принята в печать:** 23.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Перспективными источниками биологически активных соединений (БАС) являются экстракты, полученные из различных морфологических частей растений многочисленного рода *Astragalus* L. Одними из основных групп БАС, выделенных из растений этого рода, являются флавоноиды, сапонины и полисахариды. Достаточно изученными являются *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge) и *Astragalus mongholicus* Bge., экстракты которых обладают широким спектром фармакологической активности. Расширение номенклатуры лекарственного растительного сырья и исследование групп БАС, определяющих основные фармакологические эффекты, являются актуальными исследованиями в фармакогнозии. С этой точки зрения представляют интерес малоизученные виды астрагала (*Astragalus henningii* (Stev.) Klok., *Astragalus testiculatus* Pall., *Astragalus varius* S.G. Gmel., *Astragalus dasyanthus* Pall.), массово произрастающие на территории Поволжья.

Цель. Выделение и идентификация 5-ти агликонов флавоноидов в гидролизатах водно-спиртовых извлечений из травы астрагала: *A. henningii*, *A. testiculatus*, *A.varius*, *A. dasyanthus* методом ВЭЖХ/УФ.

Материалы и методы. Объектами исследования являлась трава четырех видов астрагала (*A. henningii*, *A. testiculatus*, *A.varius*, *A. dasyanthus*), заготовленная в период массового цветения на территории Саратовской области и высушенная до воздушно-сухого состояния. Для изучения состава фенольных соединений проводили экстракцию 70%-м этиловым спиртом в соотношении сырье : экстрагент (1 : 10) путем настаивания в течение 7 дней. Кислотный гидролиз проводили хлористоводородной кислотой 37 % при нагревании в течение 40 минут. Полученные гидролизаты анализировали на хроматографе Agilent 1260 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором, ручным вводом проб (ручной инжектор Agilent G1328C, Agilent Technologies США) и системой для сбора и обработки хроматографических данных Agilent OpenLab CDS по индивидуально подобранному градиенту элюирования подвижной фазы (0,1%-й раствор ортофосфорной кислоты/ацетонитрил). Соединения в гидролизатах идентифицировали по временам удерживания и УФ-спектрам смеси стандартных образцов (СО): кверцетина, изорамнетина, лютеолина, кемпферола и апигенина.

Результаты и обсуждение. Подобран градиент элюирования для одновременного определения 5 агликонов флавоноидов с единичным временем анализа 13 минут. Данные условия позволили идентифицировать соединения в гидролизатах водно-спиртовых извлечений четырёх видов астрагала. Лютеолин, кверцетин и апигенин обнаружены в гидролизатах *A. henningii, A. testiculatus, A. varius*, изорамнетин и кемпферол обнаружены в *A. henningii* и *A. varius*. Ни один из анализируемых агликонов не найден в гидролизате *A. dasyanthus*.

Заключение. После предварительного подбора оптимальных условий хроматографического разделения смеси 5 агликонов флавоноидов были проанализированы гидролизаты четырех видов астрагала. Полученные данные указывают на перспективность дальнейшего изучения химического состава астрагалов и подтверждают целесообразность их использования для получения новых фитопрепаратов.

Ключевые слова: трава, *A. henningii*, *A. testiculatus*, *A. varius*, *A. dasyanthus*, водно-спиртовые извлечения, ВЭЖХ, агликоны флавоноидов

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

Вклад авторов. У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова, Н. В. Бобкова, В. В. Смирнов, Г. В. Раменская планирование эксперимента. У. А. Матвиенко, А. М. Полуянов, В. Н. Туренко осуществляли проведение экспериментальных исследований. У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова, А. М. Полуянов, Н. В. Бобкова, В. В. Смирнов, Г. В. Раменская участвовали в написании текста статьи, в том числе заключения и обсуждения результатов.

Для цитирования: Матвиенко У. А., Дурнова Н. А., Полуянов А. М., Бобкова Н. В., Туренко В. Н., Смирнов В. В., Раменская Г. В. Выделение и идентификация агликонов флавоноидов некоторых видов рода *Astragalus* L. флоры Поволжья. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):106–113. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-106-113

Isolation and Identification of Aglicones of Flavonoids of Some Species of the Genus *Astragalus* L. of the Volga Region Flora

Uliana A. Matvienko[1]✉, Natalya A. Durnova[1], Andrey M. Poluyanov[2], Natalya V. Bobkova[2], Vladislav N. Turenko[2], Valery V. Smirnov[2], Galina V. Ramenskaya[2]

© Матвиенко У. А., Дурнова Н. А., Полуянов А. М., Бобкова Н. В., Туренко В. Н., Смирнов В. В., Раменская Г. В., 2023
© Matvienko U. A., Durnova N. A., Poluyanov A. M., Bobkova N. V., Turenko V. N., Smirnov V. V., Ramenskaya G. V., 2023

[1] Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky (Razumovsky University), 112, B. Kazachya str., Saratov, 410012, 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:** Uliana A. Matvienko. **E-mail:** matvienko.ulia2104@gmail.com

ORCID: Uliana A. Matvienko – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165; Natalya A. Durnova – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519; Andrey M. Poluyanov – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; Natalya V. Bobkova – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019; Vladislav N. Turenko – https://orcid.org/0000-0003-1817-0844; Valery V. Smirnov – https://orcid.org/0000-0002-8232-6682; Galina V. Ramenskaya – https://orcid.org/0000-0001-8779-3573.

Received: 05.09.2022 **Revised:** 23.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Promising sources of biologically active compounds (BAS) are extracts obtained from various morphological parts of plants of the numerous genus *Astragalus* L. One of the main groups of BAS isolated from plants of this genus are flavonoids, saponins, and polysaccharides. Sufficiently studied are *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge) and *Astragalus mongholicus* Bge., whose extracts have a wide range of pharmacological activity. Expansion of the nomenclature of medicinal plant materials and the study of BAS groups that determine the main pharmacological effects are topical studies in pharmacognosy. From this point of view, little-studied species of *Astragalus* (*Astragalus henningii* (Stev.) Klok., *Astragalus testiculatus* Pall., *Astragalus varius* S.G. Gmel., *Astragalus dasyanthus* Pall.), massively growing in the Volga region, are of interest.

Aim. Isolation and identification of 5 aglycones of flavonoids in hydrolysates of water-alcohol extracts from *Astragalus* herb: *A. henningii*, *A. testiculatus*, *A.varius*, *A. dasyanthus* by HPLC/UV.

Materials and methods. The objects of the study were the herb of four types of *Astragalus* (*A. henningii*, *A. testiculatus*, *A.varius*, *A. dasyanthus*), harvested during the period of mass flowering in the Saratov region and dried to an air-dry state. To study the composition of phenolic compounds, extraction was carried out with 70 % ethanol in the ratio of raw material : extracting agent 1 : 10 by infusion for 7 days. Acid hydrolysis was carried out with hydrochloric acid 37 % with heating for 40 min. The resulting hydrolysates were analyzed on an Agilent 1260 chromatograph (Agilent Technologies, USA) with a diode array detector, manual sample injection (Agilent G1328C manual injector, Agilent Technologies, USA) and an Agilent OpenLab CDS chromatographic data collection and processing system using an individually selected elution gradient of the mobile phase (0.1 % solution of orthophosphoric acids/acetonitrile). Compounds in the hydrolysates were identified by the retention times and UV spectra of a mixture of reference standards (RS) of quercetin, isorhamnetin, luteolin, kaempferol, and apigenin.

Results and discussion. An elution gradient was selected for one time determination of 5 aglycones of flavonoids with a single analysis time of 13 minutes. These conditions made it possible to identify compounds in the hydrolyzates of water-alcohol extracts of four types of *Astragalus*. Luteolin, quercetin and apigenin were found in hydrolyzates of *A. henningii*, *A. testiculatus* and A. varius; isorhamnetin and kaempferol were found in A. henningii and *A. varius*. None of the analyzed aglycones was found in the *A. dasyanthus* hydrolyzate.

Conclusion. After preliminary selection of the optimal conditions for the chromatographic separation of a mixture of 5 aglycones of flavonoids, hydrolysates of four types of *Astragalus* were analyzed. The data obtained indicate the prospects for further study of the chemical composition of *Astragalus* and confirm the expediency of their use for obtaining of new herbal remedies.

Keywords: grass, *A. henningii*, *A. testiculatus*, *A. varius*, *A. dasyanthus*, hydroalcoholic extracts, HPLC/UV, flavonoid aglycones

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. Uliana A. Matvienko, Natalya A. Durnova, Natalya V. Bobkova, Valery V. Smirnov, Galina V. Ramenskaya planning of the experiment. Uliana A. Matvienko, Andrey M. Poluyanov, Vladislav N. Turenko carried out experimental studies. Uliana A. Matvienko, Natalya A. Durnova, Andrey M. Poluyanov, Natalya V. Bobkova, Valery V. Smirnov, Galina V. Ramenskaya participated in writing the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

For citation: Matvienko U. A., Durnova N. A., Poluyanov A. M., Bobkova N. V., Turenko V. N., Smirnov V. V., Ramenskaya G. V. Isolation and identification of aglicones of flavonoids of some species of the genus *Astragalus* L. of the Volga region flora. *Drug development & registration*. 2023;12(1):106–113. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-106-113

ВВЕДЕНИЕ

Род Астрагал (*Astragalus* L.), принадлежащий к семейству *Fabaceae*, включает около 3000 видов, распространенных по всему миру [1]. Многочисленные исследования растений рода *Astragalus* указывают на большой интерес к его представителям, как к источникам биологически активных веществ. Экстракты астрагала перепончатого (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge) и астрагала монгольского (*Astragalus mongholicus* Bge.), а также индивидуальные компоненты, выделенные из различных частей этих растений, широко применяются в научной и народной медицине на северо-востоке, севере и северо-западе Китая, а также в Монголии и Корее [2]. Корень астрагала перепончатого включен в Китайскую фармакопею и применяется как тонизирующее и мочегонное средство [3]. Последние исследования показывают, что экстракты корня астрагала перепончатого обладают выраженной биохимической и фармакологической активностью, включая иммуномодулирующую, нейропротекторную [4], противоопухолевую [5, 6], кардиопротекторную, антиоксидантную и другие активности [7, 8]. Известно применение настоя травы астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) в качестве антигипертензивного средства [9].

Однако трава астрагала шерстистоцветкового не включена в ГФ XIV издания, а качество сырья регламентируется устаревшей НД (ФС 42-533-72).

Вторичные метаболиты лекарственных растений играют важную роль в их адаптации к окружающей среде, а также определяют их биологическую активность. У некоторых видов астрагала были найдены и идентифицированы вещества различной химической природы: флавоноиды, сапонины, полисахариды, органические кислоты, аминокислоты, микро- и макроэлементы [10–13]. Однако большая часть видов до сих пор остается не изученной в химическом отношении.

Одним из интересных направлений исследований рода *Astragalus* L. является скрининг фенольных соединений, в частности флавоноидов, обладающих различной биологической активностью [10]. Перспективными в этом отношении могут являться некоторые виды астрагала, широко произрастающие на территории Поволжья (астрагал Хеннинга, астрагал яйцеплодный, астрагал изменчивый и астрагал шерстистоцветковый). Оценка суммарного содержания флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии в траве указанных видов показала, что наибольшее содержание флавоноидов найдено в водно-спиртовом извлечении из травы астрагала Хеннинга, а наименьшее – в извлечении из травы астрагала яйцеплодного [14]. Согласно литературным данным извлечения астрагала изменчивого содержат кверцетин, кемпферол, астрагалин, нарциссин, популин, изорамнетин-3-O-b-D-глюкопиранозид, изокверцетрин [10], у астрагала шерстистоцветкового были найдены кверцетин, кемпферол, изорамнетин, нарциссин, гиперозид [10], в извлечении из травы астрагала яйцеплодного был найден только астрагалин, данные о фенольном составе травы астрагала Хеннинга не найдены. Отсутствие актуальных данных, полученных современными физико-химическими методами, указывает на перспективность настоящего исследования состава фенольных соединений астрагалов.

Цель работы. Выделение и идентификация агликонов флавоноидов (кверцетина, изорамнетина, лютеолина, кемпферола и апигенина) в водно-спиртовых извлечениях из травы астрагала Хеннинга, астрагала яйцеплодного, астрагала изменчивого и астрагала шерстистоцветкового методом ВЭЖХ/УФ после кислотного гидролиза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. СО: кверцетина (≥95,0 %, USP RS, Китай, номер партии R120FO, USP Catalog № 1592409, годен до 06.2022); изорамнетина (99,06 %, Vestenbergsgreuth, Германия, номер партии 100004356, годен до 09.2022 г.); лютеолина (≥98,0 %, Sigma-Aldrich, США, номер партии 0000084920, CAS № 491-70-3, годен до 12.2022 г.); кемпферола (99,67 %, Vestenbergsgreuth, Германия, номер партии 97791112, годен до 01.2023 г.) и апигенина (≥95,0 %, Sigma-Aldrich, США, номер партии 445301/1, CAS № 520-36-5, годен до 12.2022 г.), спирт (ГОСТ Р 51652-2000). Вода деионизированная, ацетонитрил для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (gradient grade, ≥99,9 %, CAS № 75-05-8), кислота ортофосфорная (х.ч., ООО «Авилон-КомпаниХим», Россия), кислота хлористоводородная 37 % (х.ч., ООО «Сигма Тек», Россия).

Объектом исследования являлась высушенные образцы травы астрагала Хеннинга (*A. henningii* (Stev.) Klok.), астрагала яйцеплодного (*A. testiculatus* Pall.), астрагала изменчивого (*A. varius* S.G. Gmel.), астрагала шерстистоцветкового (*A. dasyanthus* Pall.), заготовленные Татищевском районе Саратовской области в июле 2021 года согласно правилам заготовки ЛРС данной морфологической группы. Определение видов проведено по ключу, приведенному в монографии «Флора Нижнего Поволжья. Т.2.» [15]. Сырье было высушено до остаточной влажности не более 12 %. Влажность высушенного сырья была определена с помощью влагомера термогравиметрического (Sartorius AG, Германия).

Для изучения фенольных соединений получали водно-спиртовые извлечения (70 % этиловый спирт) из травы анализируемых видов астрагала путем мацерации в соотношении сырье : экстрагент (1 : 10) в течение 7 дней при комнатной температуре, затем полученные извлечения фильтровали (красная лента). Полученные экстракты представляли собой извлечения темно-зеленого цвета с характерным запахом.

Методы. Качественное обнаружение агликонов флавоноидов проводили методом ВЭЖХ (Agilent 1260, Agilent Technologies, США), снабженным диодно-матричным детектором, ручным вводом проб (ручной инжектор Agilent G1328C, Agilent Technologies США) и системой для сбора и обработки хроматографических данных Agilent OpenLab CDS.

Хроматографические условия. Колонка Symmetry C18, 5 мкм, 4,6 × 250 мм (Waters Corporation, США). Соотношение компонентов подвижной фазы 0,1%-го раствора ортофосфорной кислоты/ацетонитрила варьировали для лучшего разрешения компонентов смеси, скорость потока элюента изменяли в пределах 0,8–1,0 мл/мин, температура колонки 30 °С, объем вводимой пробы – 20 мкл. Детектирование осуществляли при длине волны λ = 365,4 нм.

Приготовление стандартных растворов (СО). Растворы готовили путем растворения в 96 % этиловом спирте. Содержимое флакона СО переносили в мерную колбу соответствующего объема и доводили до метки 96 % этиловым спиртом. Растворы перемешивали. Получали растворы с содержанием стандартного вещества 1 мг/мл (исходные растворы). Стандартные растворы готовили непосредственно перед анализом путем разбавления исходных растворов водой деионизированной до концентраций 0,1 мг/мл.

Для подбора оптимальных условий хроматографического разрешения компонентов готовили смесь стандартных образцов (СО) индивидуальных веществ: кверцетина, изорамнетина, лютеолина, кемпферола и апигенина с конечной концентрацией каждого из компонентов 0,02 мг/мл.

Подготовка пробы анализируемых образцов. Все водно-спиртовые извлечения подвергали кислотному гидролизу. Для проведения кислотного гидролиза 10 мл извлечения каждого образца помещали в колбу объемом 50 мл, добавляли 2 мл хлористоводородной кислоты 37 % (pH 1,2) и нагревали на электрической плитке в течение 40 минут. После охлаждения растворы фильтровали, доводили натрия гидроксидом до значения pH 11-12, смешивали со смесью растворителей диэтиловый эфир (3 части) : этилацетат (1 часть) в соотношении 2 : 6 и экстрагировали, органический слой переносили в чашки для выпаривания и выпаривали на электрической плитке при температуре 40 °С. Полученные сухие остатки смывали 2,5 мл этилового спирта 96 %.

Идентификацию индивидуальных соединений про-водили на основе соответствия временам удерживания и УФ-спектрам стандартных образцов. Анализ смеси СО и каждого анализируемого образца повторяли пятикратно. Ввиду того, что обнаружение агликонов флавоноидов проводили после их кислотного гидролиза, количественную оценку найденных веществ не выполняли.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был подобран оптимальный режим градиентного элюирования (таблица 1) для разделения и идентификации кверцетина, изорамнетина, лютеолина, кемпферола и апигенина в смеси СО (рисунок 1) с общим временем единичного анализа пробы 13 минут.

Таблица 1. Схема градиентного элюирования фенольных соединений

Table 1. The gradient elution mode of phenolic compounds

Время (мин) Time (min)	А (0,1 % раствор ортофосфорной кислоты) (%) A (0.1% phosphoric acid solution) (%)	В (ацетонитрил) (%) B (acetonitrile) (%)	Поток (мл/мин) Flow (ml/min)
0,00	70,00	30,00	1,00
1,00	70,00	30,00	1,00
2,00	60,00	40,00	0,90
5,00	60,00	40,00	0,80
10,00	70,00	30,00	1,00
10,50	30,00	70,00	1,00
11,00	70,00	30,00	1,00
13,00	70,00	30,00	1,00

Для разработанной методики были определены параметры пригодности хроматографической системы (таблица 2).

Подобранная методика также может быть использована для качественной и количественной оценки агликонов флавоноидов в комплексных экстрактах. Количественная оценка агликонов в гидролизатах не дает объективно точного содержания данных веществ в экстрактах, так как при пробоподготовке нельзя точно рассчитать глубину протекания гидролиза, степень перехода агликонов в органические растворители и т. д. Ввиду этого проводили исследование в гидролизатах только качественного состава флавоноидных агликонов.

Обнаружено, что гидролизаты водно-спиртовых извлечений из травы четырех видов астрагала имеют различия в составе фенольных соединений (таблица 3, рисунок 2).

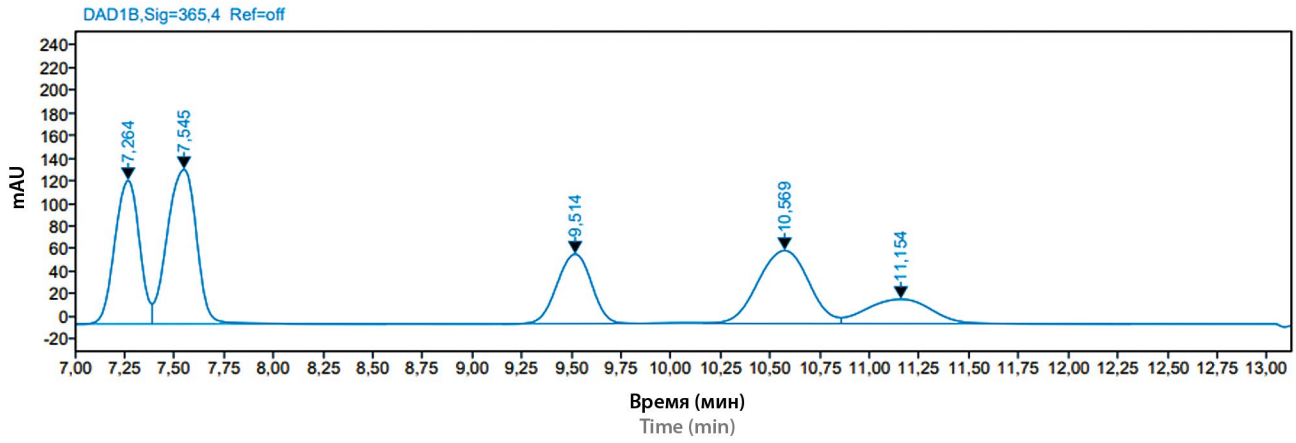


Рисунок 1. Хроматограмма смеси стандартных образцов:
1 – лютеолин (7,256); 2 – кверцетин (7,550); 3 – апигенин (9,508); 4 – кемпферол (10,559); 5 – изорамнетин (11,137)

Figure 1. Chromatogram of a mixture of reference standards:
1 – luteolin (7.256); 2 – quercetin (7.550); 3 – apigenin (9.508); 4 – kaempferol (10.559); 5 – isorhamnetin (11.137)

Таблица 2. **Параметры пригодности хроматографической системы**

Table 2. **Chromatography system suitability parameters**

№	Соединение Compound	Время удерживания (мин) Retention time (min)	Разрешение USP USP approval	Количество теоретических тарелок USP Theoretical plates USP	Коэффициент симметрии Symmetry factor
1	Лютеолин Luteolin	7,256	–	13905	1,30075
2	Кверцетин Quercetin	7,550	1,00992	11248	1,44998
3	Апигенин Apigenin	9,502	5,70840	8222	1,30780
4	Кемпферол Kaempferol	10,560	2,41660	6296	1,41362
5	Изорамнетин Isorhamnetin	11,150	1,01579	5254	1,42015

Лютеолин, кверцетин и апигенин присутствуют в гидролизатах *A. henningii*, *A. testiculatus*, *A. varius*, кемпферол и изорамнетин найдены в гидролизатах *A. henningii, A. varius*.

Найденные агликоны флавоноидов в гидролизатах могут указывать на наличие в нативных экстрактах гликозидов исследуемых соединений, что перспективно с точки зрения их фармакологической активности. Одним из самых ценных агликонов является кемпферол (обнаружен в *A. henningii* и *A. varius*), так как его гликозид астрагалин является биологически активным флавоноидом и проявляет разнообразные фармакологические свойства, например, противовоспалительные, антиоксидантные, нейропротекторные, кардиозащитные, противостеопорозные, противоопухолевые, противоязвенные и противодиабетические [16].

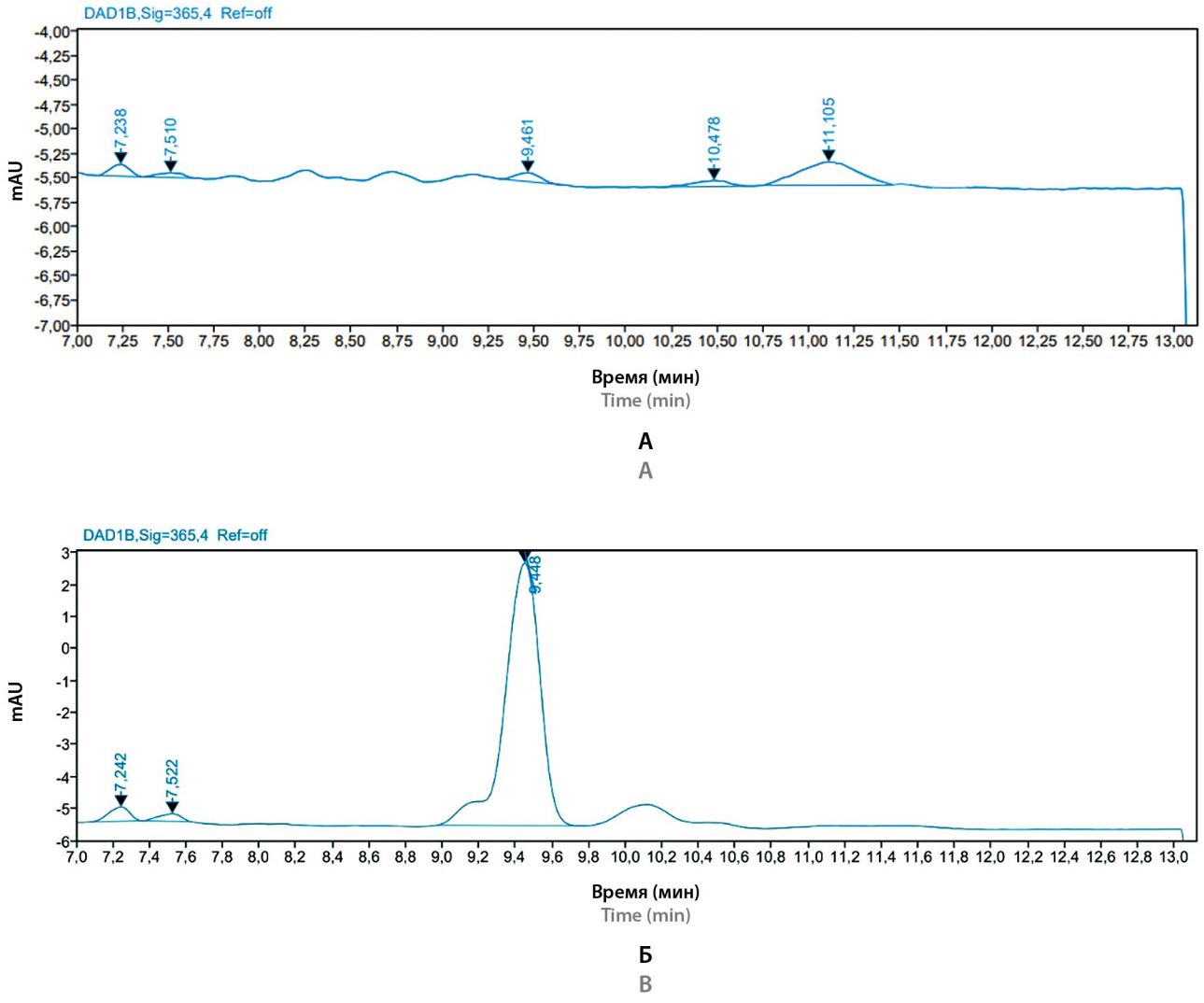
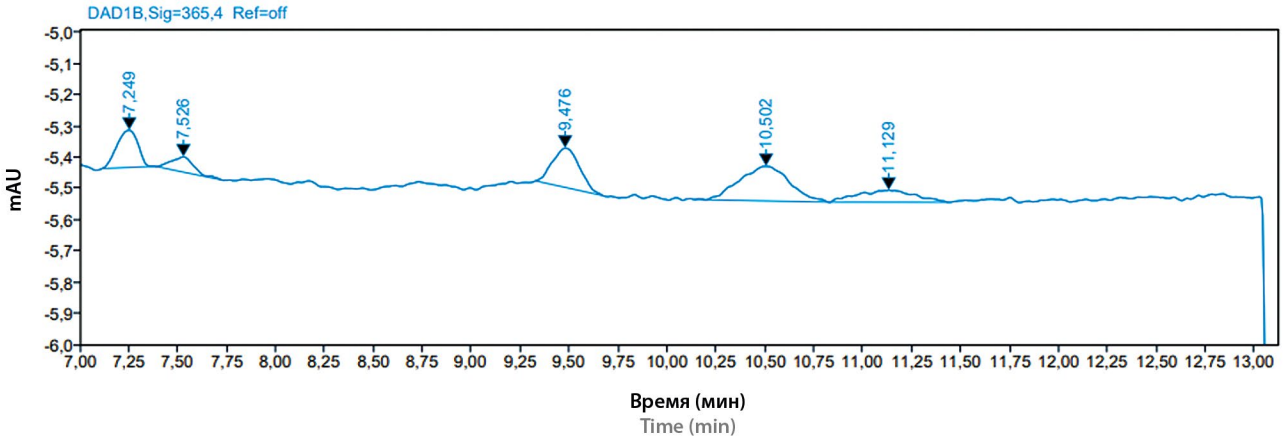
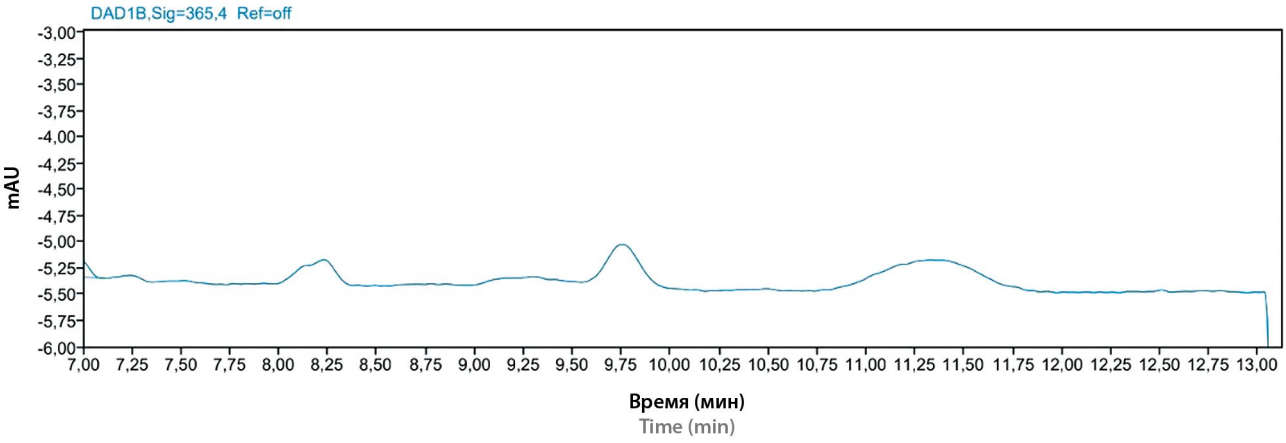


Рисунок 2. **Хроматограммы гидролизатов водно-спиртовых извлечений из травы: А – астрагал Хеннинга; Б – астрагал яйцеплодный**

Figure 2. **Chromatograms of hydrolysates of water-alcohol extracts from of herb: A – *A. henningii*; B – *A. testiculatus***



В
C



Г
D

Продолжение рисунка 2

В – астрагал изменчивай; г – астрагал шерстистоцветковый при 365 нм в системе растворителей. По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – сигнал детектора, единица оптической плотности

Continuation of figure 2

C – *A. varius*; D - *A. dasyanthus* at 365 nm in a solvent system. Abscissa – retention time, min; along the y-axis, the detector signal, the unit of optical density

Обнаружение у астрагала изменчивого кемпферола и кверцетина согласуется с ранее полученными данными [10], а лютеолин, изорамнетин и апигенин выявлены впервые. Обнаруженные ранее у астрагала шерстистоцветкового изорамнетин, кверцетин, кемпферол [10] не найдены при данных условиях выделения, очистки и хроматографирования, однако обнаружены другие соединения, которые не удалось идентифицировать в соответствии со стандартными образцами.

Полученные данные открывают перспективность дальнейшего изучения экстрактов астрагалов (астрагал Хеннинга, астрагал яйцеплодный, астрагал изменчивый и астрагал шерстистоцветковый) и подтверждают целесообразность изучения их фармакологической активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований методом ВЭЖХ/УФ с помощью индивидуально подобранного градиентного режима элюирования для одновременного определения в смеси 5 агликонов флавоноидов получены и проанализированы гидролизаты четырех водно-спиртовых извлечений травы астрагалов, произрастающих на территории Поволжья. В гидролизате водно-спиртового извлечения травы астрагала Хеннинга впервые обнаружены и идентифицированы лютеолин, кверцетин, апигенин, кемпферол и изорамнетин; астрагала яйцеплодного – лютеолин, кверцетин, апигенин; астрагала изменчивого – лютеолин, изорамнетин и апигенин. В

Таблица 3. Характеристика агликонов флавоноидов, обнаруженных в гидролизатах четырех видов астрагала

Table 3. Characteristics of flavonoid aglycones found in hydrolysates of four Astragalus species

№	Соединение Compound	Спектральная характеристика, λ_{max} (нм) Spectral characteristic, λ_{max} (nm)	Время удерживания (мин) Retention time (min)			
			A. henningii	*A. testiculatus*	*A. varius*	*A. dasyanthus*
1	Лютеолин Luteolin	253, 267, 291 пл., 350	7,238	7,242	7,249	–
2	Кверцетин Quercetin	255, 299 пл., 372	7,510	7,522	7,526	–
3	Апигенин Apigenin	268, 338	9,461	9,448	9,476	–
4	Кемпферол Kaempferol	265, 322 пл., 367	10,478	–	10,502	–
5	Изорамнетин Isorhamnetin	255,326 пл., 370	11,105	–	11,129	–

Примечание. «–» соединение не найдено.

Note. «–» compound not found.

гидролизате водно-спиртового извлечения из травы астрагала шерстистоцветкового данные агликоны не были обнаружены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rundel P. W., Huggins T. R., Prigge B. A., Rasoul Sharifi M. Rarity in *Astragalus*: a California perspective. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*. 2015;33(2):111–120. DOI: 10.5642/aliso.20153302.04.
2. Fu J., Wang Z., Huang L., Zheng S., Wang D., Chen S., Zhang H., Yang S. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi). *Phytotherapy Research*. 2014;28(9):1275–1283. DOI: 10.1002/ptr.5188.
3. Sun H., Kang B., Chai Z., Sun H., Du H., Gao J., Feng Q., Zhang C., Cao Q., Guo L. Characterization of root-associated microbiota in medicinal plants *Astragalus membranaceus* and *Astragalus mongholicus*. *Annals of Microbiology*. 2017;67(9):587–599. DOI: 10.1007/s13213-017-1285-z.
4. Abd Elkader H.-T., Essawy A. E., Al-Shami A. S. *Astragalus* species: Phytochemistry, biological actions and molecular mechanisms underlying their potential neuroprotective effects on neurological diseases. *Phytochemistry*. 2022;202:113293. DOI: 10.1016/j.phytochem.2022.113293.
5. Berezutsky M. A., Matvienko U. A., Karetnikova A. Yu., Durnova N. A. Anti-cancer activity of *Astragalus membranaceus* – A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;13(3):206–215. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.03.003.
6. Li S., Sun Y., Huang J., Wang B., Gong Y., Fang Y., Guo Y. Anti-tumor effects and mechanisms of *Astragalus membranaceus* (AM) and its specific immunepotentiation: status and prospect. *Journal of ethnopharmacology*. 2020;258:112797. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112797.
7. Березуцкий М. А., Якубова Л. Р., Дурнова Н. А., Романтеева Ю. В., Белоногова Ю. В., Комарова Е. Э., Шереметьева А. С. Фармакологические свойства препаратов, созданных на основе экстракта астрагала (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(4):20–25. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-4-20-25.
8. Zhang J., Wu C., Gao L., Du G., Qin X. Astragaloside IV derived from *Astragalus membranaceus*: a research review on the pharmacological effects. *Advances in Pharmacology*. 2020;87:89–112. DOI: 10.1016/bs.apha.2019.08.002.
9. Сергалиева М. У., Мажитова М. В., Самотруева М. А. Растения рода Астрагал: перспективы применения в фармации. *Астраханский медицинский журнал*. 2015;10(2):17–31.
10. Bratkov V. M., Shkondrov A. M., Zdraveva P. K., Krasteva I. N. Flavonoids from the genus *Astragalus*: phytochemistry and biological activity. *Pharmacognosy Reviews*. 2016;10(19):11–32. DOI: 10.4103/0973-7847.176550.
11. Ionkova I., Shkondrov A., Krasteva I., Ionkov T. Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of *Astragalus* saponins. *Phytochemistry reviews*. 2014;13(2):343–374. DOI: 10.1007/s11101-014-9347-3.
12. Gorai D., Jash S. K., Roy R. Flavonoids from *Astragalus* genus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2016;7(7):2732–2747. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(7).2732-47.
13. Li X., Qu L., Dong Y., Han L., Liu E., Fang S., Zhang Y. A review of recent research progress on the *astragalus* genus. *Molecules*. 2014;19(11):18850–18880. DOI: 10.3390/molecules191118850.
14. Матвиенко У. А., Фомина Ю. А., Шестопалова Н. Б., Березуцкий М. А., Дурнова Н. А. Спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов некоторых видов рода астрагал. *Фармация*. 2021;70(3):11–16. DOI: 10.29296/25419218-2021-03-02.
15. Решетникова Н. М., ред. Флора Нижнего Поволжья. Раздельнолепестные цветковые двудольные растения (*Crassulaceae-Cornaceae*). Т. 2. Ч. 2. М.: Товарищество научных изданий КМК; 2018. 519 с.
16. Riaz A., Rasul A., Hussain G., Zahoor M. K., Jabeen F., Subhani Z., Selamoglu Z. Astragalin: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in pharmacological sciences*. 2018;2018:15. DOI: 10.1155/2018/9794625.

REFERENS

1. Rundel P. W., Huggins T. R., Prigge B. A., Rasoul Sharifi M. Rarity in *Astragalus*: a California perspective. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*. 2015;33(2):111–120. DOI: 10.5642/aliso.20153302.04.
2. Fu J., Wang Z., Huang L., Zheng S., Wang D., Chen S., Zhang H., Yang S. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi). *Phytotherapy Research*. 2014;28(9):1275–1283. DOI: 10.1002/ptr.5188.
3. Sun H., Kang B., Chai Z., Sun H., Du H., Gao J., Feng Q., Zhang C., Cao Q., Guo L. Characterization of root-associated microbiota in medicinal plants *Astragalus membranaceus* and *Astragalus*

mongholicus. *Annals of Microbiology.* 2017;67(9):587–599. DOI: 10.1007/s13213-017-1285-z.
4. Abd Elkader H.-T., Essawy A. E., Al-Shami A. S. *Astragalus* species: Phytochemistry, biological actions and molecular mechanisms underlying their potential neuroprotective effects on neurological diseases. *Phytochemistry.* 2022;202:113293. DOI: 10.1016/j.phytochem.2022.113293.
5. Berezutsky M. A., Matvienko U. A., Karetnikova A. Yu., Durnova N. A. Anti-cancer activity of *Astragalus membranaceus* – A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research.* 2021;13(3):206–215. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.03.003.
6. Li S., Sun Y., Huang J., Wang B., Gong Y., Fang Y., Guo Y. Anti-tumor effects and mechanisms of *Astragalus membranaceus* (AM) and its specific immunepotentiation: status and prospect. *Journal of ethnopharmacology*. 2020;258:112797. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112797.
7. Berezuckij M. A., Jakubova L. R., Durnova N. A., Romanteeva Ju. V., Belonogova Ju. V., Komarova E. Je., Sheremet'eva A. S. Drugs based on *astragalus* extract and their pharmacological properties (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2020;54(4):20–25. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-4-20-25.
8. Zhang J., Wu C., Gao L., Du G., Qin X. Astragaloside IV derived from *Astragalus membranaceus*: a research review on the pharmacological effects. *Advances in Pharmacology*. 2020;87:89–112. DOI: 10.1016/bs.apha.2019.08.002.
9. Sergalieva M. U., Mazhitova M. V., Samotrueva M. A. Plants of the genus astragalus: prospects of application in pharmacy. *Astrakhanskii meditsinskii zhurnal.* 2015;10(2):17–31. (In Russ.)
10. Bratkov V. M., Shkondrov A. M., Zdraveva P. K., Krasteva I. N. Flavonoids from the genus *Astragalus*: phytochemistry and biological activity. *Pharmacognosy Reviews*. 2016;10(19):11–32. DOI: 10.4103/0973-7847.176550.
11. Ionkova I., Shkondrov A., Krasteva I., Ionkov T. Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of *Astragalus* saponins. *Phytochemistry reviews*. 2014;13(2):343–374. DOI: 10.1007/s11101-014-9347-3.
12. Gorai D., Jash S. K., Roy R. Flavonoids from *Astragalus* genus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2016;7(7):2732–2747. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(7).2732-47.
13. Li X., Qu L., Dong Y., Han L., Liu E., Fang S., Zhang Y. A review of recent research progress on the *astragalus* genus. *Molecules*. 2014;19(11):18850–18880. DOI: 10.3390/molecules191118850.
14. Matvienko U. A., Fomina Ju. A., Shestopalova N. B., Berezuckij M. A., Durnova N. A. Spectrophotometric determination of the amount of flavonoids in some *Astragalus* species. *Farmatsiya*. 2021;70(3):11–16. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-03-02.
15. Reshetnikova N. M., editor. Flora of the Lower Volga region. Separate-petaled flowering dicotyledonous plants (*Crassulaceae-Cornaceae*). V. 2. P. 2. Moscow: Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK; 2018. 519 p. (In Russ.)
16. Riaz A., Rasul A., Hussain G., Zahoor M. K., Jabeen F., Subhani Z., Selamoglu Z. Astragalin: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in pharmacological sciences.* 2018;2018:15. DOI: 10.1155/2018/9794625.

АНАЛИТИКА ЭКСПО

21-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

11–14.04.2023

Москва, Крокус Экспо






Забронируйте стенд

analitikaexpo.com

ITE ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER

0+

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-115-122
УДК 543.544; 577.114; 665.372; 547.922

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка методики хроматографического анализа вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия

С. В. Антонова[1]✉, С. В. Колячкина[1], А. В. Ланцова[2], Л. Л. Николаева[2], Е. В. Санарова[2]

[1] ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ВГНКИ), 123022, Россия, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5
[2] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

✉ **Контактное лицо:** Антонова Светлана Владимировна. **E-mail:** antonovasvetlanavladimirovna@gmail.com

ORCID: С. В. Антонова – https://orcid.org/0000-0003-0886-4578; С. В. Колячкина – https://orcid.org/0000-0001-5523-171X; А. В. Ланцова – https://orcid.org/0000-0002-0650-2023; Л. Л. Николаева – https://orcid.org/0000-0001-8003-8241; Е. В. Санарова– https://orcid.org/0000-0002-5592-5137.

Статья поступила: 20.01.2022 **Статья принята в печать:** 30.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России разработана липосомальная лекарственная форма ФС тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия (ТФГА), для которой необходимо было разработать простую, точную и легко воспроизводимую методику количественного определения основного действующего вещества и вспомогательных веществ в составе лекарственного средства. В качестве такой методики была выбрана высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ).

Цель. Разработка хроматографических методик количественного определения вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме ФС ТФГА и для определения подлинности.

Материалы и методы. Определение веществ проводили методом ВЭТСХ с последующей хроматоденситометрией. Для проведения анализа использовали субстанцию ТФГА (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), плацебо лиофилизированной липосомальной формы без ТФГА в составе (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин (96 %, CAS № 97281-44-2, EPC, Lipoid GmbH, Германия), холестерин (≥99 %, CAS № C8667, Sigma-Aldrich, Япония), сахарозу (ч.д.а., ООО ТД «ХИММЕД», Россия) и различные органические растворители.

Результаты и обсуждение. После проведения серий собственных экспериментов была выбрана подвижная фаза для проведения ВЭТСХ-анализа: изопропанол : 25%-й водный аммиак (80 : 20 об/об), при этом время разделения составило 20–25 мин (l = 75 мм), t = 20 °C. Для визуализации пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина выбрали 5%-й раствор фосфорномолибденовой кислоты. Устойчивость стандартных образцов была подтверждена на серии предвалидационных исследований. Проведена валидация методики.

Заключение. Для количественного определения сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в новой липосомальной лекарственной форме выбран метод ВЭТСХ с хроматоденситометрией, который позволяет идентифицировать сразу все три компонента в составе лекарственной формы. Проведена валидация методики.

Ключевые слова: методы анализа, высокоэффективная тонкослойная хроматография, липосомы, фосфатидилхолин, холестерин

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

Вклад авторов. С. В. Антонова, С. В. Колячкина придумали и разработали эксперимент, участвовали в обработке данных. А. В. Ланцова, Л. Л. Николаева, Е. В. Санарова синтезировали образцы. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, участвовали в написании текста статьи.

Для цитирования: Антонова С. В., Колячкина С. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л., Санарова Е. В. Разработка методики хроматографического анализа вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):115–122. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-115-122

Development of a Technique for Chromatographic Analysis of Excipients in a Liposomal Dosage Form of a Photosensitizer Tetra-3-phenylthio-phthalocyanine Hydroxyaluminium

Svetlana V. Antonova[1]✉, Svetlana V. Kolyachkina[1], Anna V. Lantsova[2], Lyudmila L. Nikolaeva[2], Ekaterina V. Sanarova[2]

[1] The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality (VGNKI), 5, Zvenigorodskoe shosse, Moscow, 123022, Russia
[2] FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

✉ **Corresponding author:** Svetlana V. Antonova. **E-mail:** antonovasvetlanavladimirovna@gmail.com

© Антонова С. В., Колячкина С. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л., Санарова Е. В., 2023
© Antonova S. V., Kolyachkina S. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Sanarova E. V., 2023

ORCID: Svetlana V. Antonova – https://orcid.org/0000-0003-0886-4578; Svetlana V. Kolyachkina – https://orcid.org/0000-0001-5523-171X;
Anna V. Lantsova – https://orcid.org/0000-0002-0650-2023; Lyudmila L. Nikolaeva – https://orcid.org/0000-0001-8003-8241;
Ekaterina V. Sanarova – https://orcid.org/0000-0002-5592-5137.

Received: 20.01.2022 **Revised:** 30.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. The Laboratory of Drug Formulation Development at the N. N. National Medical Research Center of Oncology developed a liposomal dosage form of FS tetra-3-phenylthio-pthalocyanine hydroxyluminide (TPHA) for which a simple, accurate and easily reproducible method of quantitative determination of the main active substance and excipients in the drug product was needed. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) was chosen as such a technique.

Aim. The aim of this work was to develop chromatographic methods for the quantitative determination of excipients in a liposomal dosage form of a tetra-3-phenylthiophthalocyanine hydroxyaluminium (TPHA).

Materials and methods. Determination of substances was carried out by the method of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) followed by TLC-densitometry. Substance TPHA 98 % (Federal State Unitary Enterprise "SSC "NIOPIK", Russia), placebo lyophilized liposomal form without TFHA in the composition (FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin" of the Ministry of Health of Russia), egg phosphatidylcholine (96 %, CAS № 97281-44-2, EPC Lipoid, Germany), cholesterol (≥99 %, CAS № C8667, Sigma-Aldrich, Japan), sucrose analytical grade (CHIMMED, Russia) and various organic solvents.

Results and discussion. The selected mobile phase for HPTLC analysis: isopropanol: ammonia 25 % aqueous 80:20, separation time was 20–25 min (l = 75mm), t = 20 °C. To visualize the spots of sucrose, phosphatidylcholine, and cholesterol, a 5 % solution of phosphomolybdic acid was chosen. The stability of the standard samples was confirmed on a series of prevalidation studies. Validation of the methodology was carried out.

Conclusion. For quantitative determination of sucrose, phosphatidylcholine and cholesterol in a new liposomal dosage form, the method of HPTLC with TLC-densitometry was chosen, which allows identifying all three components in the dosage form simultaneously. The method was validated.

Keywords: methods of analysis, high-performance thin-layer chromatography, liposomes, phosphatidylcholine, cholesterol

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. Svetlana V. Antonova, Svetlana V. Kolyachkina invented and developed an experiment, participated in data processing. Anna V. Lantsov, Lyudmila L. Nikolaeva, Ekaterina V. Sanarova synthesized samples. All authors participated in the discussion of the results, participated in the writing of the text of the article.

For citation: Antonova S. V., Kolyachkina S. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Sanarova E. V. Development of a technique for chromatographic analysis of excipients in a liposomal dosage form of a photosensitizer tetra-3-phenylthio-phthalocyanine hydroxyaluminium. *Drug development & registration*. 2023;12(1):115–122. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-115-122

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одной из основных причин смертности как в мире[1], так и в России. В связи с этим совершенствование химиотерапии опухолей в самостоятельном или в адъювантном режиме является актуальным направлением для повышения эффективности лечения онкологических заболеваний [1].

Одним из наиболее перспективных направлений лечения рака является фотодинамическая терапия (ФДТ), при которой светом воздействуют на введенные в опухоль молекулы фотосенсибилизатора (ФС), что приводит к фотохимическому повреждению опухолевых клеток [2–4].

Ныне существующие ФС имеют недостаточную глубину фотодинамического воздействия и невысокую селективность накопления в опухоли, поэтому создание ФС с высокой селективностью накопления, за счет направленной доставки ФС, и поглощением в спектральной области 710–740 нм, где собственное поглощение биологических тканей незначительно, является актуальным. ФДТ с использованием такого ФС обеспечит возможность эффективного разрушения опухолевого узла на глубину, по крайней мере, до 1 см [4].

Одним из эффективных ФС, отвечающий данным требованиям, является представитель группы фталоцианинов – ТФГА, на основе которого в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России была разработана лиофилизированная липосомальная лекарственная форма и проведены ее доклинические исследования эффективности и безопасности. В качестве вспомогательных компонентов лекарственной формы использовали фосфатидилхолин, холестерин и сахарозу [5, 6].

Важной частью при создании лекарственного препарата является разработка простых, точных и легко воспроизводимых методик количественного определения вспомогательных веществ. Лекарственная форма, которая является объектом исследования, представляет собой сложную композицию, содержащую действующее вещество ФС – тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминий (ТФГА), а также липиды: фосфатидилхолин и холестерин, и в качестве криопротектора сахарозу. Вследствие этого

[1] Cancer. World Health Organization. Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Accessed: 25.11.2022.

непосредственное определение даже одного компонента в лекарственной форме каким-либо спектральным аналитическим методом (спектрофотомерией, флуоресцентной спектроскопией и т. д.) не позволяет получить достоверных результатов. При использовании хроматографических методов, как правило, удается добиться разделения и количественного определения компонентов. В настоящее время для анализа сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в основном используются высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и капиллярный электрофорез (КЭ). Выбор того или иного метода определяется конкретной задачей, стоящей перед исследователем [7, 8].

Для количественного определения сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в липосомальной лекарственной форме ТФГА был выбран метод ВЭТСХ, в связи с тем, что в выбранных условиях анализа появляется возможность количественного определения сразу трех компонентов лекарственной формы. Кроме того, метод ВЭТСХ также обладает рядом очевидных достоинств: не требует высокоочищенных реактивов, прост в исполнении, дает возможность одновременного количественного определения более 20 образцов, имеет прямое детектирование на слое сорбента.

Целью нашей работы была разработка хроматографических методик количественного определения вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме ТФГА и для определения подлинности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и оборудование. Субстанция ТФГА (98 %, ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), лиофилизированная липосомальная форма ТФГА (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), плацебо лиофилизированной липосомальной формы без ТФГА в составе (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин (96 %, CAS № 97281-44-2, ФХ, EPC, Lipoid GmbH, Германия), холестерин (≥99 %, CAS № C8667, Sigma-Aldrich, Япония), сахароза (ч.д.а., CAS № 57-50-1, ООО ТД «ХИММЕД», Россия), хлороформ (х.ч., CAS № 67-66-3, ООО ТД «ХИММЕД», Россия), метанол (о.с.ч., CAS № 67-56-1, ООО ТД «ХИММЕД», Россия), 25%-й водный аммиак (CAS № 1336-21-6, PanReac, Испания), изопропанол (CAS № 67-63-0, Scharlau, Испания), фосфорномолибденовая кислота (ч.д.а., CAS № 51429-74-4, ООО «ГРАНХИМ», Россия), фильтрующая насадка: диаметр пор 0,45 мкм, диаметр мембраны 15 мм, политетрафторэтилен (PTFE), Minisart® SRP 15 (Sartorius AG, Германия), пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, 10 × 15 см (АО «Сорбполимер», Россия), пластинки хроматографические HPTLC Silica gel 60 F_{254} размером 10 × 20 см (Merck KGaA, Германия), микрошприц «Газохром 101» (ООО «Манометр», Россия), стеклянная камера, 22,5 × 29 × 16 см (ООО «НТЦ «Ленхром», Россия), кювета для проявления пластин методом погружения (ООО «НТЦ «Ленхром», Россия), автоматический аппликатор TLC Sampler 4 (ATS 4) и сканирующий денситометр TLC Scanner 3 с программным обеспечением winCATS ver. 1.4.2 (CAMAG AG, Швейцария).

Методика анализа. Для анализа сахарозы экстракцию из флакона с лиофилизированной липосомальной формой ТФГА проводили дистиллированной водой; для анализа фосфатидилхолина и холестерина – хлороформом. Готовили стандартные растворы сахарозы в концентрациях от 50 до 2200 мг/л в дистиллированной воде и стандартные растворы фосфатидилхолина и холестерина в концентрациях от 150 до 1000 мг/л в хлороформе. Экстракты и стандартные растворы перед анализом фильтровали через шприцевые фильтры PTFE с диаметром пор с 0,45 мкм. ТСХ пластинки перед началом анализа промывали смесью хлороформа и метанола (50:50 об/об) и сушили в течение 30 мин при 110–115 °С. Растворы стандартных образцов, и экстракты липосомальной лекарственной формы наносили на пластинки объемом 2 мкл с помощью автоматического аппликатора или микрошприца. Хроматографию осуществляли восходящим методом в стеклянной камере при комнатной температуре. В качестве подвижной фазы использовали смесь изопропанола и 25%-го водного аммиака (80:20 об/об), время насыщение камеры составляло 20 мин. Длина пробега элюента составляла 7,5 см. Для визуализации пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина использовали обработку хроматограммы 5%-м спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты, с последующим прогреванием хроматограммы при температуре 180 °С в течение 2 мин. Количественное определение сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина осуществляли на сканирующем денситометре при длине волны 700 нм и размером щели 2,00 × 0,2 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее с помощью метода ТСХ проводилось полуколичественное определение сахарозы и лецитина в липосомальной лекарственной форме ТФГА. Причем для разделения сахарозы и фосфатидилхолина использовали разные подвижные фазы и стандартные пластинки Sorbfil [5, 6].

ТСХ пластинки Kieselgel 60 (Merck KGaA, Германия) и пластинки Sorbfil имеют различную «химию поверхности» активного слоя, поэтому рекомендованные ранее подвижные фазы были неэффективны для одновременного количественного определения сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в липосомальной лекарственной формы ТФГА. С помощью модели «Призма» [8] нами была подобрана подвижная фаза, имеющая следующий компонентный состав: изопропанол – 25 % водный аммиак (80:20 об/об), при этом время разделения составило 20–25 мин (l = 75 мм), t = 20 °С.

Для визуализации пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина на хроматограмме необходима обработка хроматограмм раствором обнаруживающего реагента. Были проанализированы возможности использования ряда визуализирующих реагентов для обнаружения пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина такие как: хлорид железа (III), медь сернокислая и фосфорномолибденовая кислота. Обнаруживающие реагенты наносились на хроматограмму методом погружения, время экспозиции 3 сек. с последующим прогреванием хроматограммы.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что все три компонента: сахароза, фосфатидилхолин и холестерин проявляются под воздействием всех трех обнаруживающих реагентов. Но интенсивность окрашивания после обработки спиртовым раствором хлорида железа (III) пятен холестерина и фосфатидилхолина недостаточно высокая для количественного анализа.

После обработки водным раствором меди сернокислой фронт растворителя интенсивно окрашивался и мешал количественному анализу.

После обработки 5%-м спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты пятна сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина интенсивны и имеют компактные формы (рисунок 1).

Основываясь на полученных экспериментальных данных, для работы был выбран 5%-й спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты с последующим нагревом при 180 °С в течение 2 мин. После проведения цветной реакции осуществляли сканирование и количественную обработку хроматограмм с помощью сканирующего денситометра TLC Scanner 3 и программным обеспечением winCATS при длине волны 700 нм.

Для доказательства устойчивости стандартных растворов сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в растворе и на слое силикагеля были проведены следующие предвалидационные тесты [9, 10]:

1. После двумерного элюирования стандартных растворов сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина стандарты дают только одно пятно.
2. Проведена хроматография одних и тех же стандартных растворов сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина (при температуре хранения 5–10 °С) в интервале от 5 до 720 мин. Установлено, что сахароза, фосфатидилхолин и холестерин элюируются одним пятном, и интенсивность этих пятен не изменяется. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сахароза, фосфатидилхолин и холестерин устойчивы в растворах более 720 мин (при температуре хранения 5–10 °С).
3. Пластинки, с нанесенными пробами сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина выдерживались при комнатной температуре 20–25 °С в незащищенном от света месте в интервале от 5 до 180 мин, после чего проводилось элюирование этих пластинок. Показано, что при этом сахароза, фосфатидилхолин и холестерин элюируются одним пятном и интенсивность этих пятен не изменяется. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сахароза, фосфатидилхолин и хо-

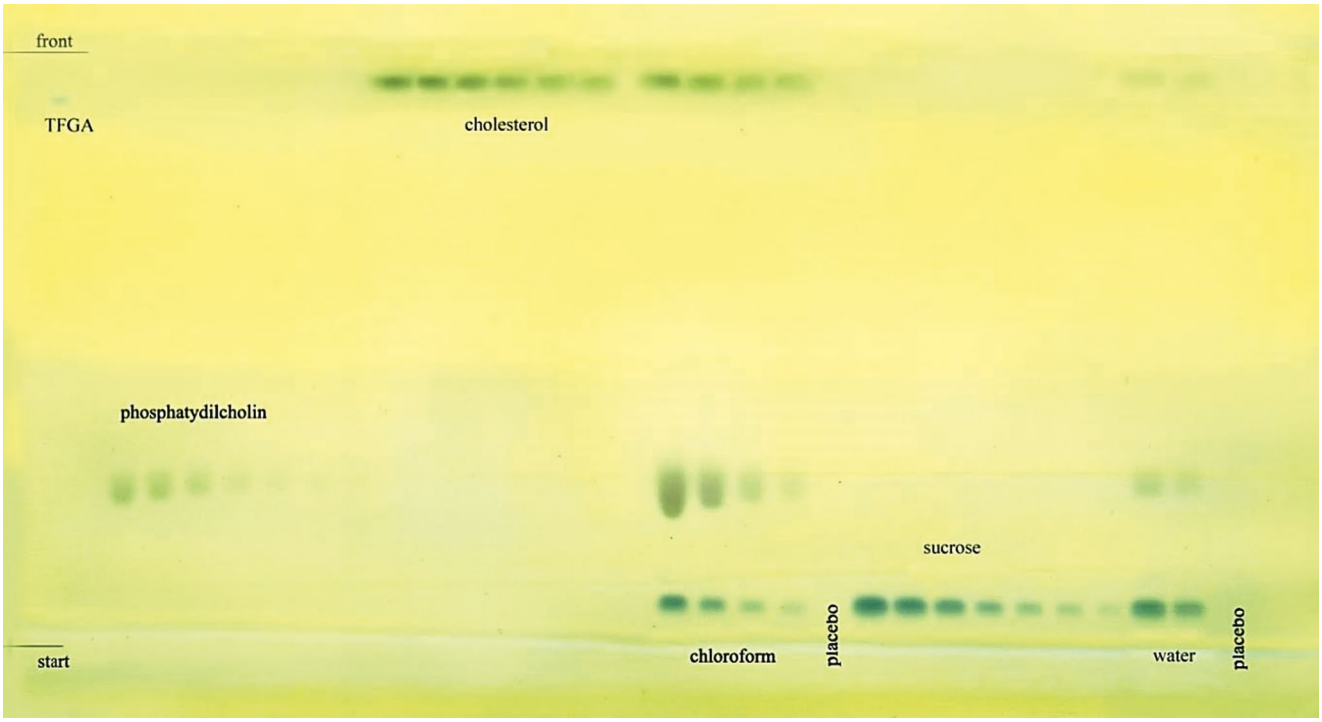


Рисунок 1. Хроматограмма после обработки 5%-м спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты

Figure 1. Chromatogram after treatment with 5 % alcohol solution of phosphor-molybdenum acid

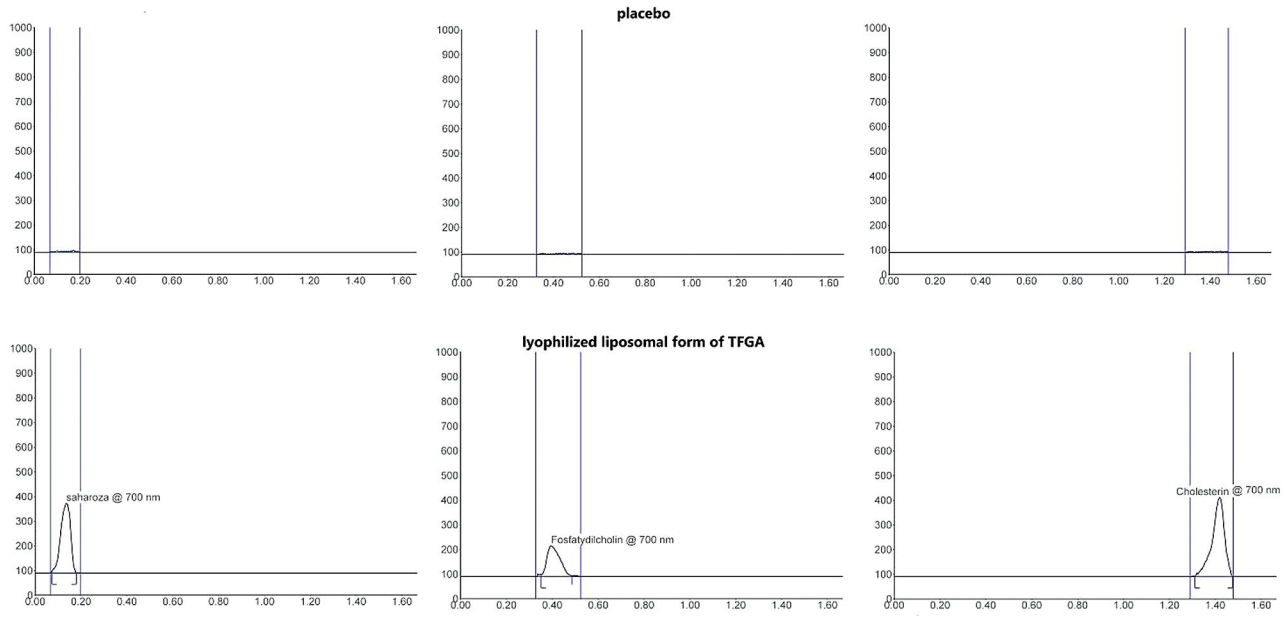


Рисунок 2. Хроматограммы экстрактов плацебо и лиофилизированной липосомальной формы ТФГА

Figure 2. Chromatograms of placebo extracts and lyophilized liposomal form of TFGA

лестерин устойчивы на тонких слоях целлюлозы в течение 180 мин. до элюирования.

4. Пластинки, с нанесенными пробами сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина элюировали, обрабатывали 5%-м спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и проявляли при температуре 180 °С в течение 2 мин. Перед денситометрией пластинки выдерживались в лабораторном помещении, при комнатной температуре 20–25 °С в защищенном от света месте в интервале от 5 до 720 мин. При этом интенсивность пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина не изменялась. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что пятна сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина после элюирования и обработки пластинки устойчивы на тонких слоях целлюлозы после выдерживания в темном месте и комнатной температуре от 5 до 720 мин.

Полученные таким образом экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сахароза, фосфатидилхолин и холестерин не подвергаются деструкции в условиях проведения эксперимента.

Разработанная ВЭТСХ-методика была валидирована [9, 10]:

1. Подтверждена специфичность: отсутствуют наложения на пики сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина со стороны пиков плацебо (рисунок 2).
2. Предел количественного определения был определен для сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина как концентрация, дающая сигнал в 10 раз больше, чем уровень шума базовой линии и принят: для сахарозы 250 мг/л; для фосфатидилхолина 350 мг/л; для холестерина 350 мг/л.
3. Линейность была подтверждена по 6 точкам: для фосфатидилхолина в интервале от 350 до 1000 мг/л, для холестерина от 350 до 1000 мг/л и сахарозы от 250 до 2200 мг/л. Интегрирование проведено по площадям пиков по уравнению полинома второго порядка Michaelis-Menten 2 [11], и рассчитаны коэффициенты стандартного остаточного отклонения (SDV)[1]: Для сахарозы: SDV = 3,48; для фосфатидилхолина: SDV = 1,69; для холестерина: SDV = 1,36. Коэффициенты стандартного остаточного отклонения исследуемых вспомогательных веществ менее 10 (рисунок 3).
4. Подтверждена правильность метода на модельных смесях, путем добавления известного количества сахарозы (Suc), фосфатидилхолина (Ph) и холестерина (Ch) по 350, 500 и 750 мг/г в плацебо. Правильность среднего значения результатов в трипликатах находится в диапазоне от 90 до 110 % (таблица 1).
5. Повторяемость проверена на шести повторных нанесениях модельной смеси плацебо с добавлением сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в концентрации 500 мг/л. Среднее квадратичное отклонение площадей пиков (RSD) для сахарозы RSD = 2,8 %, фосфатидилхолина RSD = 3,1 %, холестерина RSD = 3,6 %.

[1] Calibration – visionCATS 2.5 documentation. Available at: http://hptlcmethods.cloudapp.net/205/method_analysis_file/evaluation/calib/calib.html#calibration-function-view. Accessed: 25.11.2022.

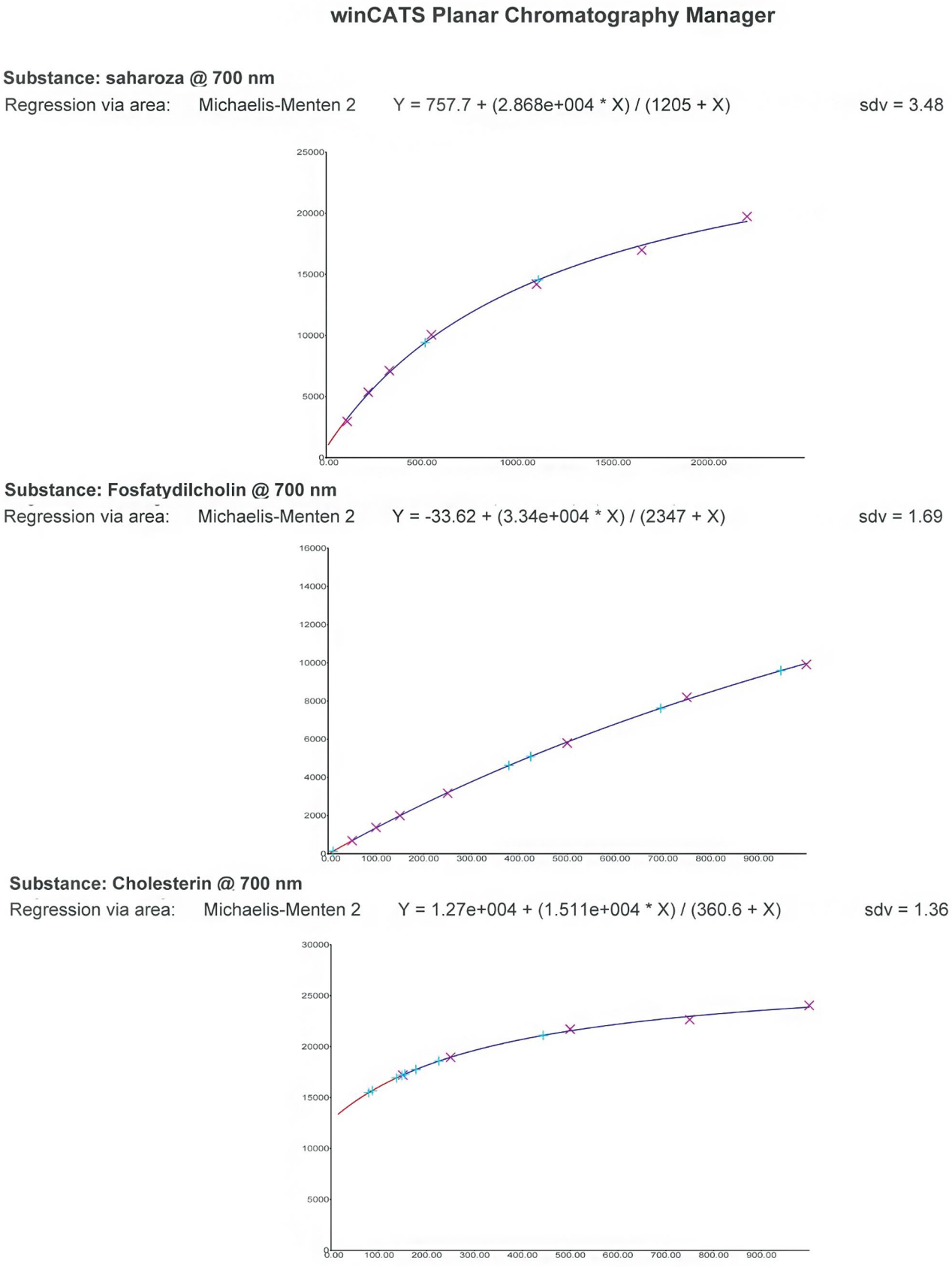


Рисунок 3. **Калибровочные кривые сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина**

Figure 3. **Calibration curves for sucrose, phosphatidylcholine and cholesterol**

Таблица 1. Анализ вспомогательных веществ (сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина) в модельных смесях

Table 1. Analysis of adjuvants (sucrose, phosphatidylcholine and cholesterol) in model mixtures)

Внесенная концентрация, мг/л Applied concentration, mg/l	Найденное значение, мг/л Found value, mg/l			Правильность, % (Accuracy, %)			Правильность, Среднее значение, % Accuracy, average value, %		
	Suc	Ph	Ch	Suc	Ph	Ch	Suc	Ph	Ch
350	344	353	347	97,60	101,20	98,80	97,60 ± 0,8	100,27 ± 0,8	98,67 ± 0,8
	339	348	344	95,60	99,20	97,60			
	349	351	349	99,60	100,40	99,60			
500	489	512	491	97,80	102,40	98,20	98,93 ± 0,8	100,93 ± 0,8	99,27 ± 0,8
	498	497	496	99,60	99,40	99,20			
	497	505	502	99,40	101,00	100,40			
750	746	746	742	99,47	99,47	98,93	99,87 ± 0,8	99,82 ± 0,8	99,78 ± 0,8
	747	748	755	99,60	99,73	100,67			
	754	752	748	100,53	100,27	99,73			

6. Разработанная ВЭТСХ-методика была апробирована при определении вспомогательных веществ на трех сериях лиофилизированной липосомальной формы ТФГА. Пробоподготовка и анализ были проведены в разные дни в 5 повторениях, затем вычисляли среднее значение содержания сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина во флаконе лиофилизата и среднее квадратичное отклонение (RSD, %). За окончательный результат анализа принимали среднее арифметическое пяти параллельных определений (см. таблицу 1).

   Расчет производили по формуле:

$$C = (C_{ТСХ} \cdot V)/1000 = \text{мг/флаконе},$$

где С – концентрация вспомогательного вещества, мг/флаконе; $C_{ТСХ}$ – концентрация вспомогательного вещества в экстракте лиофилизированной липосомальной формы ТФГА, полученная по результатам анализа ВЭТСХ (соответственно калибровочной кривой), мг/л; *V* – объем растворителя, взятого для экстракции лиофилизированной липосомальной формы ТФГА во флаконе, мл; 1000 – коэффициент пересчета

Как видно по данным таблицы 2 разница между средними результатами составляет менее 10 %, а RSD для всех веществ не превышает 10 %.

Устойчивость хроматографической процедуры была продемонстрирована путем изменения следующих критических параметров метода:

1. Было проведено исследование зависимости селективности разделения сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина от величины объемного содержания изопропанола, входящего в состав подвижной фазы. Было установлено, что величины ΔRf пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина практически не изменяются ΔRf (±0,05, $n = 3$, P 0,95) в интервале содержания изопропанола от 77,5 до 82,0 % v/v.
2. Температура элюирования в интервале от 20 до 35 °С и время насыщения камеры от 20 до 120 минут также не оказывают влияния на величины ΔRf (±0,05, $n = 3$, P 0,95) сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина.
3. Использование ТСХ пластинок различных партий также не вызывает изменений селективности разделения.

Таблица 2. Анализ вспомогательных веществ (сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина) в лиофилизированной липосомальной форме ТФГА

Table 2. Analysis of adjuvants (sucrose, phosphatidylcholine and cholesterol) in lyophilized liposomal form of TFA

№ пробы № Sample	Концентрация вспомогательного вещества, мг/флаконе Concentration of the auxiliary substance, mg/vial					
	Suc		Ph		Ch	
	1-й день 1st day	2-й день 2st day	1-й день 1st day	2-й день 2st day	1-й день 1st day	2-й день 2st day
1	582	612	289	307	34	35
2	588	582	309	302	36	37
3	618	588	305	289	37	34
4	612	582	287	290	38	37
5	576	624	296	296	33	38
Среднее Average	595,2	597,6	297,2	296,8	35,6	36,2
RSD, %	7,6	7,2	6,8	5,7	5,9	6,3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липосомальная лекарственная форма фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия содержит в своем составе несколько вспомогательных компонентов. Для оценки их количественного содержания в составе лекарственной формы выбран метод ВЭТСХ с хроматоденситометрией. Разработанная на его основе методика позволяет идентифицировать сразу все три компонента в составе лекарственной формы (сахароза, фосфатидилхолин, холестерин), методика валидирована.

ЛИТЕРАТУРА

1. Переводчикова Н. И., Горбунова В. А. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. М.: Практическая медицина; 2018. 688 с.
2. Meerovich G. A., Romanishkin I. D., Loschenov V. B., Akhlyustina E. V., Tiganova I. G., Tolordava E. R., Philipova N. I., Zhizhimova Y. S., Romanova Y. M., Gintsburg A. L., Lukyanets E. A., Makarova E. A., Yuzhakova O. A. Novel polycationic photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2019;1282:1–19. DOI: 10.1007/5584_2019_431.
3. Meerovich I., Dash A. K., Nichols M. G. Low-intensity light-induced drug release from a dual delivery system comprising of a drug loaded liposome and a photosensitive conjugate. *Journal of Drug Targeting.* 2020;28(6):655–667. DOI: 10.1080/1061186X.2019.1710838.
4. Ozog D. M., Rkein A. M., Fabi S. G., Gold M. H., Goldman M. P., Lowe N. J., Martin G. M., Munavalli G. S. Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatologic Surgery.* 2016;42(7):804–827. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000800.
5. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A., Kotova E., Shprakh Z., Polozkova A., Orlova O., Borisova L., Smirnova Z., Oborotova N., Baryshnikov A., Meerovich G., Lukyanets E. Thiosens liposomal dosage form technology development and photodynamic efficiency assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2014;24(4):315–319. DOI: 10.1016/S1773-2247(14)50068-8.
6. Lantsova A. V., Olefir Yu. V., Bunyatyan N. D., Sanarova E. V., Orlova O. L., Dmitrieva M. V., Polozkova A. P., Oborotova N. A., Ogai M. A., Khadzhieva Z. D., Nikolaeva L. L., Kompantsev D. V., Shevchenko A. M., Prokof'ev A. B. Validation of a Method for Assay of Excipients in Liposomal Medicinal Formulations of the Photosensitizer Lipophthalocyan. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2020;53(10):986–990. DOI: 10.1007/s11094-020-02110-4.
7. Тринеева О. В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(2):69–79. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
8. Красиков В. Д. Основы планарной хроматографии. СПб.: Химиздат; 2005. 232 с.
9. Renger B., Vegh Z., Ferenczi-FodorK. Validation of thin layer and high performance thin layerchromatographic methods. *J. Chromatogr. A.* 2011;1218:2712–2721. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.059.
10. Spangenberg B., Poole C. F., Weins C. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey. *Chromatographia.* 2011;73:823.
11. Ebel S., Alert D., Schaefe U. Calibration in TLC/HPTLC using the Michaelis-Menten function. *Chromatographia.* 1984;18(1)23–27. DOI: 10.1007/BF02279459.

REFERENCES

1. Perevodchikova N. I., Gorbunova V. A. Guidelines for chemotherapy of tumor diseases. Moscow: Practical medicine; 2018. 688 p. (In Russ.)
2. Meerovich G. A., Romanishkin I. D., Loschenov V. B., Akhlyustina E. V., Tiganova I. G., Tolordava E. R., Philipova N. I., Zhizhimova Y. S., Romanova Y. M., Gintsburg A. L., Lukyanets E. A., Makarova E. A., Yuzhakova O. A. Novel polycationic photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2019;1282:1–19. DOI: 10.1007/5584_2019_431.
3. Meerovich I., Dash A. K., Nichols M. G. Low-intensity light-induced drug release from a dual delivery system comprising of a drug loaded liposome and a photosensitive conjugate. *Journal of Drug Targeting.* 2020;28(6):655–667. DOI: 10.1080/1061186X.2019.1710838.
4. Ozog D. M., Rkein A. M., Fabi S. G., Gold M. H., Goldman M. P., Lowe N. J., Martin G. M., Munavalli G. S. Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatologic Surgery.* 2016;42(7):804–827. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000800.
5. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A., Kotova E., Shprakh Z., Polozkova A., Orlova O., Borisova L., Smirnova Z., Oborotova N., Baryshnikov A., Meerovich G., Lukyanets E. Thiosens liposomal dosage form technology development and photodynamic efficiency assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2014;24(4):315–319. DOI: 10.1016/S1773-2247(14)50068-8.
6. Lantsova A. V., Olefir Yu. V., Bunyatyan N. D., Sanarova E. V., Orlova O. L., Dmitrieva M. V., Polozkova A. P., Oborotova N. A., Ogai M. A., Khadzhieva Z. D., Nikolaeva L. L., Kompantsev D. V., Shevchenko A. M., Prokof'ev A. B. Validation of a Method for Assay of Excipients in Liposomal Medicinal Formulations of the Photosensitizer Lipophthalocyan. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2020;53(10):986–990. DOI: 10.1007/s11094-020-02110-4.
7. Trineeva O. V. Development of Theoretical Approaches to Determination of the Main Groups of Biologically Active Substances of Medicinal Plant Raw Materials by TLC Method. *Drug development & registration.* 2021;10(2):69–79. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
8. Krasikov V. D. Fundamentals of planar chromatography. St. Petersburg: Himizdat; 2005. 232 p. (In Russ.)
9. Renger B., Vegh Z., Ferenczi-FodorK. Validation of thin layer and high performance thin layerchromatographic methods. *J. Chromatogr. A.* 2011;1218:2712–2721. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.059.
10. Spangenberg B., Poole C. F., Weins C. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey. *Chromatographia.* 2011;73:823.
11. Ebel S., Alert D., Schaefe U. Calibration in TLC/HPTLC using the Michaelis-Menten function. *Chromatographia.* 1984;18(1)23–27. DOI: 10.1007/BF02279459.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-123-130
УДК 615.076

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Стандартизация требований к питательным средам, используемым для оценки качества лекарственных средств (обзор)

С. М. Суханова✉

[1] ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Суханова Светлана Михайловна. **E-mail:** SuhanovaSM@expmed.ru

ORCID: С. М. Суханова – https://orcid.org/0000-0001-6621-4384.

Статья поступила: 01.02.2022 **Статья принята в печать:** 31.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Надежность оценки качества и безопасности лекарственных средств (ЛС) по биологическим показателям напрямую связана с применением питательных сред (ПС), отвечающих установленным требованиям. Однако при проведении испытаний следует учитывать особенности питательных сред, обусловленные наличием в их составе компонентов биологического происхождения. В частности, высокая степень вариабельности и неустойчивая стабильность сырья, а также возможные ошибки при приготовлении и хранении сред, создают предпосылки для возникновения отклонений. Использование питательных сред промышленного производства также не гарантирует их пригодность для соответствующего испытания. Для получения достоверных результатов соответствие каждой партии ПС заданным критериям должно подтверждаться стандартными методами с использованием всего перечня значимых показателей. Отсутствие в настоящее время в Российской Федерации государственного стандарта, регламентирующего требования к порядку использования питательных сред при подтверждении качества лекарственных средств, значительно затрудняет оценку пригодности, сопоставимости и достоверности результатов анализа, как самих ПС, так и фармацевтических препаратов.

Текст. В статье рассматривается проект общей фармакопейной статьи (ОФС) «Питательные среды», в котором представлены общие требования к питательным средам при использовании их в фармакопейном анализе. Стандарт предназначен для специалистов занимающихся разработкой, совершенствованием и применением методов и/или методик, необходимых для подтверждения свойств лекарственных препаратов с целью регистрации, ввода в гражданский оборот, а также при их производстве. Документ составлен с учетом современных отечественных и международных подходов надлежащих фармацевтических практик к оценке качества ЛС, предусматривающих применение питательных сред. В проекте определены ключевые факторы в наибольшей степени, влияющие на качество питательных сред. На основе принципа преемственности составлен и подробно описан комплекс стандартизованных методов контроля, включая испытания по физико-химическим и биологическим показателям. Приведены критерии пригодности. Для исследования специфических свойств установлены требования к тестовым культурам. Регламентируются особые требования к питательным средам, используемым для получения биологических лекарственных препаратов. Описана процедура хранения и утилизации питательных сред, непригодных для использования.

Заключение. Введение ОФС «Питательные среды» в практику отечественного фармакопейного анализа позволит повысить достоверность результатов оценки эффективности и безопасности лекарственных средств, и как следствие приведет к снижению производственных рисков и рисков причинения вреда здоровью пациентов при фармакотерапии и иммунопрофилактике. Предложенные подходы могут быть использованы в других отраслях науки и производства.

Ключевые слова: безопасность, эффективность, оценка рисков, биологические методы, фармакопейный стандарт; лекарственные средства; оценка пригодности

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

Вклад авторов. Автор осуществила обзор публикаций, разработку проекта стандарта, написание текста рукописи, проверку конечной версии рукописи и перевод.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Для цитирования: Суханова С. М. Стандартизация требований к питательным средам, используемым для оценки качества лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):123–130. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-123-130

Standardization of Requirements for Culture Media Used to Assess the Quality of Drugs (Review)

Svetlana M. Sukhanova✉

Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSBI "SCEEMP"), 8/2, Petrovsky bul'var, Moscow, 127051, Russia

✉ **Corresponding author:** Svetlana M. Sukhanova. **E-mail:** SuhanovaSM@expmed.ru

ORCID: Svetlana M. Sukhanova – https://orcid.org/0000-0001-6621-4384.

Received: 01.02.2022 **Revised:** 31.01.2023 **Published:** 24.02.2023

© Суханова С. М., 2023
© Sukhanova S. M., 2023

Abstract
Introduction. A reliable assessment of the quality and safety of medical products (MP) by biological indicators is directly related to the use of culture media (CM) that meet the established requirements. However, when conducting trial, it is necessary to take into account the peculiarities of culture media due to the presence in their composition of components of biological origin. In particular, a high degree of variability and unstable stability of raw materials, as well as possible mistakes in producing and storage of media, create the prerequisites for deviations. The use of industrial culture media also does not guarantee their suitability for the appropriate test. Therefore to obtain reliable results, the compliance of each batch CM with the specified criteria be confirmed must be confirmed by standard methods using the full range of meaningful indicators. The current lack of a state standard in the Russian Federation regulating the requirements for the use of culture media when confirming the quality of medical products makes it much more difficult to assess the suitability, comparability and reliability of the analysis results, both themselves CM and drugs.
Text. The article discusses the draft General Pharmacopoeia Article (GPM) "Culture media", which presents the general requirements for of culture media when used in pharmacopoeia analysis. The standard is intended for specialists involved in the development, improvement and application of methods and / or techniques necessary for confirming the properties of medical products for the purpose of registration, entry into civil circulation, as well as in their production. The document was drawn up taking into account modern domestic and international approaches of good pharmaceutical practices to the assessment of the drugs that involve the use of culture media. The project identifies the key factors that most affect the quality of culture media. Based on the principle of continuity, compiled and described in detail a set of standardized control methods, including tests on physical-chemical and biological indicators. For exploring of specific properties, there are requirements for test cultures have been established. Governs special requirements for culture media used to obtain biological medical products are regulated. The procedure for storage and disposal of culture media unsuitable for use is described.
Conclusion. The introduction of the GPM "Culture media" into the practice of domestic pharmacopoeic analysis will increase the reliability of the results of the evaluation of the effectiveness and safety of drugs, and as a result will lead to a reduction in production risks and risks of harm to health patients during in pharmacotherapy and immunoprophylaxis. The proposed approaches can also be used in other branches of science and industry.

Keywords: safety, efficacy, risk assessment, biological methods, pharmacopoeia standard; drugs, assessment of suitability

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

Contribution of the authors. The author reviewed the publications, developed the draft standard, wrote the text of the manuscript, checked the final version of the manuscript and translated it.

Acknowledgment. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project № 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

For citation: Sukhanova S. M. Standardization of requirements for culture media used to assess the quality of drugs. *Drug development & registration*. 2023;12(1):123–130. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-123-130

ВВЕДЕНИЕ

Посев на питательные среды (ПС) по-прежнему остается основным способом, используемым для подсчета и обнаружения различных видов микроорганизмов при оценке качества, эффективности и безопасности лекарственных средств. Согласно Государственной фармакопеи Российской Федерации применение ПС регламентировано требованиями более 30 общих фармакопейных статьей, распространяющихся на общие методы испытаний и отдельные лекарственные формы, а также значительным числом частных фармакопейных статей, устанавливающих требования к оценке специфической активности, эффективности, микробной контаминации, безопасности и подлинности, различных по своей природе лекарственных средств (ЛС) [1]. Достоверность результатов данных испытаний обеспечивается в значительной степени применением питательных сред с заданными свойствами. Вместе с тем вариабельность свойств, входящего в состав ПС, сырья биологического происхождения, возможные ошибки при приготовлении и хранении, а также различия в стандартах качества ПС промышленного производства могут стать причиной несоответствия[1, 2] [3–6]. Специалистам хорошо известно, что свойства питательных сред одного наименования, но выпускаемых разными фирмами-производителями, могут существенно отличаться, как по физико-химическим (прочность геля, pH, аминный азот, содержание хлоридов и др.), так и по биологическим показателям (чувствительность, контрольные культуры микроорганизмов) [1, 7]. Более того производители могут использовать неодинаковые подходы к перечню определяемых характеристик

[1] WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 978. 2010. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789241209786/ Accessed: 09.06.2022.

[2] МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200067870/ Ссылка активна на 09.06.2022.

сред одного и того же наименования, а также различные уровни и методы контроля. Оценка качества может не включать испытание на наличие ростовых свойств или проводиться в соответствии с частными стандартами или руководствами[1]. Именно поэтому для обеспечения функционирования фармацевтической системы качества, включающей надлежащую производственную практику и управление рисками[2], возникает необходимость не только формирования четких критериев пригодности ПС, но и обязательного подтверждения соответствия каждой партии среды установленным требованиям[3, 4, 5, 6] [8, 9]. Использование сред без подтверждения их пригодности, является существенным фактором риска получения ошибочных результатов анализа и как следствие выпуска лекарственных средств, не отвечающих установленным критериям[7, 8] [2, 10]. При этом важно учитывать, что несоответствие свойств питательной среды требованиям, необходимым для оценки качества ЛС, может стать причиной получения как ложноположительного (безопасность), так и ложноотрицательного результата (эффективность, подлинность). Среди возможных негативных последствий неправильной оценки – причинение вреда здоровью конечного потребителя ЛС и финансовые издержки производителя [30].

Кроме того, проведенный нами ранее всесторонний анализ нормативной базы, определяющей требования к питательным средам показал, что в настоящее время в Российской Федерации отсутствует государственный стандарт, регламентирующий порядок использования питательных сред при проведении контроля качества ЛС. Существующая информация по работе с питательными средами должным образом не систематизирована, изложена фрагментарно, без учета особенностей применения и имеет немало существенных разночтений. Такая ситуация значительно затрудняет подходы к оценке пригодности, а также сопоставимости и достоверности получаемых результатов анализа, как самих питательных сред, так и лекарственных препаратов [1]. Более того, целесообразность разработки и принятия нового документа обусловлена необходимостью приведения информации по данному вопросу в соответствие с актуальными требованиями Правил надлежащей производственной практики Российской Федерации, Евразийского экономического союза и гармонизации с мировой практикой[9, 10, 11, 12, 13, 14]. Учитывая, что в нашей стране при обращении лекарственных средств в отношении их безопасности, качества и эффективности установлен приоритет государственного регулирования, а Всемирной организацией здравоохранения рекомендовано создание нормативно-правовой базы национальной системы регулирования медицинских изделий, формирование соответствующих

[1] Dehydrated Culture Media. Available at: https:// www.sigmaaldrich. com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/133/672/dehydrated-culture-media-br6639en-mk.pdf/ Accessed: 09.06.2022.

[2] Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического (№77 от 03.11.2016). Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411921/cncd_21112016_77/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[3] WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories. WHO Technical Report Series. Annex 2. No. 961. 2011. Available at: https://pdf4pro.com/view/annex-6-who-good-manufacturing-practices-for-18a34d.html. Accessed: 09.06.2022.

[4] Приказ Минпромторга России от 14.06. 2013 г. № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств». Доступно по: https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70351198/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[5] Accreditation for Microbiological Laboratories EURACHEM/EA Guide 04/10. Available at: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/EurachemEA_Micro.pdf/ Accessed: 09.06.2022.

[6] General European OMCL Network (GEON) QUALITY MANAGEMENT DOCUMENT PA/PH/OMCL (11) 157 R8 MANAGEMENT OF REAGENTS. Available at: https://www.edqm.eu/en/d/129417?p_l_back_url=%2Fen%2Fsearch-edqm%3Fq%3DQUALITY%2BMANAGEMENT%2BDOCUMENT%2BPA%252FPH%252FOMCL%2B%252811%2529%2B157%2BR8%2BMANAGEMENT%2BOF%2BREAGENTS. Accessed: 08.06.2021.

[7] Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического (№ 77 от 03.11.2016). Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411921/cncd_21112016_77/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[8] ГОСТ ISO 11133-2016. Межгосударственный стандарт. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200141101/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[9] Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического (№ 77 от 03.11.2016). Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411921/cncd_21112016_77/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[10] Приказ Минпромторга России от 14.06.2013. № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств». Доступно по: https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70351198/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[11] Accreditation for Microbiological Laboratories EURACHEM/EA Guide 04/10. Available at: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/EurachemEA_Micro.pdf/ Accessed: 09.06.2022.

[12] General European OMCL Network (GEON) QUALITY MANAGEMENT DOCUMENT PA/PH/OMCL (11) 157 R8 MANAGEMENT OF REAGENTS. Available at: https://www.edqm.eu/en/d/129417?p_l_back_url=%2Fen%2Fsearch-edqm%3Fq%3DQUALITY%2BMANAGEMENT%2BDOCUMENT%2BPA%252FPH%252FOMCL%2B%252811%2529%2B157%2BR8%2BMANAGEMENT%2BOF%2BREAGENTS. Accessed: 08.06.2021.

[13] МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200067870/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[14] ГОСТ Р ЕН 12322-2010. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200082586/ Ссылка активна на 09.06.2022.

фармакопейных требований к питательным средам является актуальной задачей[1].

Таким образом, целью настоящей работы является разработка проекта общей фармакопейной статьи ОФС «Питательные среды».

При составлении настоящего проекта были учтены современные подходы ведущих зарубежных фармакопей, а также других отечественных и международных документов, направленных на повышение уровня фармакопейного анализа в части, касающейся использования питательных сред. С целью сохранения преемственности принятые в нашей стране стандартные методы контроля питательных сред доработаны и изложены исходя из норм отечественной фармакопеи[2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

Проект ОФС «Питательные среды»

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на общие требования к питательным средам (ПС), используемым для анализа качества лекарственных средств. Питательные среды – субстраты, предназначенные для культивирования и хранения микроорганизмов и культур клеток.

ПС используют для получения биологических лекарственных препаратов, для оценки качества всех групп ЛС и их компонентов по биологическим показателям (анализ чистоты, специфическая активность), для проведения подготовительных процедур (ведение тестовых культур).

Качество питательной среды – совокупность свойств среды, обуславливающих способность удовлетворять требованиям в соответствии с ее назначением. Качество ПС зависит от свойств основных ингредиентов среды, уровня их микробного загрязнения, правильности рецептуры, методики приготовления, а также соблюдения надлежащих условий хранения и упаковки.

Для испытания ЛС могут быть использованы готовые к применению коммерческие ПС и среды, изготовленные в лабораторных условиях из отдельных компонентов или сухих коммерческих препаратов. Оценку соответствия установленным требованиям проводят для всех используемых ПС. Основным критерием при решении вопроса о пригодности ПС является важность соблюдения принципов управления рисками для качества.

Подготовка сред. Для анализа ЛС и их компонентов проводят подготовку ПС, включающую этапы приготовления, стерилизацию (при необходимости) и контроль качества.

Приготовление сред из сухих препаратов проводят в строгом соответствии с инструкцией изготовителя [порядок внесения и растворения компонентов, фильтрование, нагревание, кипячение, необходимость корректировки и допустимый диапазон значения pH после стерилизации, режим стерилизации (при необходимости) для соответствующей фасовки и вида герметизации (завальцовка, пробки)]. Навеска сухой ПС должна полностью растворяться. Исключение могут составлять среды, в состав которых входят нерастворимые компоненты, вызывающие незначительную опалесценцию и не мешающие визуальной интерпретации результатов при оценке качества ЛС по биологическим показателям.

При внесении изменений в процедуру подготовки сред промышленного производства, а также сред, изготавливаемых из отдельных компонентов, все условия приготовления должны быть валидированы.

Для приготовления сред используют химически инертную стеклянную или пластиковую посуду, не содержащую в своем составе щелочных компонентов и предназначенную для соответствующего нагрева. Не следует использовать металлическую посуду, являющуюся источником ионов тяжелых металлов, обладающих ингибиторными свойствами. Вода, используемая для приготовления питательных сред, должна

---

[1] Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в ред. Федеральных законов № 192-ФЗ от 27.07.2010. № 271-ФЗ от 11.10.2010; №313ФЗ от 29.11.2010). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[2] Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического (№ 77 от 03.11.2016). Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411921/cncd_21112016_77/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[3] Приказ Минпромторга России от 14.06. 2013 г. № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств». Доступно по: https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70351198/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[4] Accreditation for Microbiological Laboratories EURACHEM/EA Guide 04/10. Available at: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/ EurachemEA _Micro.pdf/ Accessed: 09.06.2022.

[5] General European OMCL Network (GEON) QUALITY MANAGEMENT DOCUMENT PA/PH/OMCL (11) 157 R8 MANAGEMENT OF REAGENTS. Available at: https://www.edqm.eu/en/d/129417?p_l_back_url=%2Fen%2Fsearch-edqm%3Fq%3DQUALITY%2BMANAGEMENT%2BDOCUMENT%2BPA%252FPH%252FOMCL%2B%252811%2529%2B157%2BR8%2BMANAGEMENT%2BOF%2BREAGENTS/ Accessed: 08.06.2021.

[6] МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200067870/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[7] ГОСТ Р ЕН 12322-2010. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200082586/ Ссылка активна на 09.06.2022.

[8] USP 41-NF36 General chapters: <1117> Microbiological best laboratory practices. Available at: https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/usp35/PDF/0707-0712%20%5B1117%5D%20MICROBIOLOGICAL%20BEST%20LABORATORY%20PRACTICES.pdf/ Accessed: 09.06.2022.

[9] Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1–4. Доступно по: https://femb.ru/record/pharmacopea14. Ссылка активна на 09.06.2022.

соответствовать требованиям ФС.2.2.0020.18 «Вода очищенная», если нет других указаний.

Стерилизация. Процедура стерилизации (метод и условия) должна быть валидирована для каждого наименования среды, расфасованной в соответствующий контейнер (пробирки, флаконы), должна гарантировать стерильность и не должна оказывать негативного влияния на способность среды стимулировать рост микроорганизмов.

Предпочтительным способом стерилизации питательных сред является автоклавирование (стерилизация насыщенным паром), режим (температура и продолжительность) которого зависит от состава и объема среды в первичной упаковке, а также степени загрузки автоклава.

Для некоторых сред, содержащих, например, термолабильные компоненты, используют кипячение или стерилизующую фильтрацию (0,2 мкм). Компоненты неустойчивые к нагреванию рекомендуется добавлять после охлаждения стерильной среды до температуры ниже 50 °С. Агаризованные среды охлаждают до температуры (45–50) °С и разливают в стерильные емкости, соблюдая правила асептики. Питательные среды распределяют равномерно по дну в чашки Петри, не допуская пузырьков воздуха. Толщина слоя должна быть не менее 3 мм.

Плавление плотных готовых ПС проводят в кипящей водяной бане или текучим паром в автоклаве (100 °С). Продолжительность плавления среды во флаконах не должна превышать 1 ч.

Среды, предназначенные для культивирования/выявления анаэробов перед использованием, как правило, следует регенерировать.

Регенерацию, а также плавление среды можно проводить только один раз.

Контроль качества. Испытанию подлежит каждая серия сухой или готовой к применению коммерческой ПС, а также каждая партия среды, изготовленная в лаборатории из сухого препарата или из компонентов. Качество ПС подтверждают с помощью совокупности показателей, выбранных в соответствии с ее назначением, и включает оценку по физико-химическим и биологическим показателям.

В случае если процедура приготовления среды валидирована, для сухой коммерческой среды возможна проверка соответствия специфических свойств выборочно или однократно для вновь полученной серии.

Серию сухой ПС оценивают визуально на соответствие внешнего вида (порошок, гранулы, пластины, чешуйки и их цвет) и отсутствие мешающих факторов (при необходимости).

Серию или партию готовой к применению ПС, в том числе промышленного производства, имеющей заключение о качестве (сертификат, паспорт), оценивают на соответствие внешнего вида (физическое состояние, прозрачность, цветность), pH (при наличии указания в Инструкции по применению), стерильности, специфическим свойствам (ростовые, дифференцирующие, ингибирующие или др.) и иным значимым показателям[1].

Прозрачность. Прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость или гель. Определение проводят визуально в проходящем свете в соответствии с ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкости».

Отсутствие мешающих факторов. Испытание проводят при входном контроле сред, предназначенных для оценки живых бактериальных вакцин по показателю «Отсутствие посторонних бактерий и грибов», на основании результатов микроскопии. Для определения используют окрашенные по Граму мазки готовой к применению среды. Наблюдаемая микроскопическая картина не должна влиять на последующую интерпретацию результатов оценки качества вакцины и используется как отрицательный контроль.

pH. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия». Для жидких сред – непосредственно в растворе (без разведения); для агаризованных (плотных) сред – в расплавленном и охлажденном виде до температуры (45–50) °С.

При необходимости перед стерилизацией устанавливают pH до требуемого значения с помощью растворов 1 М натрия гидроксида или 1 М хлористоводородной кислоты. Для регулирования pH среды после стерилизации используют стерильные растворы.

Примечание. Оценку величины значения pH необходимо проводить с учетом возможного влияния последующей стерилизации.

Аминный азот[2]. Определение проводят методом формольного титрования в соответствии с ОФС.1.2.3.0022.15 «Определение аминного азота методом формольного и йодометрического титрования».

Хлориды[3]. Определение проводят методом обратного осадительного титрования в соответствии с ОФС.1.7.2.0030.15 «Количественное определение хлоридов методом обратного осадительного титрования в биологических лекарственных препаратах».

Стерильность. ПС готовые к применению должны быть стерильными. После стерилизации (или розлива стерильной среды в другие емкости) образцы питательных сред в количестве, определенном в со-

[1] Серия готовой к применению среды промышленного производства может быть признана пригодной для испытания на основании результатов оценки рисков для качества, связанных с надежностью производителя и поставщика.

[2] Дополнительные показатели для оценки качества сред приготовленных из отдельных компонентов.

[3] Так же. Дополнительные показатели для оценки качества сред приготовленных из отдельных компонентов.

ответствии с требованиями ОФС.1.1.0004.15 «Отбор проб»[1], инкубируют при оптимальной для данной среды температуре в течение не менее 14 сут. Рост микроорганизмов должен отсутствовать. Обнаружение в жидкой среде помутнения или образование колоний на плотной среде свидетельствует о несоответствии требованиям испытания.

Специфические биологические свойства (чувствительность, ростовые свойства, эффективность, дифференцирующие, ингибирующие, нейтрализующие свойства, скорость роста). Требования, предъявляемые к наличию соответствующих свойств, определяются назначением ПС. Конкретные требования к специфическим свойствам сред, используемых в фармакопейных методах, приводятся в соответствующей статье.

Ростовые свойства. Готовую среду засевают культурой (тест-штаммом) микроорганизма (целевого), для выявления которого приготовлена среда и/или для гетерологичных (относящихся к разным видам) штаммов и визуально (или под малым увеличением) исследуют характер их роста. Набор тест-штаммов, необходимый для контроля качества ПС, определяется ее назначением. Не более 100 КОЕ каждого тест-штамма инкубируют в отдельном контейнере с испытуемой средой в соответствии с требуемыми условиями (температура, аэрация). ПС пригодна для использования, если в течение времени инкубации в среде выявляют рост микроорганизмов, при этом рост целевых тест-штаммов должен быть типичным (форма, цвет, размер колоний и др.); рост нецелевых – частично или полностью подавлен. Ингибирующие, накопительные или задерживающие рост свойства оценивают по изменению количества колоний, выросших на тестируемой и контрольной (среда для культивирования) среде.

Скорость роста культуры. Определяют по минимальному времени, за которое на чашках Петри (пробирках) с плотной средой происходит образование типичных, легко дифференцируемых колоний или обнаруживается видимый невооруженным глазом рост микроорганизма (помутнение, образование осадка, пленки, рост на скосе и др.) во всех засеянных контейнерах с жидкими (полужидкими) питательными средами.

Чувствительность среды. Устанавливают по максимальному разведению культуры, при котором рост обнаруживается во всех засеянных контейнерах.

Эффективность среды. Определяют для сред накопления, рассчитывая после соответствующей инкубации с учетом разведения выход клеток с 1 мл среды или прирост числа клеток относительно засеянного количества.

Показатель стабильности основных биологических свойств культивируемых микроорганизмов (культур клеток). Устанавливают по соотношению числа атипичных по морфологии, биохимическим и др. свойствам колоний к общему их числу в контейнерах с испытуемой средой (в %).

Дифференцирующие свойства. Определяют для дифференциальных сред и сред для идентификации по выраженности отличительных признаков патогенных микроорганизмов от непатогенных видов и естественных ассоциантов (по окраске, структурным особенностям колоний, изменению цвета и др.).

Ингибирующие свойства. Определяют по способности среды подавлять сопутствующую микрофлору. Показатель ингибирующих свойств выражают в виде минимального разведения культуры при посеве, из которого на испытуемой среде полностью отсутствует рост и (или) проявление типичных свойств посторонней микрофлоры или в виде величины отношения среднего числа колоний тест-штамма на среде выращивания к среднему числу колоний на испытуемой среде с учетом разведения.

Нейтрализующие свойства. Определяют по способности ПС нейтрализовать действие консервантов (например, ртутных), т.е. обеспечивать 100 % прорастание засеянной культуры. Присутствие консерванта не должно влиять на чувствительность среды в отношении тестовых штаммов.

Штаммы. Используют штаммы, полученные из специализированных коллекций, типичные по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. Число пассажей рабочей культуры, используемой для проведения испытания ПС, не должно превышать пяти.

Для выявления специфической контаминации ЛС, представляющей высокий риск заражения конечного продукта, при оценке качества ПС необходимо использовать дополнительные тестовые штаммы (микоплазмы, риккетсии). Возможно использование свежевыделенных культур, контаминирующих сырье и материалы биологического происхождения.

Проверка пригодности. При проведении оценки пригодности методики испытания ЛС фармакопейным или альтернативным методами для исключения получения ложноположительного результата дополнительно проводят проверку пригодности ПС для испытания конкретного препарата (отсутствие отрицательного влияния ПС на природу препарата).

Необходимое количество ЛС при осторожном перемешивании вносят в пробирку с ПС. При наблюдении испытуемой смеси в проходящем свете видимые изменения физических свойств ЛС должны отсутствовать (образование хлопьев, осадка).

[1] Объем выборки может быть изменен при условии оценки рисков гарантирующих надежность методики. Стерильность также может быть гарантирована валидированным процессом стерилизации.

При проведении анализа качества ЛС замена питательных сред/ингредиентов/добавок, а также использование для подтверждения свойств питательных сред тест-штаммов, неуказанных в фармакопейном методе (методике), должна быть обоснована и подтверждена пригодность их использования в той же или в более высокой степени.

Производственные питательные среды. ПС, используемые в процессе производства биологических лекарственных препаратов должны отвечать требованиям эффективности (продуктивности) и безопасности.

Для предотвращения контаминации необходимо принимать меры по выявлению инактивации и удалению посторонних агентов как в исходных материалах в рамках входного контроля, так и на этапах производства.

Поскольку источником контаминации конечного продукта могут являться входящие в состав ПС сырье и материалы животного происхождения (сыворотка крови, экстракты), в процессе производства ЛС, а также для поддержания роста клеток при размножении вируса, рекомендуется использовать среды, не содержащие сыворотку крови и антибиотики.

Испытания и оценку рисков в отношении безопасности производственных ПС проводят в соответствии с ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность», ОФС.1.7.2.0031.15 «Испытание на присутствие микоплазм», ОФС.1.2.4.0015.18 «Вирусная безопасность».

Содержание компонентов ПС в готовом препарате, которые могут вызвать нежелательные реакции у людей, должно быть ниже уровня, гарантирующего безопасность для человека.

Хранение и утилизация. Среды, приготовленные в лаборатории, хранят в надлежащих условиях (температура, влажность, защита от света), в течение срока, подтвержденного в ходе валидационных испытаний физических, химических и биологических свойств. Испытание проводят для каждого наименования среды, расфасованной в соответствующий контейнер (чашки, пробирки, флаконы). Среды не используют по истечении валидированных сроков хранения.

Коммерческие ПС хранят в строгом соответствии с инструкцией по применению при условии сохранения их качества в течение срока годности.

Утилизация неиспользованных сред и сред с истекшим сроком годности производится в соответствии с требованиями, предусмотренными для продукции соответствующего класса опасности (как правило, не выше 2а).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан проект новой общей фармакопейной статьи «Питательные среды», определяющий требования к питательным средам, применяемым для анализа качества и безопасности лекарственных средств. Предложен комплексный подход к критериям выбора перечня показателей, необходимых для подтверждения пригодности ПС и описаны основные методы их оценки. Определены критически значимые этапы подготовки, применения и хранения ПС. Введение ОФС «Питательные среды» в практику отечественного фармакопейного анализа позволит повысить достоверность результатов оценки эффективности и безопасности лекарственных средств, и как следствие приведет к снижению производственных рисков и рисков причинения вреда здоровью пациентов при фармакотерапии и иммунопрофилактике. Предложенные подходы также могут быть использованы в других отраслях науки и производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Суханова С. М., Захарова Н. Е. Питательные среды в фармакопейном анализе: применение, действующие требования, вопросы стандартизации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(3):136–144. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-3-136-144.
2. Береговых В. В., ред. Управление риском для качества Q 9. В кн.: Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество. СПб.: ЦОП «Профессия». 2017. С. 672–695.
3. Никитченко В. Е., Рысцова Е. О., Чернышева А. Н. Анализ и предупреждение рисков при изготовлении лабораторных микробиологических питательных сред методом FMEA. Вестник Российского университета дружбы народов. *Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство.* 2019;14(1):90–98. DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-90-98.
4. Меньшиков В. В., Козлов Р. С., Поляк М. С., Михайлова В. С., Иноземцева Л. О., Шуляк Б. Ф., Стецюк О. У., Кречикова О. И., Шепелин А. П., Суханова С. М. Внутрилабораторный контроль качества питательных сред для клинических микробиологических исследований. М.: Федерация лабораторной медицины; 2014. 42 с.
5. Федорова О. В., Понкратова С. А., Валеева Р. Т., Исламгулов И. Р. Питательные среды в производствах медицинских и ветеринарных препаратов. *Вестник технологического университета.* 2017;20(4):130–133.
6. Кулешова С. И., Процак С. А., Лисунова С. А., Романюк Г. Ю. Стабильность готовых и приготовленных в лаборатории питательных сред. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2021;11(2):130–134. DOI: 10.30895/1991-2919-2021-11-2-130-134.
7. Шепелин А. П. Сравнительная оценка качества основных питательных сред отечественного и импортного производства. *Астраханский медицинский журнал.* 2013;8(1):321–326.
8. Gebo J. E. T., East A. D., Lau A. F. Side-by-side comparison of clinical versus current good manufacturing practices (cGMP) microbiology laboratory requirements for sterility testing of cellular and gene therapy products. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2021;43(21):181–191. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2021.10.001.
9. Krisher K., Callihan D. R., Jones R. N., Luper D. C., Miller J. M., Sharp S. E., Shively R. G. Quality control for commercially prepared microbiological culture media. 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. 13 p.
10. Gordon O., Berchtold M., Staerk A., Roesti D. Comparison of Different Incubation Conditions for Microbiological Environmental Monitoring. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology September.* 2014;68(5):394–406. DOI: 10.5731/pdajpst.2014.00994.

11. Hassan K. M., Njogu P. M., Njuguna N. M., Ndwigah S. N. Microbiological contamination of herbal medicinal products marketed in Kenya for chronic diseases: A case study of Nairobi metropolis. *Journal of Herbal Medicine.* 2021;29:100475. DOI: 10.1016/j.hermed.2021.100475.

REFERENCES

1. Sukhanova S. M., Zakharova N. E. Culture media for pharmacopoeial analysis: use, current requirements, standardization**.** *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2019;19(3):136–144. (In Russ.) DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-3-136-144.
2. Beregovykh V. V., editor. Quality risk management Q 9. In: ICH Guidelines for the Pharmaceutical Industry. Kaquality. Saint Petersburg: TsOP "Professiya". 2017. P. 672–695. (In Russ.)
3. Nikitchenko V. E., Rystsova E. O., Chernysheva A. N. Analysis and prevention of risks in the manufacture of laboratory microbiological nutrient media by FMEA method. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstv.* 2019;14(1):90–98. (In Russ.) DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-90-98.
4. Men'shikov V. V., Kozlov R. S., Poljak M. S., Mihajlova V. S., Inozemceva L. O., Shuljak B. F., Stecjuk O. U., Krechikova O. I., Shepelin A. P., Suhanova S. M. In-laboratory quality control of nutrient media for clinical microbiological studies. Moscow: Federacija laboratornoj mediciny; 2014. 42 p. (In Russ.)
5. Fedorova O. V., Ponkratova S. A., Valeeva R. T., Islamgulov I. R. Nutrient media in the production of medical and veterinary drugs. *Vestnik tehnologicheskogo universiteta.* 2017;20(4):130–133. (In Russ.)
6. Kuleshova S. I., Protsak S. A., Lisunova S. A., Romanyuk G. Yu. Stability of ready-to-use and laboratory-prepared culture media. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya.* 2021;11(2):130–134. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2021-11-2-130-134.
7. Shepelin A. P. Comparative assessment of the quality of the main nutrient media of domestic and imported production. *Astrahanskij medicinskij zhurnal.* 2013;8(1):321–326. (In Russ.)
8. Gebo J. E. T., East A. D., Lau A. F. Side-by-side comparison of clinical versus current good manufacturing practices (cGMP) microbiology laboratory requirements for sterility testing of cellular and gene therapy products. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2021;43(21):181–191. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2021.10.001.
9. Krisher K., Callihan D. R., Jones R. N., Luper D. C., Miller J. M., Sharp S. E., Shively R. G. Quality control for commercially prepared microbiological culture media. 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. 13 p.
10. Gordon O., Berchtold M., Staerk A., Roesti D. Comparison of Different Incubation Conditions for Microbiological Environmental Monitoring. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology September.* 2014;68(5):394–406. DOI: 10.5731/pdajpst.2014.00994.
11. Hassan K. M., Njogu P. M., Njuguna N. M., Ndwigah S. N. Microbiological contamination of herbal medicinal products marketed in Kenya for chronic diseases: A case study of Nairobi metropolis. *Journal of Herbal Medicine.* 2021;29:100475. DOI: 10.1016/j.hermed.2021.100475.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-131-141
УДК 615.074

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Сравнительная оценка лекарственных препаратов с МНН «Каптоприл» различных производителей, представленных на рынке РФ, на основании исследований однородности дозирования и теста кинетики растворения

Д. Ю. Гребенкин✉, А. В. Рябова, А. М. Курамшина, И. В. Кисляков, Е. Д. Жукова

ООО «Экзактэ Лабс», 117246, Россия, г. Москва, Научный пр-д, д. 20 стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Гребенкин Дмитрий Юрьевич. **E-mail:** dmitrii.grebenkin@exactelabs.com

ORCID: Д. Ю. Гребенкин – https://orcid.org/0000-0001-9304-8000; А. В. Рябова – https://orcid.org/0000-0001-5785-2309;
А. М. Курамшина – https://orcid.org/0000-0003-2696-1873; И. В. Кисляков – https://orcid.org/0000-0001-6306-857X;
Е. Д. Жукова – https://orcid.org/0000-0002-0374-1715.

Статья поступила: 01.12.2022 **Статья принята в печать:** 31.01.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. В рамках сравнительной оценки качества лекарственных препаратов, представленных на рынке РФ, проведено исследование теста сравнительной кинетики растворения (ТСКР) и показателя однородности дозирования долей таблеток для семи торговых наименований лекарственных препаратов с МНН «Каптоприл» различных производителей. ТСКР проводили в трех средах растворения (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, ацетатный буферный раствор pH 4,5 и фосфатный буферный раствор pH 6,8) на основании отбора проб по временным точкам 0, 5, 10, 15, 20, 30 мин и их анализа методом УФ-спектрофотометрии при длине волны 212 нм. Проведено сопоставление кинетики высвобождения действующего вещества на основании расчета фактора подобия f_2 и значений относительных стандартных отклонений. Результаты однородности дозирования половин таблеток оценивали на основании расчета фактора AV, анализируя образцы при помощи метода ВЭЖХ-УФ.

Цель. Целью настоящего исследования являлась сравнительная оценка лекарственных препаратов с МНН «Каптоприл» различных производителей, представленных на рынке РФ, на основании исследований однородности дозирования и теста кинетики растворения как критериев оценки качества объектов.

Материалы и методы. Исследование ТСКР проводили с использованием тестера растворения DT 827/1000 (ERWEKA GmbH, Германия). Каждый лекарственный препарат анализировали в трех средах растворения по 12 повторах для каждой среды растворения. Отобранные пробы анализировали на УФ-спектрофотометре UV 1800 (Shimadzu, Япония) при длине волны 212 нм. При исследовании однородности дозирования половин таблеток проводили деление таблеток в соответствии с нанесенной риской, в случае если такая была нанесена, после чего проводили пробоподготовку в соответствии с валидированной методикой, полученные пробы анализировали методом ВЭЖХ-УФ на системе Agilent 1260 (Agilent Technologies, США).

Результаты и обсуждение. На основании результатов ТСКР и проведенных расчетов факторов подобия и значений относительного стандартного отклонения можно сделать вывод о неэквивалентности кинетики высвобождения для ЛП № 4, ЛП № 5, ЛП № 6 в сравнение с референтным препаратом. Проведённое исследование однородности дозирования действующего вещества не выявило отклонений в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.4.2.0008.18 «Однородность дозирования» и Фармакопеи ЕАЭС ОФС.2.1.9.14 «Однородность дозированных единиц».

Заключение. Проведенные выборочные анализы лекарственных препаратов по показателям ТСКР и однородности дозирования на своем примере показывают возможность выявить потенциальные проблемы качества лекарственный препаратов, представленных на рынке РФ, а следовательно, развивать и поддерживать обеспечение качества лекарственных препаратов для национальной системы здравоохранения.

Ключевые слова: «Каптоприл», ТСКР, однородность дозирования, таблетки

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

Вклад авторов. Д. Ю. Гребенкин и А. В. Рябова координировали все этапы исследования ТСКР и однородности дозирования. А. М. Курамшина, И. В. Кисляков и Е. Д. Жукова отвечали за аналитическую часть исследования и статистическую обработку результатов эксперимента. А. В. Рябова проводила оформление рукописи.

Для цитирования: Гребенкин Д. Ю., Рябова А. В., Курамшина А. М., Кисляков И. В., Жукова Е. Д. Сравнительная оценка лекарственных препаратов с МНН «Каптоприл» различных производителей, представленных на рынке РФ, на основании исследований однородности дозирования и теста кинетики растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):131–141. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-131-141

Dissolution Profile Study and Uniformity of Dosage Units Test for Various Manufacturers of "Captopril" Drugs from the Russian Market

Dmitrii Yu. Grebenkin✉, Anastasia V. Ryabova, Adilya M. Kuramshina, Ivan V. Kislyakov, Evgeniya D. Zhukova

LLC "Exacte Labs, Russia", 20/2, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

✉ **Corresponding author:** Dmitrii Yu. Grebenkin. **E-mail:** dmitrii.grebenkin@exactelabs.com

© Гребенкин Д. Ю., Рябова А. В., Курамшина А. М., Кисляков И. В., Жукова Е. Д., 2023
© Grebenkin D. Yu., Ryabova A. V., Kuramshina A. M., Kislyakov I. V., Zhukova E. D., 2023

ORCID: Dmitrii Yu. Grebenkin – https://orcid.org/0000-0001-9304-8000; Anastasia V. Ryabova – https://orcid.org/0000-0001-5785-2309; Adilya M. Kuramshina – https://orcid.org/0000-0003-2696-1873; Ivan V. Kislyakov – https://orcid.org/0000-0001-6306-857X; Evgeniya D. Zhukova – https://orcid.org/0000-0002-0374-1715.

Received: 01.12.2022 **Revised:** 31.01.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. As part of a comparative assessment of drugs quality available on the Russian market a dissolution profile studies and uniformity of dosage units test was conducted for various manufacturers of "Captopril" drugs. Drug release studies in three dissolution media (0.1 M hydrochloric acid, acetate buffer pH 4.5, phosphate buffer pH 6.8) with sampling at 0, 5, 10, 15, 20, 30 min and analysis using UV/Vis spectrophotometer at 212 nm were conducted. Dissolution kinetics was compared based on calculation of the similarity factor f_2 and the values of relative standard deviations. Uniformity of dosage units test of scored tablets were evaluated based on HPLC-UV analysis and AV factor calculation.

Aim. The purpose of this study was a comparative evaluation of "Captopril" drugs from various manufacturers on the Russian market based on dissolution profile studies and uniformity of dosage units test of scored tablets in order to assess the quality of the tablets.

Materials and methods. To prove the dissolution profile studies DT 827/1000 tester (ERWEKA GmbH, Germany) was applied. Each drug in three dissolution media in 12 replicates for each dissolution medium was analyzed. The selected samples were analyzed on a UV 1800 UV spectrophotometer (Shimadzu, Japan) at a of 212 nm. In uniformity of dosage units test of scored tablets each tablet was divided according to the applied mark. Sample preparation was carried out in accordance with a validated method and samples were analyzed by HPLC-UV using Agilent 1260 (Agilent Technologies, США).

Results and discussion. Based on the results of dissolution profile studies and calculations of the similarity factors and values of the relative standard deviation it can be concluded that the dissolution kinetics for drug no. 4, drug no. 5, drug no. 6 are not equivalent in comparison with the reference drug. During the uniformity of dosage units test of scored tablets, no deviations were found in accordance with the requirements of the RF Pharmacopoeia OFS.1.4.2.0008.18 "Uniformity of dosing" and the EAEU Pharmacopoeia OFS.2.1.9.14 "Uniformity of Dosed Units".

Conclusion. The conducted dissolution profile studies and uniformity of dosage for scored tablets of Captopril drugs show the example of possibility to identify potential problems with drugs quality presented on the Russian market and as a result improve and maintain quality assurance of drugs for the national healthcare system.

Keywords: "Captopril", dissolution profile studies, uniformity of dosage, tablets

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. Dmitrii Yu. Grebenkin, Anastasia V. Ryabova coordinated all stages of the dissolution profile study and uniformity of dosage for scored tablets. Adilya M. Kuramshina, Ivan V. Kislyakov, Evgeniya D. Zhukova carried out the analytical part of the study and the statistical part of the study. Anastasia V. Ryabova wrote the text of the manuscript.

For citation: Grebenkin D. Yu., Ryabova A. V., Kuramshina A. M., Kislyakov I. V., Zhukova E. D. Dissolution profile study and uniformity of dosage units test for various manufacturers of "Captopril" drugs from the Russian market. *Drug development & registration*. 2023;12(1):131–141. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-131-141

ВВЕДЕНИЕ

Исследование лекарственных препаратов, представленных на рынке РФ, и сопоставление полученных результатов – важный аспект для обзора качества лекарственных препаратов с одинаковым международным непатентованным наименованием (МНН) с целью развития института обеспечения качества лекарственных препаратов и медицинских изделий для национальной системы здравоохранения, на что указано в программе «Фарма-2030»[1]. В качестве объекта исследования выбраны таблетки немедленного высвобождения с МНН «Каптоприл», широко представленные различными производителями на рынке РФ.

«Каптоприл» (1-[(2S)-3-меркапто-2-метилпропраноил]-L-пролин) – антигипертензивный препарат, первый препарат из класса ингибиторов, подавляющих активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) [1–3]. АПФ является ферментом, ответственным за превращение неактивного ангиотензина I в пептид ангиотензина II [4] Каптоприл используется для лечения повышенного кровяного давления, сердечной недостаточности и для предотвращения почечной недостаточности из-за высокого кровяного давления и диабета. Он обладает высокой растворимостью в воде и после перорального приема 60–75 % дозы всасывается, а пиковые концентрации в плазме достигаются в течение 1 часа [5].

В литературных источниках каптоприл иногда относят к классу I (высокая растворимость и высокая проницаемость) по биофармацевтической классификационной системе (БКС) [6]. Однако ряд авторов относят каптоприл к классу III по БКС (высокая растворимость и низкая проницаемость) [7–9]. БКС предполагает, что для лекарств с высокой растворимостью и высокой проницаемостью (класс I) и, в некоторых случаях, для лекарств с высокой растворимостью и низкой проницаемостью (класс III) растворение более 85 % за 15 минут может гарантировать, что биодоступность лекарства не ограничена растворением

[1] Правительство утвердило программу «Фарма-2030» Доступно по: https://pharmvestnik.ru/content/news/Pravitelstvo-utverdilo-programmu-Farma-2030.html. Ссылка активна на 23.01.2023.

субстанции. В этих случаях этапом, лимитирующем скорость всасывания лекарственного средства, является опорожнение желудка. Классификационная система БКС лежит в основе современного регуляторного подхода к замене исследований биоэквивалентности (БЭ) сравнительными тестами кинетики растворения (ТКР). Согласно руководствам FDA[1, 2], ВОЗ[3], EMA[4], а также ЕАЭС (Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», 2016 г.), действующему в России, сравнительный ТКР может заменять исследование БЭ для препаратов классов I и III по БКС, т. е. надежно характеризовать биодоступность и системную экспозицию, а, следовательно, эффективность и безопасность лекарственных средств [10].

В целях оценки качества объектов исследования были выбраны тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР) и метод однородности дозирования [11–13]. Для наиболее полной оценки кинетики высвобождения каптоприла исследование проводили в трех средах растворения [14–15]: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты (среда контроля качества), ацетатный буферный раствор pH 4,5 и фосфатный буферный раствор pH 6,8 (в соответствии с требованиями Решения Совета ЕЭК № 85 от 03 ноября 2016 г. «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза»).

Так как применение лекарственных препаратов с МНН каптоприл часто сопряжено с необходимостью деления таблеток в соответствии с нанесенной риской для достижения оптимального терапевтического эффекта, было принято решение проанализировать однородность дозирования отдельных долей, полученных в результате деления таблеток по нанесенной риске, с целью выявления потенциальных рисков для пациента и нарушения точности дозирования фармацевтической субстанции. На важность контроля за разделением таблеток указывает Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, США), отмечая, что если таблетка одобрена FDA[5] для разделения, то это указывается на упаковке [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве представительных объектов исследования, представленных на рынке РФ, было выбрано 7 наименований лекарственных препаратов (ЛП):

1. Капотен® [каптоприл, таблетки 25 мг, АО «Акрихин», Россия, серия 951021, срок годности до 10.2026 (далее референтный препарат)].
2. Каптоприл-ФПО® [каптоприл, таблетки 25 мг, АО «Оболенское ФП», Россия, серия 150821, срок годности до 08.2024 (далее ЛП № 1)].
3. Каптоприл Велфарм® [каптоприл, таблетки 25 мг ООО «Велфарм», Россия, серия 570921, срок годности до 09.2024 (далее ЛП № 2)].
4. Каптоприл-АКОС® [каптоприл, таблетки 50 мг, ОАО «Синтез», Россия, серия 560921, срок годности до 09.2026 (далее ЛП № 3)].
5. Каптоприл-СТИ® [каптоприл, таблетки 50 мг, ОАО «АВВА РУС», Россия, серия 250621, срок годности до 06.2024 (далее ЛП № 4)].
6. Каптоприл® [каптоприл, таблетки 50 мг, ООО «Пранафарм», Россия, серия 1030921, срок годности до 08.09.2023 (далее ЛП № 5)].
7. Каптоприл® [каптоприл, таблетки 50 мг, ООО «Озон», Россия, серия 320821, срок годности до 07.2024 (далее ЛП № 6)].

В качестве стандартного образца использовали Каптоприл® стандарт Фармакопеи США (USP standard). В исследовании использовали следующие реактивы: калий дигидрофосфат моногидрат (ч.д.а., PanReac, Испания); хлористоводородная кислота (х.ч., ООО «АЛЬДОСА»); натрий ацетат тригидрат (ч.д.а., ООО ТД «ХИММЕД», Россия); уксусная кислота ледяная (ч.д.а. ACS reagent, Thermo Fisher Chemical, США); фосфорная кислота (ч.д.а., АО «ВЕКТОН», Россия); гидроксид натрия (ч.д.а., АО «ЛенРеактив», Россия); метанол (ч.д.а., Ultra Gradient Grade, J.T. Baker, Нидерланды). Исследование проводили с применением следующего оборудования: тестер для определения растворения DT 827/1000 (ERWEKA GmbH, Германия); УФ-спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония); весы электронные ML204/M01 (Mettler Toledo GmbH, Швейцария); pH-метр Seven2Go (Mettler Toledo GmbH, Швейцария); ВЭЖХ система Agilent 1260 (Agilent Technologies, США); центрифуга с охлаждением Eppendorf 5810 (Eppendorf, Германия), хроматографическая колонка µBondapak Phenyl Column 300 × 3,9 мм. Все оборудование было своевременно проверено/аттестовано.

[1] M9 Biopharmaceutics Classification SystemBased Biowaivers Guidance for Industry. Available at: https://www.fda.gov/media/148472/download. Accessed: 23.01.2023.

[2] The Use of Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses – Biopharmaceutics Applications for Oral Drug Product Development, Manufacturing Changes, and Controls. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/use-physiologically-based-pharmacokinetic-analyses-biopharmaceutics-applications-oral-drug-product. Accessed: 23.01.2023.

[3] WHO Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements. Available at: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/who_trs1003_annex6.pdf. Accessed: 23.01.2023.

[4] ICH M9 guideline on biopharmaceutics classification system-based biowaivers Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5_en.pdf. Accessed: 23.01.2023.

[5] Best Practices for Tablet Splitting. Available at: https://www.fda.gov/drugs/ensuring-safe-use-medicine/best-practices-tablet-splitting. Accessed: 23.01.2023.

Методика ТСКР

Тест Растворение проводили согласно Фармакопеи ЕАЭС ОФС.2.1.9.3 «Испытание на растворение для твердых дозированных лекарственных форм» и Государственной фармакопеи, ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» на аппарате «Вращающаяся корзинка» (DT 827/1000, ERWEKA GmbH, Германия) при скорости вращения 50 об/мин при температуре 37,0 ± 0,5 °С в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты (среда контроля качества), ацетатный буферный раствор pH 4,5 и фосфатный буферный раствор pH 6,8. Объем сред растворения составил 900 мл. Временные точки отбора проб: 0, 5, 10, 15, 20 и 30 мин.

В каждый из 6 сосудов для растворения помещали 900 мл предварительно дегазированной среды растворения, термостатировали при 37 ± 0,5 °С, отбирали по 10 мл среды (временная точка 0 мин) и восполняли объем средой растворения по 10 мл. Среду растворения снова термостатировали при 37 ± 0,5 °С, в каждый стакан вносили по одной таблетке. Спустя указанные промежутки времени проводили отбор 10 мл. Все пробы фильтровали через мембранный фильтр из гидрофильного политетрафторэтилена (PTFE HP) с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2–3 мл фильтрата.

Количественное определение высвободившегося каптоприла проводили методом УФ-спектрофотометрии, измеряя оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 212 нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм.

Испытание проводили на 12 единицах каждого лекарственного средства отдельно для каждой из трех сред растворения.

Методика однородности дозирования

Исследование однородности дозирования проводили в соответствии с требованиями Фармакопеи ЕАЭС ОФС.2.1.9.14 «Однородность дозированных единиц» и ГФ РФ ОФС.1.4.2.0008.18 «Однородность дозирования». От каждой испытуемой серии препарата отбирали случайным образом пробы в количестве 30 единиц, из них в произвольном порядке отбирали 10 единиц для проведения первого этапа испытания. Проводили деление отобранных 10 таблеток в соответствии с нанесенной риской. Для проведения анализа от каждой единицы таблетки отбирали только одну часть после деления, оставшиеся части отбрасывали. Деление таблеток проводили следующим образом:

1. Капотен®, таблетки 25 мг (АО «Акрихин», Россия, серия 951021, срок годности до 10.2026), деление таблетки проводили на 4 части.
2. Каптоприл-ФПО®, таблетки 25 мг (АО «ФП «Оболенское», Россия, серия 150821, срок годности до 08.2024), деление таблетки не проводили, так как риска не нанесена.
3. Каптоприл Велфарм®, таблетки 25 мг (ООО «Велфарм», Россия, серия 570921, срок годности до 09.2024), деление таблетки проводили на 2 части.
4. Каптоприл-АКОС®, таблетки 50 мг (ОАО «Синтез», Россия, серия 560921, срок годности до 09.2026), деление таблетки проводили на 2 части.
5. Каптоприл-СТИ®, таблетки 50 мг (АО «АВВА РУС», Россия, серия 250621, срок годности до 06.2024), деление таблетки проводили на 2 части.
6. Каптоприл®, таблетки 50 мг (ООО «ПРАНАФАРМ», Россия, серия 1030921, срок годности до 08.09.2023), деление таблетки проводили на 2 части.
7. Каптоприл®, таблетки 50 мг (ООО «ОЗОН», Россия, серия 320821, срок годности до 07.2024), деление таблетки проводили на 2 части.

В каждой из отобранных долей таблеток определяли содержание действующего вещества методом ВЭЖХ-УФ. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанола, воды и фосфорной кислоты, концентрированной в соотношении 550:450:0,5. Разделение проводили на хроматографической колонке µBondapak Phenyl Column 300 × 3,9 мм при скорости потока 1,0 мл/мин, детектирование проводили на УФ-детекторе при длине волны 220 нм. Время хроматографирования составило 8 мин. Время удерживания пика каптоприла составило около 4 мин. В качестве стандартного раствора использовали раствор стандартного образца каптоприла USP в метаноле с концентрацией 1 мг/мл, пример полученной хроматограммы отображен на рисунке 1. Стандартный раствор готовили в двух повторах для проверки фактора сходимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ТСКР

В соответствии с требованиями Руководства по экспертизе лекарственных средств, том I, 2014 г. и Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» кинетика растворения ЛС считается эквивалентной в случае выполнения следующих условий:

- ✓ Когда более 85 % лекарственного вещества переходит в раствор в течение 15 мин, кинетика растворения считается эквивалентной без дальнейшего математического анализа данных.
- ✓ Когда величина стандартного отклонения для среднего значения для первой временной точки не превышает 20 %; для остальных точек – 10 %.
- ✓ Когда значение фактора подобия f_2 принадлежит интервалу от 50 до 100.

Для референтного препарата Капотен®, ЛП № 1, ЛП № 2 и ЛП № 3 высвобождение каптоприла составило более 85 % за 15 мин, значения относительного стандартного отклонения для 15 мин составили не

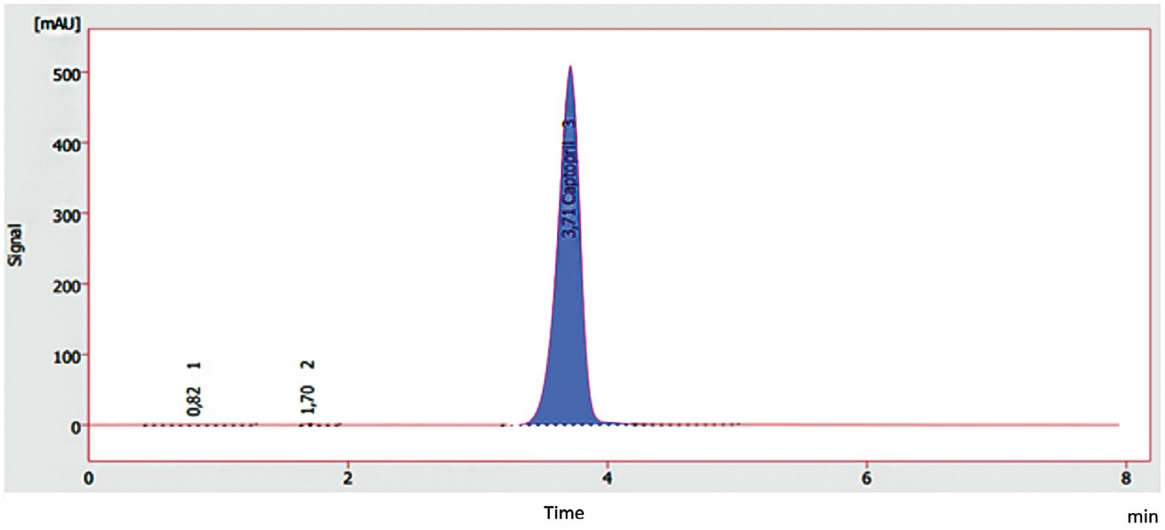


Рисунок 1. **Пример хроматограммы стандартного образца каптоприла 1 мг/мл**

Figure 1. **Captopril standard solution chromatogram 1 mg/ml, example**

более 10 % во всех исследуемых средах растворения (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты (среда контроля качества), ацетатный буферный раствор pH 4,5 и фосфатный буферный раствор pH 6,8) (таблица 1, рисунки 2–7), следовательно, профили высвобождения можно признать эквивалентными без дальнейшего математического анализа и расчета фактора подобия.

Для ЛП № 4 и ЛП № 6 проводили расчет фактора подобия на основании высвобождения менее 85 % на 15 мин относительно референтного лекарственного препарата Капотен®, во всех исследуемых средах растворения, значения f_2 составили менее 50: для среды контроля качества 36,8 и 31,9 (таблицы 2–4) соответственно, для среды буферного раствора pH 6,8, 26,2 и 23,6 соответственно, для среды ацетатного буферного раствора pH 4,5, 30,8 и 23,3 соответственно.

Для некоторых временных точек были отмечены значения относительного стандартного отклонения для ЛП № 4 и ЛП № 6 для среднего значения, превышающие 10 % во всех исследуемых средах растворения.

Для ЛП № 5 средние значения процента высвобождения на 15 мин также составляли более 85 %, но

Таблица 1. **Сравнение результатов усредненного процента высвобождения каптоприла на 15 мин, результатов относительного стандартного отклонения и значений фактора подобия (f_2) для исследуемых лекарственных препаратов**

Table 1. **Comparison captopril results for average percentage release at 15 min, RSD results and similarity factor (f_2) results**

Объект исследования Research sample	Значения высвобождения и ОСО на 15 мин Release and RSD values at 15 min		
	0,1 М раствор хлористоводородной кислоты 0.1 M hydrochloric acid solution	Фосфатный буферный раствор pH 6,8 Phosphate buffer pH 6.8	Ацетатный буферный раствор pH 4,5 Acetate buffer pH 4.5
Референтный препарат Капотен® Reference drug Capoten®	99,1 % ОСО = 3,4	99,0 % ОСО = 2,7	97,7 % ОСО = 3,3
ЛП № 1 Sample № 1	98,8 % ОСО = 2,1	102,0 % ОСО = 1,6	96,8 % ОСО = 4,0
ЛП № 2 Sample № 2	102,5 % ОСО = 2,4	101,6 % ОСО = 2,6	97,4 % ОСО = 2,4
ЛП № 3 Sample № 3	100,8 % ОСО = 1,3	103,1 % ОСО = 1,4	97,4 % ОСО = 2,1
ЛП № 4 Sample № 4	83,7 % ОСО = 11,9 f_2 = 36,8	72,6 % ОСО = 14,6 f_2 = 26,2	72,6 % ОСО = 16,7 f_2 = 30,8
ЛП № 5 Sample № 5	86,9 % ОСО = 26,2	97,1 % ОСО = 14,1	86,9 % ОСО = 21,2
ЛП № 6 Sample № 6	77,8 % ОСО = 11,0 f_2 = 31,9	74,5 % ОСО = 14,5 f_2 = 23,6	61,7 % ОСО = 11,9 f_2 = 23,3

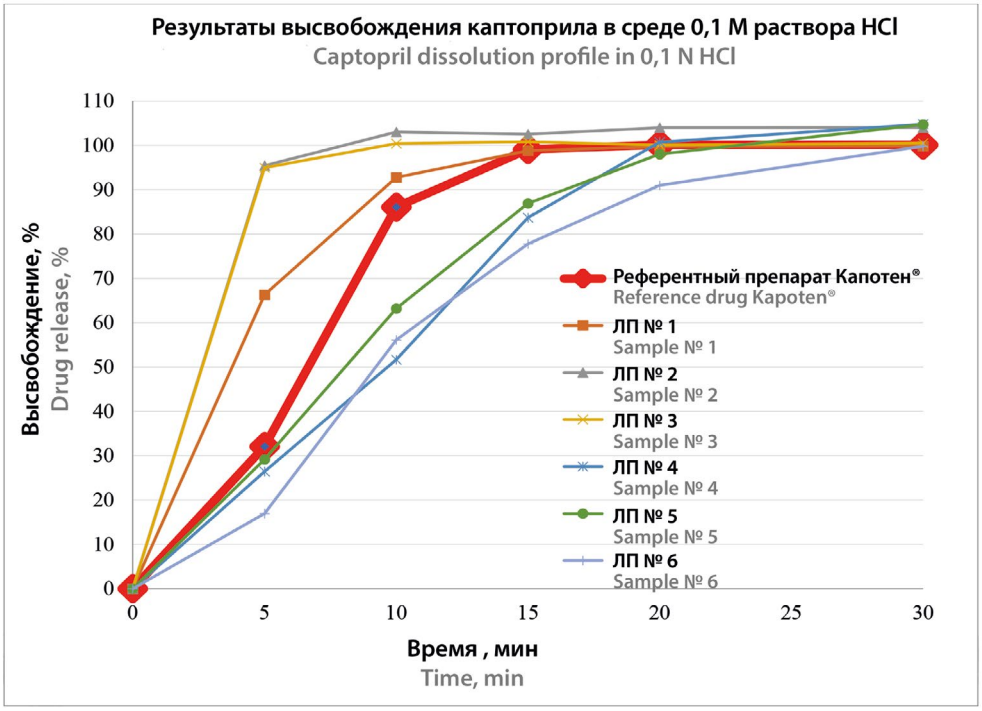


Рисунок 2. Сводный рисунок усредненных профилей процента высвобождения каптоприла из семи исследуемых лекарственных препаратов в среде контроля качества.

Figure 2. Captopril dissolution profile in 0,1 N HCl for seven samples

значения относительного стандартного отклонения превышали 10 % во всех исследуемых средах растворения, следовательно, профиль высвобождения в данном случае нельзя признать эквивалентным референтному препарату Капотен® на основании высокой вариабельности и низкой репрезентативности результатов для данного препарата (результаты расчетов отображены в таблице 2).

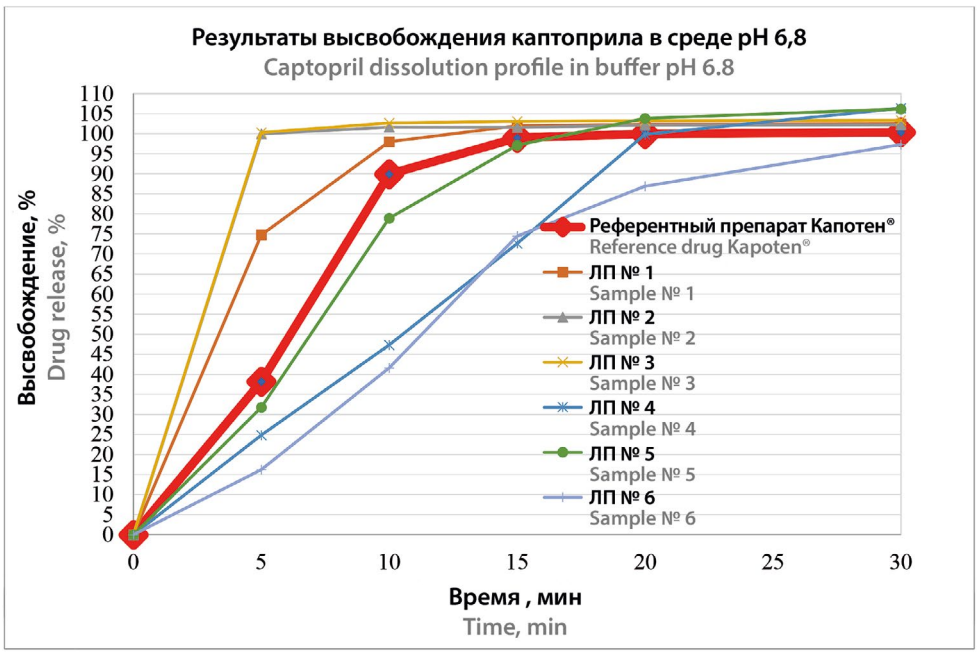


Рисунок 3. Сводный рисунок усредненных профилей процента высвобождения каптоприла из семи исследуемых лекарственных препаратов в фосфатном буферном растворе pH 6,8

Figure 3. Captopril dissolution profile in buffer pH 6.8 for seven samples

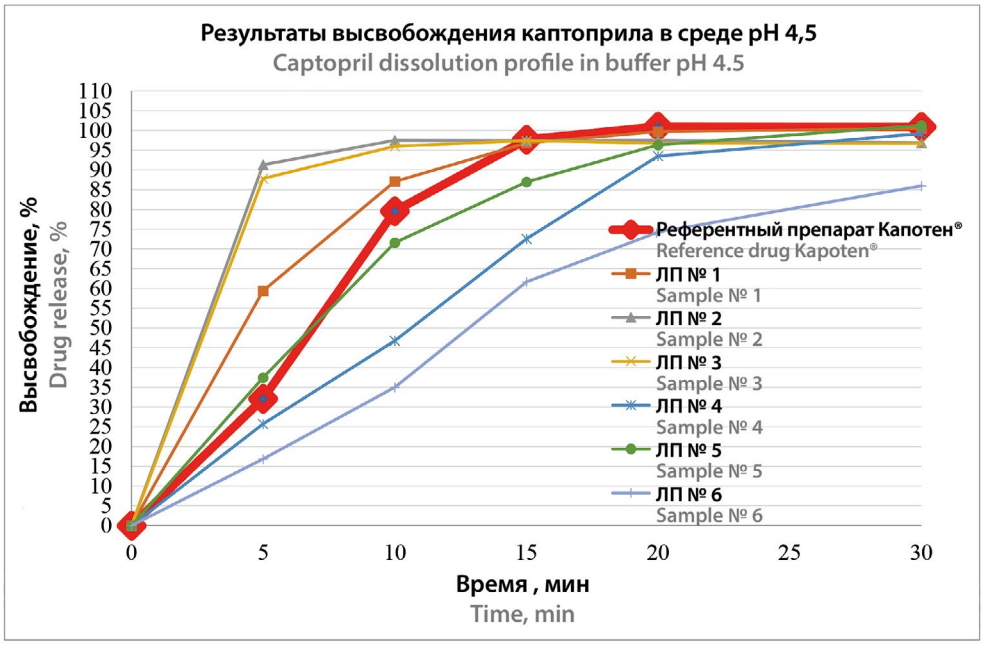


Рисунок 4. Сводный рисунок усредненных профилей процента высвобождения каптоприла из семи исследуемых лекарственных препаратов в ацетатном буферном растворе pH 4,5

Figure 4. Captopril dissolution profile in buffer pH 4.5 for seven samples

Таблица 2. Индивидуальные и усредненные значения процента высвобождения каптоприла из ЛП № 5 (0,1 М хлористоводородная кислота, среда контроля качества)

Table 2. Captopril percentage release, individual and average values for Sample No. 5 (0.1 M hydrochloric acid, quality control medium

№ пробы Sample number	0 мин 0 min	5 мин 5 min	10 мин 10 min	15 мин 15 min	20 мин 20 min	30 мин 30 min
1	0	14,7	35,5	70,5	92,4	102,3
2	0	22,0	49,7	86,2	99,0	105,6
3	0	37,5	89,4	104,1	105,8	106,0
4	0	24,2	68,6	100,0	104,9	104,0
5	0	24,1	56,8	96,3	105,7	106,3
6	0	22,7	63,8	104,4	109,8	109,8
7	0	18,3	38,5	64,4	87,2	104,8
8	0	37,9	97,5	103,8	107,7	106,1
9	0	15,9	27,9	38,1	61,5	96,2
10	0	59,7	102,5	108,3	112,6	112,6
11	0	22,4	38,5	61,8	82,9	95,8
12	0	50,9	89,7	105,0	106,8	107,0
Среднее, % Average, %	0	29,2	63,2	86,9	98,0	104,7
CO SD	N/A	14,28	26,26	22,81	14,76	4,85
OCO RSD	N/A	48,9	41,5	26,2	15,1	4,6

Таблица 3. Результаты расчета фактора подобия (f_2) для референтного препарата и ЛП № 4 (среда контроля качества)

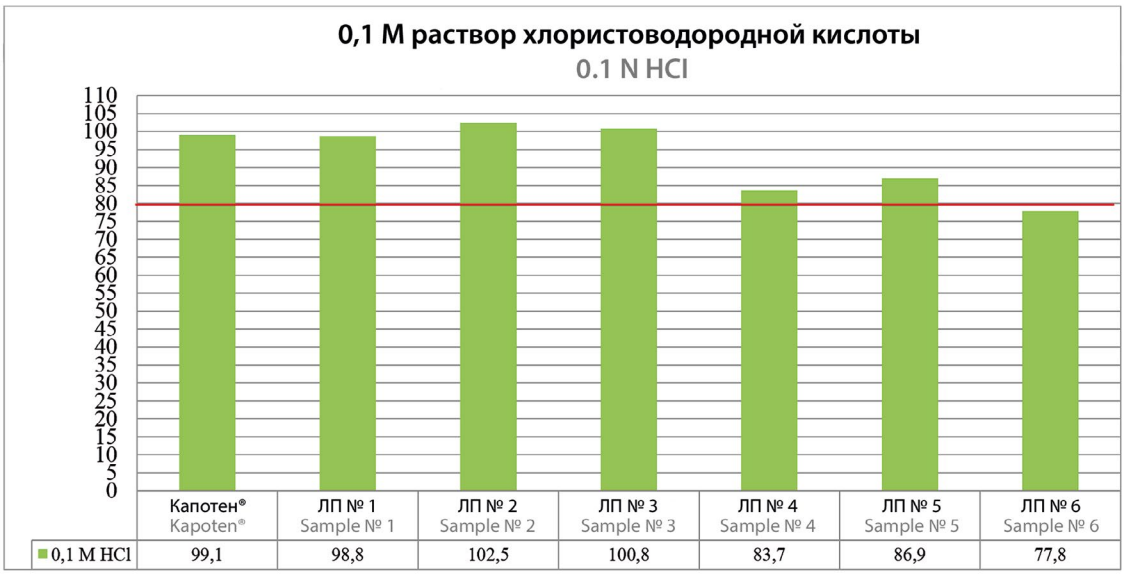
Table 3. Reference drug and Sample № 4 similarity factor (f_2) results (QC medium)

Время, мин Time, min	Референтный препарат Капотен® Reference drug Capoten®	ЛП № 4 Sample № 4
5	32,1	26,5
10	79,6	51,7
15	97,7	83,7
n	3	
f_2	36,8	

Таблица 4. Результаты расчета фактора подобия (f_2) для референтного препарата и ЛП № 6 (среда контроля качества).

(Table 4. Reference drug and Sample № 6 similarity factor (f_2) results (QC medium)

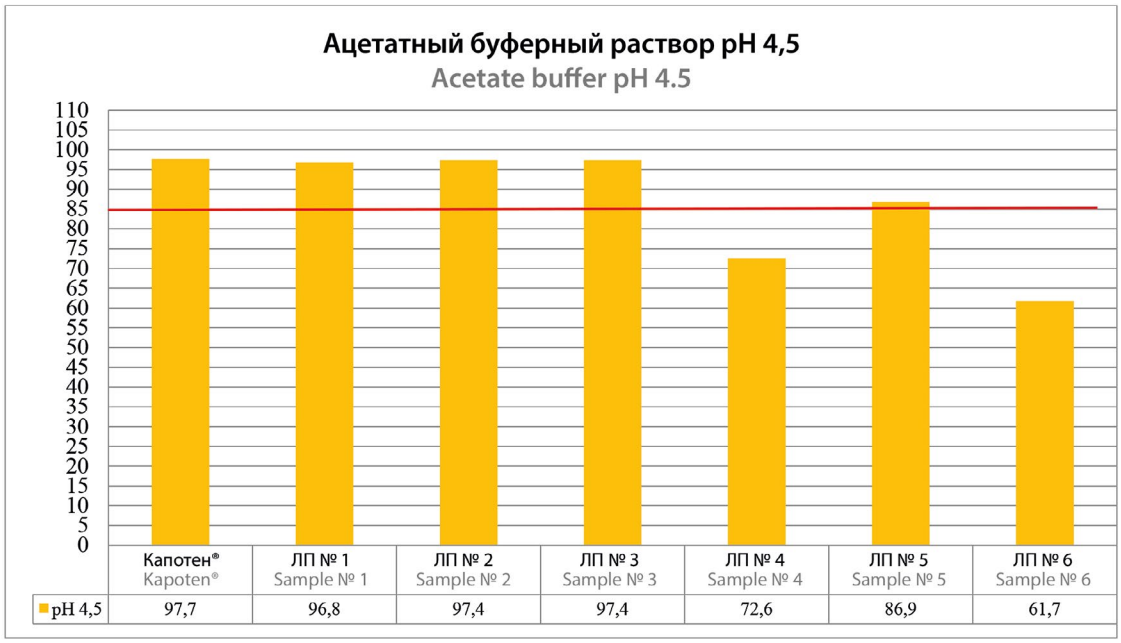
Время, мин Time, min	Референтный препарат Капотен® Reference drug Capoten®	ЛП № 6 Sample № 6
5	32,1	16,9
10	86,1	56,1
15	99,1	77,8
n	3	
f_2	31,9	



	Капотен® Kapoten®	ЛП № 1 Sample № 1	ЛП № 2 Sample № 2	ЛП № 3 Sample № 3	ЛП № 4 Sample № 4	ЛП № 5 Sample № 5	ЛП № 6 Sample № 6
0,1 М HCl	99,1	98,8	102,5	100,8	83,7	86,9	77,8

Рисунок 5. Сравнение среднего процента высвобождения каптоприла на 15 мин в среде контроля качества

Figure 5. Comparison of captopril mean percent release at 15 min for QC medium



	Капотен® Kapoten®	ЛП № 1 Sample № 1	ЛП № 2 Sample № 2	ЛП № 3 Sample № 3	ЛП № 4 Sample № 4	ЛП № 5 Sample № 5	ЛП № 6 Sample № 6
pH 4,5	97,7	96,8	97,4	97,4	72,6	86,9	61,7

Рисунок 6. Сравнение среднего процента высвобождения каптоприла на 15 мин в среде ацетатного буферного раствора pH 4,5

Figure 6. Comparison of captopril mean percent release at 15 min for acetate buffer solution pH 4.5

Исследование однородности дозирования

В рамках каждой аналитической последовательности перед анализом испытуемых растворов проводили 6 вводов раствора стандартного образца каптоприла № 1 и два ввода раствора стандартного образца каптоприла № 2 и проверяли параметры проверки пригодности хроматографической системы:

1. Фактор сходимости стандартных растворов 1 и 2 составлял не более 2 %.
2. Фактор асимметрии (симметричность) пика каптоприла не более 1,5 на хроматограмме стандартного раствора.
3. Количество теоретических тарелок для пика каптоприла составляло не менее 1000 на хроматограмме стандартного раствора.
4. Относительное стандартное отклонение площади пика каптоприла на хроматограмме стандартного раствора составляло не более 2,0 %.



Рисунок 7. **Сравнение среднего процента высвобождения каптоприла на 15 мин в среде фосфатного буферного раствора pH 6,8**

Figure 7. **Comparison of captopril mean percent release at 15 min for pH 6.8**

В таблице 5 и рисунке 8 представлены результаты однородности дозирования, полученные в результате анализа 10 единиц таблеток каждого исследуемого препарата. На основании полученных хроматограмм было рассчитано содержание каптоприла в каждой таблетке в процентах от заявленного количества и значения AV в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.4.2.0008.18 «Однородность дозирования» и Фармакопеи ЕАЭС ОФС.2.1.9.14 «Однородность дозированных единиц». Полученные

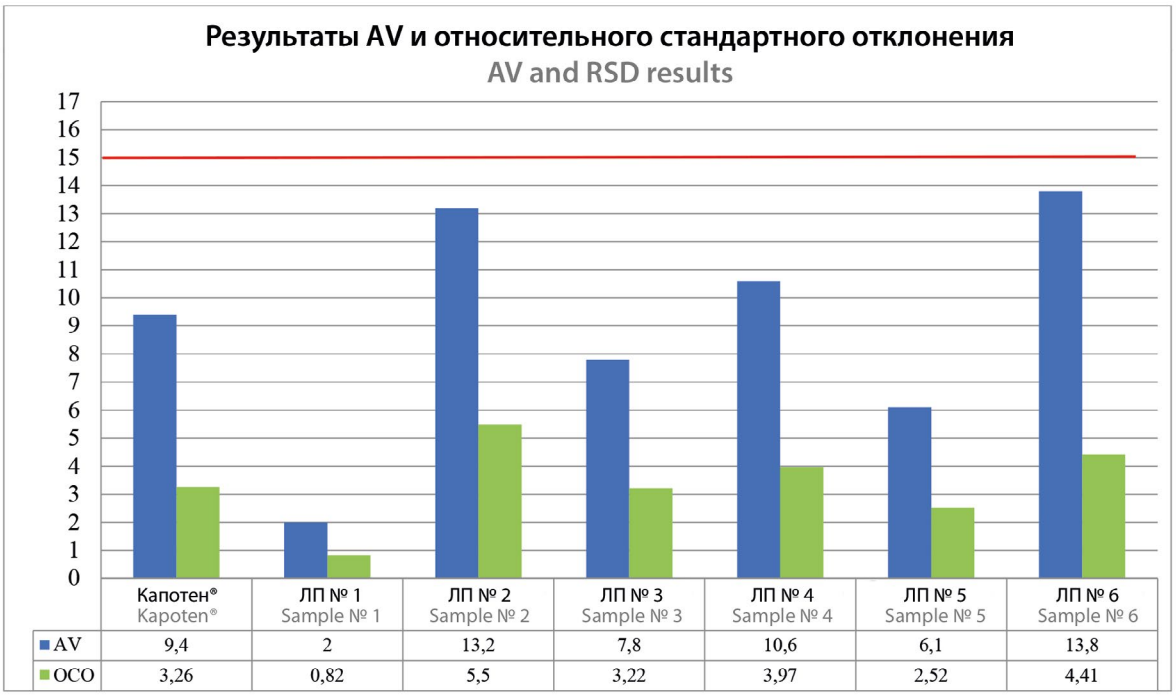


Рисунок 8. **Сравнение результатов исследования однородности AV и относительного стандартного отклонения**

Figure 8. **Uniformity of dosage units comparison results for AV and RSD**

результаты показали, что при делении таблеток в соответствии с нанесенной риской или без деления, когда риска не нанесена, значения AV не превышают 15, что подтверждает однородность дозирования каптоприла в исследуемых лекарственных препаратов.

Таблица 5. Сравнение результатов исследования однородности: среднее содержание каптоприла X%, AV и относительного стандартного отклонения для исследуемых лекарственных препаратов.

Table 5. Uniformity of dosage units comparison results for average content X%, AV and RSD

Наименование препарата Drug name	**Среднее содержание каптоприла, X%** Captopril average content, X%	**AV**	**ОСО** RSD
Референтный препарат Капотен® Reference drug Capoten®	96,6	9,4	3,26
ЛП № 1 Sample № 1	100,8	2,0	0,82
ЛП № 2 Sample № 2	99,9	13,2	5,50
ЛП № 3 Sample № 3	101,4	7,8	3,22
ЛП № 4 Sample № 4	102,4	10,6	3,97
ЛП № 5 Sample № 5	101,3	6,1	2,52
ЛП № 6 Sample № 6	104,2	13,8	4,41

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» можно сделать вывод об эквивалентности профилей высвобождения каптоприла из лекарственных препаратов: референтного препарата Капотен®, ЛП № 1, ЛП № 2 и ЛП № 3 – на основании высвобождения действующего вещества более 85 % за 15 мин во всех исследуемых средах растворения.

Для образцов ЛП № 4 и ЛП № 6 можно сделать вывод о неэквивалентности результатов высвобождения каптоприла в сравнении с референтным препаратом Капотен® на основании рассчитанных значений фактора подобия f_2, которые составили менее 50 во всех исследуемых средах растворения. Для образца ЛП № 5 отмечены значения относительного стандартного отклонения, превышающие 10 % на 15 мин, что свидетельствует о высокой вариабельности результатов высвобождения между отдельными единицами таблеток, что также не позволяет признать препарат эквивалентным референтному препарату Капотен®.

Таким образом, полученные данные проведенного ТСКР могут свидетельствовать о том, что эффективность применения исследуемых лекарственных препаратов ЛП № 4, ЛП № 5 и ЛП № 6 может отличаться от эффективности референтного препарата Капотен®.

Проведенное исследование однородности дозирования действующего вещества (каптоприл), для референтного препарата Капотен® и ЛП № 1 – ЛП № 6 не выявило отклонений в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.4.2.0008.18 «Однородность дозирования» и Фармакопеи ЕАЭС ОФС.2.1.9.14 «Однородность дозированных единиц». Для всех исследуемых препаратов значения AV показали значения ниже 15, что подтверждает однородность дозирования каптоприла в исследуемых лекарственных препаратах и возможность деления таблетки по риске при ее наличии.

Проведенное исследование показало, что подобные выборочные анализы могут помочь выявить потенциальные проблемы качества лекарственный препаратов, представленных на рынке РФ, а следовательно, развивать и поддерживать обеспечение качества лекарственных препаратов для национальной системы здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tastemur Y., Gumus E., Ergul M., Ulu M., Akkaya R., Öztürk A., Taskiran A. S. Positive effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, captopril, on pentylenetetrazole-induced epileptic seizures in mice. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2020;19(3):637–643. DOI: 10.4314/tjpr.v19i3.26.
2. Jin L., Liu C., Zhang N., Zhang R., Yan M., Bhunia A., Zhang Q., Liu M., Han J., Siebert H.-C. Attenuation of Human Lysozyme Amyloid Fibrillation by ACE Inhibitor Captopril: A Combined Spectroscopy, Microscopy, Cytotoxicity, and Docking Study. *Biomacromolecules*. 2021;22(5):1910–1920. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c01802.
3. Alcaide-Hidalgo J. M., Margalef M., Bravo F. I, Muguerza B., López-Huertas E. Virgin olive oil (unfiltered) extract contains peptides and possesses ACE inhibitory and antihypertensive activity. *Clinical Nutrition*. 2020;39(4):1242–1249. DOI: 10.1016/j.clnu.2019.05.016.
4. Nizardo N. M., Ashilah G., Budianto E. In vitro efficiency and dissolution test from captopril microencapsulation by variating composition in polyblend poly (D-lactic acid) and polycaprolactone. *AIP Conference Proceedings*. 2020;2242(1). DOI: 10.1063/5.0008192.
5. Moffat A. C., Osselton M. D., Winddop B., Watts J. Clarke's Analysis of Drugs and Poison. *Chromatographia*. 2011;74(7–8):649–650. DOI: 10.1007/s10337-011-2100-9.
6. Gadad A. P., Reddy A. D., Dandagi P. M., Masthiholimath V. S. Design and characterization of hollow/porous floating beads of Captopril for pulsatile drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical*. 2012;6(2):137–143. DOI: 10.4103/0973-8398.102938.
7. Kumar K. M., Anil B. Biopharmaceutical disposition classification system: an extension of the bio pharmaceutical classification system. *International Research Journal of Pharmacy*. 2012;3(3):5–10.

8. Yasir M., Asif M., Kumar A., Aggarval A. Biopharmaceutical classification system. *International Journal of PharmaTech Research*. 2010;2(3):1681–1690.
9. Karakosta T. D., Tzanavaras P. D., Zacharis C. K. Development and Validation of an Automated Zone Fluidics-Based Sensor for In Vitro Dissolution Studies of Captopril Using Total Error Concept. *Molecules*. 2021;26(4):824. DOI: 10.3390/molecules26040824.
10. Kapoor D., Maheshwari R., Verma K., Sharma S., Pethe A., Tekade R. K. Fundamentals of diffusion and dissolution: dissolution testing of pharmaceuticals. *Drug Delivery Systems*. 2020;1–45. DOI: 10.1016/B978-0-12-814487-9.00001-6.
11. Klein S. Advancements in Dissolution Testing of Oral and Non-oral Formulations. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(7):266. DOI: 10.1208/s12249-019-1479-8.
12. Charalabidis A., Sfouni M., Bergström C., Macheras P. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;566:264–281. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.041.
13. Butler J., Hens B., Vertzoni M., Brouwers J., Berben P., Dressman J., Andreas C. J., Schaefer K. J., Mann J., McAllister M., Jamei M., Kostewicz E., Kesisoglou F., Langguth P., Minekus M., Müllertz A., Schilderink R., Koziolek M., Jedamzik P., Weitschies W., Reppas C., Augustijns P. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms: Recent progress from partnership through the IMI OrBiTo collaboration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;136:70–83. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.12.010.
14. Zaborenko N., Shi Z., Corredor C. C., Smith-Goettler B. M., Zhang L., Hermans A., Neu C. M., Alam Md A., Cohen M. J., Lu X., Xiong L., Zacour B. M. First-Principles and Empirical Approaches to Predicting In Vitro Dissolution for Pharmaceutical Formulation and Process Development and for Product Release Testing. *The AAPS journal*. 2018;21(3):32. DOI: 10.1208/s12248-019-0297-y.
15. Butler J. M., Hens B., Vertzoni M., Brouwers J. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*. 2011;18(3):15–18. DOI: 10.14227/DT180311P15.
16. Egorova S. N., Pavlova A. I., Khafizova G. F., Khayatov A. R., Vorobyova N. V. On the need for introducing the pharmaceutical-technological test "Uniformity of mass of subdivided tablets" in the State Pharmacopeia of Russia. *JOURNAL OF SIBERIAN MEDICAL SCIENCES*. 2020;2:20–29. (In Russ.) DOI: 10.31549/2542-1174-2020-2-20-29.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-142-153
УДК 615.038

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата «Эзетимиб + розувастатин» (АО «Санофи-авентис груп», Россия): результаты и опыт применения ферментативного гидролиза при анализе образцов

А. Л. Хохлов[1], Д. Ю. Гребенкин[2]✉, Е. К. Фаева[2], В. И. Казей[2], А. А. Хохлов[5], А. Е. Мирошников[3], О. В. Лебедева[4]

[1] ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России), 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5
[2] ООО «Экзактэ Лабс», 117246, Россия, г. Москва, Научный пр-д, д. 20, стр. 2
[3] ООО «КлинФармИнвест», 150031, Россия, г. Ярославль, ул. Угличская, д. 68
[4] Представительство АО «Санофи-авентис груп» (Франция), 125009, Россия, г. Москва, ул. Тверская, д. 22
[5] ООО «АХ СТ», 150040, Россия, г. Ярославль, пл. Труда, зд. 1

✉ **Контактное лицо:** Гребенкин Дмитрий Юрьевич. **E-mail:** dmitrii.grebenkin@exactelabs.com

ORCID: А. Л. Хохлов – https://orcid.org/0000-0002-0032-0341; Д. Ю. Гребенкин – https://orcid.org/0000-0001-9304-8000; Е. К. Фаева – https://orcid.org/0000-0002-8639-4316; В. И. Казей – https://orcid.org/0000-0003-2032-6289; А. А. Хохлов – https://orcid.org/0000-0002-6684-4199; А. Е. Мирошников – https://orcid.org/0000-0001-6657-3950; О. В. Лебедева – https://orcid.org/0000-0002-7983-685X.

Статья поступила: 22.02.2022 **Статья принята в печать:** 07.02.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. В рамках регистрации комбинированного препарата «Эзетимиб + розувастатин» (АО «Санофи-авентис груп», Россия) было проведено исследование его биоэквивалентности по сравнению с совместно принимаемым монокомпонентным препаратом Эзетрол® (эзетимиб) и Крестор® (розувастатин) с участием 76 здоровых добровольцев. Для оценки фармакокинетики общего эзетимиба использовали ферментативный гидролиз, что послужило причиной для включения дополнительных контролируемых параметров в валидацию и анализ.

Цель. Целью настоящего исследования являлось изучение сравнительной фармакокинетики и подтверждение биоэквивалентности двухкомпонентного действующего препарата «Эзетимиб + розувастатин» (эзетимиб + розувастатин, таблетки, 10 + 40 мг, АО «Санофи-авентис груп», Россия) относительно совместно принимаемых монокомпонентных препаратов эзетимиба и розувастатина у здоровых добровольцев после однократного приема натощак с использованием в ходе анализа проб описанных дополнительных параметров контроля ферментативного гидролиза эзетимиб-глюкуронида.

Материалы и методы. Для подтверждения биоэквивалентности было проведено открытое, сравнительное, рандомизированное, перекрестное клиническое исследование с двумя этапами. В ходе исследования у добровольцев отбирались образцы плазмы крови, в которых при помощи валидированных ВЭЖХ-МС/МС методик определялись концентрации свободного эзетимиба (неконьюгированного), общего эзетимиба (эзетимиб + эзетимиб-глюкуронид) и розувастатина. На основании полученных данных был проведен фармакокинетический и статистический анализ, и рассчитаны доверительные интервалы (ДИ) для фармакокинетических параметров C_{max} и AUC_{0-72}.

Результаты и обсуждение. На основании полученных результатов сделано заключение, что фармакокинетические параметры сравниваемых препаратов характеризуются высоким сходством в отношении как эзетимиба (свободного), так и розувастатина. Данные о фармакокинетических параметрах общего эзетимиба являлись второстепенными и не требовались для заключения о биоэквивалентности препаратов. В ходе ВЭЖХ-МС/МС анализа клинических образцов дополнительные параметры контроля ферментативного гидролиза эзетимиб-глюкуронида позволяли обоснованно отвергать результаты недостоверных аналитических серий.

Заключение. Таким образом, согласно применяемым критериям, препараты признаны биоэквивалентными. Описанные дополнительные параметры контроля ферментативного гидролиза эзетимиб-глюкуронида продемонстрировали свою эффективность.

Ключевые слова: эзетимиб, розувастатин, фармакокинетика, биоэквивалентность

Конфликт интересов. Исследование спонсировалось АО «Санофи-авентис груп», О. В. Лебедева являлась сотрудником данной компании. Авторы Д. Ю. Гребенкин, Е. К. Фаева, В. И. Казей представляли компанию ООО «Экзактэ Лабс». А. А. Хохлов, А. Е. Мирошников представляли компанию ООО «КлинФармИнвест». Указанные организации выполняли данное контрактное исследование для АО «Санофи-авентис груп».

Вклад авторов. О. В. Лебедева координировала все этапы исследования биоэквивалентности. А. Л. Хохлов, А. А. Хохлов, А. Е. Мирошников руководили клиническим этапом исследования. Д. Ю. Гребенкин, Е. К. Фаева, В. И. Казей отвечали за аналитическую часть исследования, статистическую обработку и оформление рукописи.

Для цитирования: Хохлов А. Л., Гребенкин Д. Ю., Фаева Е. К., Казей В. И., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В. Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата «Эзетимиб + розувастатин» (АО «Санофи-авентис груп», Россия): результаты и опыт применения ферментативного гидролиза при анализе образцов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):142–153. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-142-153

© Хохлов А. Л., Гребенкин Д. Ю., Фаева Е. К., Казей В. И., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В., 2023
© Khokhlov A. L., Grebenkin D. Yu., Faeva E. K., Kazey V. I., Khokhlov A. A., Miroshnikov A. E., Lebedeva O. V., 2023

Pharmacokinetic and Bioequivalence Study of the Two-component Drug Product "Ezetimibe + rosuvastatin" (JSC "Sanofi-aventis group", Russia): Resuts and Experience with the Use of Enzymatic Hydrolysis in the Analysis of Samples

Alexander L. Khokhlov[1], Dmitrii Yu. Grebenkin[2]✉, Ekaterina K. Faeva[2], Vasily I. Kazey[2], Alexander A. Khokhlov[5], Alexey E. Miroshnikov[3], Olga V. Lebedeva[4]

[1] Yaroslavl State Medical University, 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia
[2] LLC "Exacte Labs, Russia", 20/2, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
[3] LLC "ClinPharmInvest", 68, Uglichskaya str., Yaroslavl, 150031, Russia
[4] Representative office of Sanofi-aventis group JSC (France), 22, Tverskaya str., Moscow, 125009, Russia
[5] LLC "AX CT", 1, Truda sq., Yaroslavl, 150040, Russia

✉ **Corresponding author:** Dmitrii Yu. Grebenkin. **E-mail:** dmitrii.grebenkin@exactelabs.com

ORCID: Alexander L. Khokhlov – https://orcid.org/0000-0002-0032-0341; Dmitrii Yu. Grebenkin – https://orcid.org/0000-0001-9304-8000; Ekaterina K. Faeva – https://orcid.org/0000-0002-8639-4316; Vasily I. Kazey – https://orcid.org/0000-0003-2032-6289; Alexander A. Khokhlov – https://orcid.org/0000-0002-6684-4199; Alexey E. Miroshnikov – https://orcid.org/0000-0001-6657-3950; Olga V. Lebedeva – https://orcid.org/0000-0002-7983-685X.

Received: 22.02.2022 **Revised:** 07.02.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. As a part of the registration of the drug product a bioequivalence study of the fixed-dose combination "Ezetimibe + rosuvastatin" (JSC "Sanofi-aventis group", Russia) compared with coadministered Ezetrol® (ezetimibe) and Crestor® (rosuvastatin) was conducted with 76 healthy volunteers. Enzymatic hydrolysis was used to evaluate the pharmacokinetics of total ezetimibe. This was the reason for the inclusion of the additional monitored parameters in the validation and analysis.

Aim. The purpose of the bioequivalence trial was a comparative study of the pharmacokinetics and evidence of the bioequivalence of the fixed-dose combination "Ezetimibe + rosuvastatin" (ezetimibe + rosuvastatin,tablets, 10 + 40 mg, JSC "Sanofi-aventis group", Russia) compared with coadministrated monocomponent drugs ezetimibe and rosuvastatin in fasting healthy volunteers after a single administration using the described additional parameters for controlling the enzymatic hydrolysis of ezetimibe-glucuronide during the analysis of samples.

Materials and methods. To prove bioequivalence, an open label, comparative, randomized, crossover two-period clinical trial was conducted. During the study, blood plasma samples were taken from volunteers, the concentrations of ezetimibe (unconjugated) and total ezetimibe (ezetimibe + ezetimibe-glucuronide) and rosuvastatin in plasma samples were determined by validated HPLC-MS/MS methods. Based on the received data pharmacokinetic and statistical analysis was performed and confidence intervals (CI) for the pharmacokinetic parameters C_{max} and AUC_{0-72} were calculated.

Results and discussion. It can be concluded that the studied formulations are bioequivalent in terms of pharmacokinetic parameters of ezetimibe (free) and rosuvastatin. Pharmacokinetic parameters of total ezetimibe were considered as secondary and were not required for the conclusion on bioequivalence. While HPLC-MS/MS analysis of incurred samples, additional control parameters for the enzymatic hydrolysis of ezetimibe-glucuronide made it possible to legitimately reject the results of inaccurate analytical batches.

Conclusion. Thus, according to the criteria used in the study, the drugs are proved to be bioequivalent. The described additional parameters for controlling the enzymatic hydrolysis of ezetimibe-glucuronide have been shown to be effective.

Keywords: ezetimibe, rosuvastatin, pharmacokinetics, bioequivalence

Conflict of interest. The study was sponsored by Sanofi and author Olga V. Lebedeva is employee of Sanofi. Authors Dmitrii Yu. Grebenkin, Ekaterina K. Faeva, Vasily I. Kazey represent LLC "ExacteLabs". Alexander A. Khokhlov, Alexey E. Miroshnikov represent LLC "ClinPharmInvest" which were contracted by Sanofi for the conduction of the current study.

Contribution of the authors. Olga V. Lebedeva coordinated all stages of the bioequivalence study. Alexander L. Khokhlov, Alexander A. Khokhlov, Alexey E. Miroshnikov were responsible for the clinical phase of the study. Dmitrii Yu. Grebenkin, Ekaterina K. Faeva, Vasily I. Kazey carried out the analytical part of the study, carried out the statistical part of the study, wrote the text of the manuscript.

For citation: Khokhlov A. L., Grebenkin D. Yu., Faeva E. K., Kazey V. I., Khokhlov A. A., Miroshnikov A. E., Lebedeva O. V. Pharmacokinetic and Bioequivalence Study of the two-component drug product "Ezetimibe + rosuvastatin" (JSC "Sanofi-aventis group", Russia): resuts and experience with the use of enzymatic hydrolysis in the analysis of samples. *Drug development & registration*. 2023;12(1):142–153. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-142-153

ВВЕДЕНИЕ

Терапия по снижению уровня ЛПНП и общего холестерина является неотъемлемой частью эффективной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [1–3]. Одними из популярных представителей гиполипидемических препаратов являются розувастатин и эзетимиб.

Розувастатин относится к классу статинов – ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы, фермента, участвующего в синтезе эндогенного холестерина. Препараты этой группы существенно снижают риск заболеваемости и смертности от ССЗ [2–4], а розувастатин среди них характеризуется лучшей переносимостью по данным мета-анализа 2019 года [4].

Эзетимиб является препаратом из группы ингибиторов кишечной абсорбции холестерина, который эффективно снижает уровень холестерина в крови и хорошо переносится пациентами [5]. В отличие от статинов эзетимиб не повышает риск возникновения сахарного диабета, и потому более предпочтителен с точки зрения контроля гипергликемии [6].

Как было показано в клинических исследованиях, эффективность комбинации розувастатина и эзетимиба при снижении липопротеинов низкой плотности выше, чем терапевтическая эффективность монотерапии розувастатином (в том числе, с удвоением дозировки) или комбинации симвастатина и эзетимиба [7]. Важным же преимуществом фиксированных комбинаций как таковых перед совместно применяемыми монопрепаратами является простота приема (одна таблетка вместо двух), особенно в случаях, когда пациент вынужден самостоятельно принимать большое количество различных препаратов, а также сравнительно более низкая стоимость, чем стоимость двух отдельно произведенных препаратов, что в целом увеличивает приверженность терапии пациента [8, 9].

Эквивалентность воспроизведенного препарата оригинальному обычно доказывают в рамках исследования биоэквивалентности, в которых демонстрируется, что оба лекарственных средства имеют одинаковую скорость и степень абсорбции. Такие исследования призваны подтвердить, что воспроизведенные лекарственные средства терапевтически эквивалентны референтным лекарственным средствам, то есть обладают той же эффективностью и безопасностью, что и референтый препарат [10].

В представленном исследовании для подтверждения биоэквивалентности изучалась фармакокинетика для комбинированного препарата эзетимиба и розувастатина по сравнению с двумя совместно принимаемыми препаратами эзетимиба и розувастатина. Изучение биоэквивалентности комбинированного препарата относительно совместно принимаемых монокомпонентных – это распространенный подход в мировой практике [8, 9].

Другой особенностью данного исследования является решение Заявителя о представлении данных о фармакокинетических параметрах не только свободного неконьюгированного эзетимиба, но и общего эзетимиба (суммы свободного эзетимиба и эзетимиб-глюкуронида). Такой подход для эзетимиба предписывается FDA[1]. В то же время Руководство по экспертизе лекарственных средств [11], Правила ЕАЭС[2], а также Руководство EMA[3] не требуют использовать фармакокинетические параметры метаболитов для оценки биоэквивалентности, а предписывают учитывать только исходное вещество. Таким образом, фармакокинетические параметры общего эзетимиба были изучены, но представлены как второстепенные данные и не учитывались в заключении о биоэквивалентности препаратов. Заключение о биоэквивалентности по эзетимибу было сделано на основании фармакокинетических профилей свободного эзетимиба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этические принципы

Данное исследование проводилось в соответствии с протоколом, разработанным согласно принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, стандартами по Надлежащей клинической практике (ICH GCP), а также в соответствии с другими законодательствами. Участие в исследовании являлось добровольным. Доброволец подписывал информированное согласие и имел право отказаться от участия в проводимом исследовании на любой его стадии. Этическую экспертизу клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов проводил Совет по этике при Министерстве здравоохранения и Локальный этический комитет (ЛЭК). Разрешение на проведение клинического исследования было выдано Министерством здравоохранения РФ № 589 от 19 августа 2016 года. Версия протокола 3.0 была одобрена Министерством здравоохранения 10 октября 2017 г. Разрешение продления срока проведения клинического исследования до 01.02.2020 № 4054633-20-1/ДР от 26.10.2017 г. Решение об этическом одобрении проведения данного клинического исследования было принято на заседании Совета по этике при Министерстве здравоохранения № 122 от 05 апреля 2016 года. Версия протокола 3.0 была одобрена на заседании Совета по этике № 155, 19 сентября 2017 г. Кроме того, до начала исследования было получено разрешение на проведение исследования от Локального этического комитета Исследовательского центра – Этического комитета государственного автономного учреждения здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 2» (протокол заседания № 4 от 13 февраля 2018 г и № 5 от 20 февраля 2018 г.). Все одобренные документы были получены до выполнения добровольцами каких-либо процедур исследования, включая тесты скрининга для оценки пригодности.

[1] Draft Guidance on Ezetimibe (FDA). Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Ezetimibe_tab_21445_RC10-08.pdf. Accessed: 09.01.2022.

[2] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. 2016. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107. Ссылка активна на: 23.12.2021.

[3] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf. Accessed: 23.12.2021.

Дизайн исследования

Данное исследование биоэквивалентности являлось открытым, сравнительным, рандомизированным, перекрестным клиническим исследованием с двумя периодами по оценке биоэквивалентности двухкомпонентного препарата «Эзетимиб + розувастатин» (эзетимиб + розувастатин таблетки, 10 + 40 мг, АО «Санофи-авентис груп», Россия) относительно совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Эзетрол® (эзетимиб, таблетки, 10 мг, Шеринг-Плау Лабо Н. В., Бельгия) и Крестор® (розувастатин, таблетки 40 мг, Астра Зенека ЮК Лимитед, Великобритания) при однократном пероральном приеме внутрь здоровыми добровольцами одной дозы каждого из них. Популяция для оценки фармакокинетики состояла из 75 человек. Все добровольцы были разделены на 2 группы согласно схеме рандомизации: TR и RT. Количество добровольцев было одинаковым также для каждой подгруппы (1–38 и 39–76). Период «отмывания» составил 14 суток.

Исследуемые препараты

В качестве препаратов сравнения (референтных – R) использовались:

- Эзетрол® (эзетимиб, таблетки 10 мг, Шеринг-Плау Лабо Н. В., Бельгия, серия 363136).
- Рестор® (розувастатин, таблетки 40 мг, Астра Зенека ЮК Лимитед, Великобритания, серия MJ461).

Данные препараты принимались одновременно.

В качестве исследуемого препарата (тест – T) использовался:

- «Эзетимиб + розувастатин» (эзетимиб + розувастатин таблетки, 10 + 40 мг, АО «Санофи-авентис груп», Россия, серия P02112016).

Введение препарата и отбор образцов

Исследуемый препарат применялся внутрь, в дозе 10 + 40 мг (1 таблетка), препараты сравнения принимались в аналогичной дозировке, каждый препарат в составе отдельной таблетки. Доброволец запивал таблетки 200 мл воды.

Образцы крови отбирались с помощью катетера, установленного в вену предплечья в течение 16 часов после приема препарата. Отбор образцов крови осуществлялся в вакуумные пробирки (вакутейнеры) объемом 6 мл, содержащие K2ЭДТА в качестве антикоагулянта, пробирки перемешивались, центрифугировались при охлаждении. Все образцы плазмы крови помещали в морозильную камеру с контролируемой температурой ≤ –70 °C.

Заборы крови осуществлялись исходно до приема препарата (0) и через 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 16,0, 24,0, 36,0, 48,0, 72,0 часов после приема препарата.

Анализ концентрации эзетимиба (как свободного, так и общего) был выполнен в 21 образцах плазмы крови, взятых у всех добровольцев в течение двух периодов исследования в следующих временных точках: 0 (до приема препарата), через 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 16,0, 24,0, 48,0 и 72,0 ч.

Анализ концентрации розувастатина был произведен в 19 образцах плазмы крови, взятых во временные точки: 0 (до приема препарата), через 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 8,0, 12,0, 16,0, 24,0, 36,0, 48,0 и 72,0 ч в течение двух периодов исследования.

Описание анализа концентрации действующих веществ в образцах

Для определения концентраций свободного эзетимиба и розувастатина в образцах, полученных в клинической части исследования, была использована ВЭЖХ-МС/МС методика, валидированная в соответствии с руководствами[1, 2]. В качестве внутреннего стандарта использовались изотопномеченный (дейтерированный) эзетимиб и изотопномеченный (дейтерированный) розувастатин. Аналитическая серия включала 1 холостой образец, 1 холостой образец с добавлением внутреннего стандарта, 9 калибровочных образцов, 6 образцов контроля качества, образцы от одного добровольца из двух периодов. Аналитическая методика предполагала использование 100 мкл образца для каждого анализа. Аналитический диапазон методики составил 0,04–10,0 нг/мл эзетимиба и 0,20–150 нг/мл розувастатина в плазме, для расчета концентраций использовалась взвешенная линейная регрессия. Подготовка проб осуществлялась методом депротеинизации (осаждения белков). Полученные пробы были проанализированы на ВЭЖХ-МС/МС-системе ACQUITY I-Class (Waters Corporation, США) с масс-спектрометром с тройным квадруполем и ионизацией электроспреем QTrap 5500 (AB Sciex Pte. Ltd., США).

Для определения концентраций общего эзетимиба в образцах, полученных в клинической части исследования, также была использована отдельная ВЭЖХ-МС/МС методика, валидированная в соответствии с руководствами[3, 4]. В качестве внутреннего стандарта использовался изотопномеченный (дейтерированный) эзетимиб. Аналитическая серия включала

[1] Draft Guidance on Ezetimibe (FDA). Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Ezetimibe_tab_21445_RC10-08.pdf. Accessed: 09.01.2022.

[2] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. 2016. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107. Ссылка активна на: 23.12.2021.

[3] Draft Guidance on Ezetimibe (FDA). Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Ezetimibe_tab_21445_RC10-08.pdf. Accessed: 09.01.2022.

[4] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. 2016. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107. Ссылка активна на: 23.12.2021.

1 холостой образец, 1 холостой образец с добавлением внутреннего стандарта, 9 калибровочных образцов свободного эзетимиба, 6 образцов контроля качества свободного эзетимиба и 6 образцов контроля качества эзетимиб-глюкуронида, образцы от одного добровольца из двух периодов. Аналитическая методика предполагала использование 100 мкл образца для каждого анализа. Аналитический диапазон методики составил 1,00–200 нг/мл общего эзетимиба в плазме, для расчета концентраций использовалась взвешенная линейная регрессия. Метод основывался на проведении ферментативного гидролиза эзетимиб-глюкуронида в плазме крови человека с помощью β-глюкуронидазы с целью перевода в свободный эзетимиб и последующим извлечением общего эзетимиба (свободный эзетимиб + эзетимиб после ферментативного гидролиза эзетимиб-глюкуронида) раствором этилацетата и метилтретбутилового эфира (1 : 1), упариванием в токе азота и растворением. Полученные пробы были проанализированы на ВЭЖХ-МС/МС-системе ACQUITY I-Class (Waters Corporation, США) с масс-спектрометром с тройным квадруполем и ионизацией электроспреем Triple Quad™ 4500 (AB Sciex Pte. Ltd., США).

Всего в ходе анализа всех трех аналитов в плазме крови было проанализировано 3167 образцов.

Особенности анализа концентраций общего эзетимиба

Для измерения концентрации полного эзетимиба в пробе применялся ферментативный гидролиз, в результате которого эзетимиб-глюкуронид полностью преобразовывался в эзетимиб, после чего суммарная концентрация полученного таким образом эзетимиба и изначального свободного эзетимиба в пробе оценивалась при помощи ВЭЖХ-МС/МС методики. Так как измерение концентрации только свободного эзетимиба в пробе, в которой произошел гидролиз, невозможно, была разработана отдельная ВЭЖХ-МС/МС методика с пробоподготовкой без гидролиза для анализа свободного эзетимиба. Кроме того, данная методика была более чувствительной по причине значительно более низкой ожидаемой концентрации свободного эзетимиба по сравнению с общим в плазме крови (НПКО методики на свободный эзетимиб составил 0,04 нг/мл, методики на общий эзетимиб – 1 нг/мл).

Альтернативаный подход к оценке концентрации общего эзетимиба в плазме крови – в виде анализа непосредственно эзетимиб-глюкуронида при помощи ВЭЖХ-МС/МС – был отвергнут на ранних стадиях разработки методик. Эзетимиб-глюкуронид по причине своей гидрофильности обладал неоптимальными хроматографическими характеристиками на доступных колонках для обращенно-фазовой хроматографии: пик глюкуронида был близок к мертвому времени. В то же время сам эзетимиб, напротив, характеризуется хорошим удерживанием на таких хроматографических колонках, что делает его совместный с глюкуронидом анализ затруднительным. Кроме того, предположительно, по причине недостаточной стабильности самой молекулы эзетимиб-глюкуронида в ВЭЖХ-МС/МС системе, его аналитический отклик значительно интерферировал с аналитическим откликом свободного эзетимиба как по времени удерживания на хроматограмме, так и по MRM-переходам. Описанные причины не только делали невозможным анализ эзетимиба и эзетимиб-глюкуронида при помощи единой ВЭЖХ-МС/МС методики, но и послужили причиной для отказа от исследования собственно эзетимиб-глюкуронида как отдельного аналита. Таким образом, концентрацию общего и свободного эзетимиба (совместно с розувастатином) в пробах изучали при помощи отдельных ВЭЖХ-МС/МС методик с ферментативным гидролизом и без него соответственно.

Включение в процесс подготовки проб ферментативного гидролиза является источником дополнительных рисков, связанных с поведением фермента, для которых обыкновенные меры контроля качества аналитических серий (образцы контроля качества конечного аналита на низком, среднем и высоком уровнях концентраций) и валидационных серий недостаточны: неполнота и/или нелинейность протекания гидролиза в результате нестабильности фермента или неточностей выполнения методики подготовки проб. Биоаналитической лабораторией было принято решение, что для отслеживания такого рода отклонений необходимо использование дополнительных образцов контроля качества, приготовленных из эзетимиб-глюкуронида.

Методология валидации и применения ВЭЖХ-МС/МС методик, включающих ферментативный гидролиз, не описана в руководствах[1, 2]: неизвестны принципы выбора концентраций субстрата в образцах контроля качества, отсутствует перечень экспериментов, в которых такие образцы должны быть изучены. Подобные детали также отсутствуют в научных публикациях. Таким образом, описанные ниже подходы предложены биоаналитической лабораторией, выполнявшей данное исследование. Ниже приводится список валидационных параметров и описывается, какие дополнительные контрольные образцы были дополнительно включены для их изучения:

- ✓ *Правильность и прецизионность*. Все валидационные серии включали дополнительные образцы с эзетимиб-глюкуронидом на уровнях НПКО, низком (НКК), среднем (СКК) и высоком (ВКК) в пересчете на эзетимиб; гидролиз всех образцов оценивался количественно. Дополнительно подтверждали полноту гидролиза эзетимиб-глюкуронида на уровне ВПКО.

[1] Draft Guidance on Ezetimibe (FDA). Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Ezetimibe_tab_21445_RC10-08.pdf. Accessed: 09.01.2022.

[2] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. 2016. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107. Ссылка активна на: 23.12.2021.

- ✓ *Селективность*. Образцы с эзетимиб-глюкуронидом на уровне НПКО в пересчете на эзетимиб. Данный подход позволяет изучить полноту протекания ферментативного гидролиза в индивидуальных источниках плазмы крови, а также липемической и гемолизированной плазмы на уровне НПКО.
- ✓ *Степень извлечения и эффект матрицы*. Дополнительные образцы НКК и ВКК с эзетимиб-глюкуронидом в пересчете на эзетимиб.
- ✓ *Стабильность*. Во всех валидационных экспериментах по изучению стабильности (краткосрочная стабильность в плазме крови на рабочем столе, стабильность в плазме крови при трех циклах заморозки-разморозки, долгосрочная стабильность в плазме крови при температуре < –65 °C, стабильность в рабочих растворах, пост-препаративная стабильность) готовили дополнительные образцы с эзетимиб-глюкуронидом на уровнях НКК и ВКК в пересчете на эзетимиб, в которых после завершения соответствующих испытаний анализировали стабильность эзетимиб-глюкуронида.

Кроме того, для оценки полноты ферментативного гидролиза в ходе ВЭЖХ-МС/МС анализа общего эзетимиба в клинических образцах каждую аналитическую серию дополняли полным набором образцов контроля качества эзетимиб-глюкуронида на уровнях НКК, СКК и ВКК в пересчете на эзетимиб. Такое решение продиктовано тем, что при анализе реальных проб общего эзетимиба невозможно отличить неполный гидролиз от полного без специальных контрольных образцов для количественной оценки гидролиза, так как конечным аналитом ВЭЖХ-МС/МС методики в любом случае является молекула эзетимиба.

Кроме того, введение контрольных образцов эзетимиб-глюкуронида на всех уровнях КК, а не только одном, по замыслу исследователей должно позволять отслеживать посторонние эффекты, связанные с различной скоростью протекания ферментативной реакции в присутствии различных концентраций субстрата (описывается уравнением Михаэлиса – Ментен). Таким образом, описанный подход позволил контролировать полноту протекания гидролиза на НКК, СКК и ВКК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Участники исследования и безопасность

По результатам исследования спектр НЯ у исследуемых препаратов по количественным и качественным признакам был схож. Не наблюдалось клинически значимого влияния препаратов Эзетимиб + Розувастатин на данные физикального обследования, на лабораторные параметры безопасности, и результаты ЭКГ.

Контроль качества ферментативного гидролиза в анализе реальных образцов плазмы крови

В ходе одной из аналитических серий, в которой изучалась концентрация в образцах общего эзетимиба, лаборантом была допущена ошибка приготовления раствора фермента β-глюкуронидазы (взят неверный буферный раствор для разведения), в результате чего активность фермента оказалась сниженной, и гидролиз эзетимиб-глюкуронида произошел не полностью. Данную ошибку оказалось возможным выявить на стадии анализа благодаря контрольным образцам, содержащим эзетимиб-глюкуронид. Пример хроматограмм с неполным ферментативным гидролизом эзетимиб-глюкуронида в контрольных образцах представлен на рисунке 1. На хроматограмме А на времени удерживания 1,26 мин виден пик эзетимиба в образце НКК эзетимиба. При успешном проведении ферментативного гидролиза хроматограмма В, принадлежащая контрольному образцу НКК эзетимиба глюкуронида, должна быть подобна хроматограмме А, однако на ней хроматографический пик на том же времени удерживания отсутствует. На хроматограмме С, принадлежащей контрольному образцу ВКК эзетимиб-глюкуронида, пик эзетимиба присутствует, однако аналит в образце определяется на уровне около 1 % (менее 100 ± 15 % от номинального значения), как и в других образцах КК с эзетимиб-глюкуронидом, что предоставляет надежные формальные основания для повторного анализа образцов из данной аналитической серии[1, 2]. На хроматограмме С также заметны косвенные признаки неполного гидролиза: пики с временами удерживания 0,98 мин и 1,08 мин, однако они не заметны на низких концентрациях (пример: хроматограмма В), близки к мертвому времени, и использовать их в качестве надежного формального основания для повторного анализа образцов невозможно. При этом образцы КК эзетимиба имеют правильный вид, и аналит в них определяется в пределах 100 ± 15 % от номинального значения.

Таким образом, было показано, что только использование дополнительного набора образцов КК эзетимиб-глюкуронида позволяет зафиксировать неполный гидролиз проб в аналитической серии.

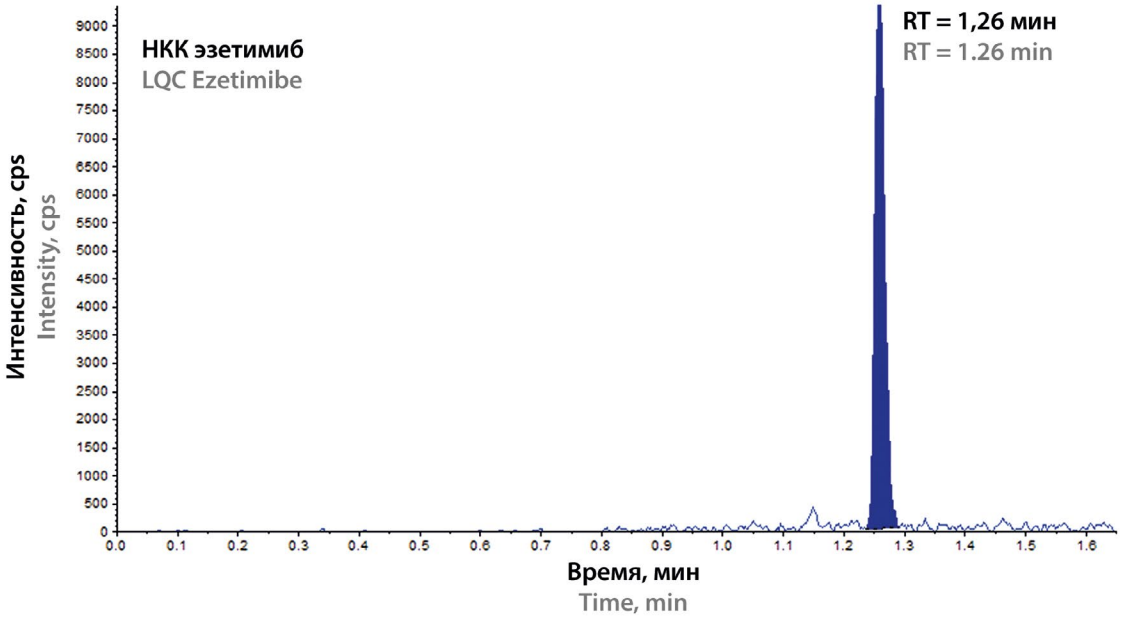
Фармакокинетические параметры и оценка биоэквивалентности

Фармакокинетические параметры

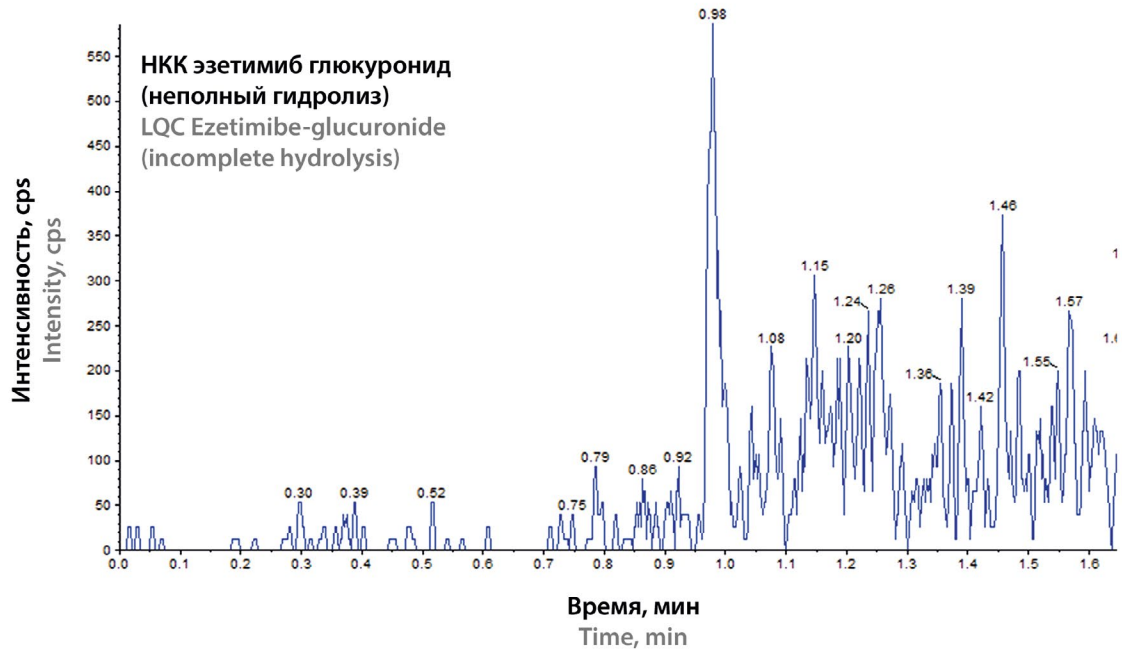
Фармакокинетические параметры свободного и общего эзетимиба приведены в таблицах 1–3, усредненные фармакокинетические кривые представлены на рисунках 2 и 3.

[1] Draft Guidance on Ezetimibe (FDA). Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Ezetimibe_tab_21445_RC10-08.pdf. Accessed: 09.01.2022.

[2] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. 2016. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107. Ссылка активна на: 23.12.2021.



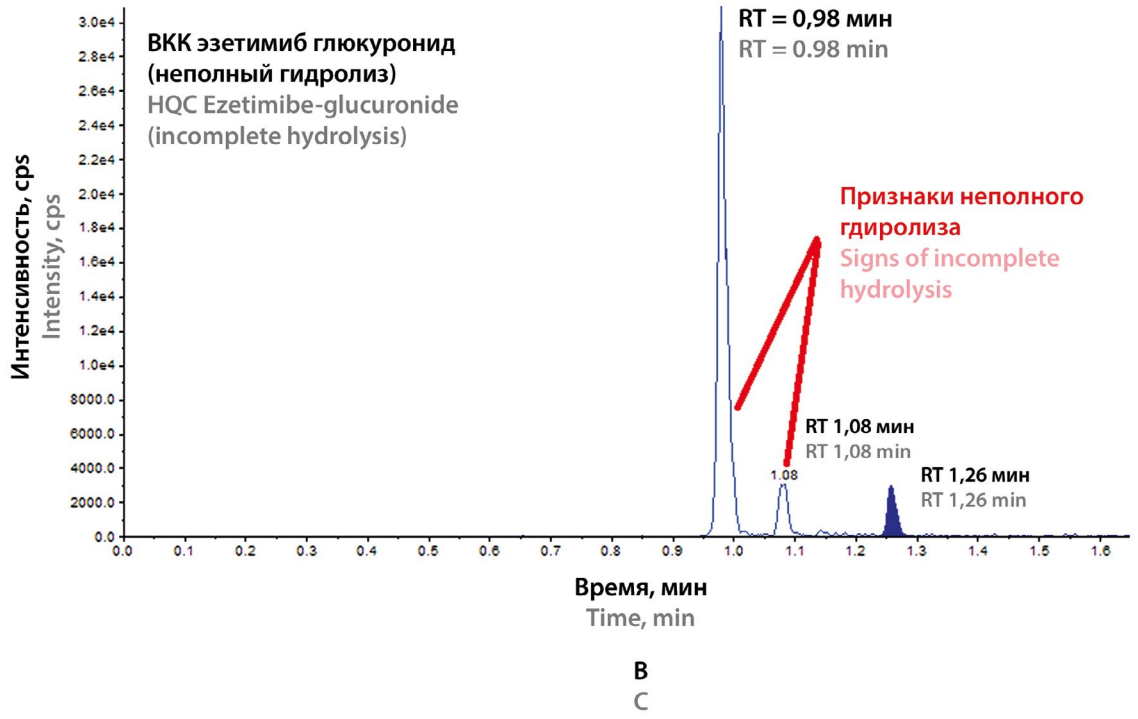
А
A



Б
B

Рисунок 1. **Пример хроматограмм с неполным ферментативным гидролизом эзетимиб-глюкуронида в контрольных образцах (описание в тексте)**

Figure 1. **An example of chromatograms with incomplete enzymatic hydrolysis of ezetimibe glucuronide in control samples (description is in the text)**



Продолжение рисунка 1
Continuation of figure 1

Таблица 1. Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров свободного эзетимиба (N – число измерений; CV – коэффициент вариации)

Table 1. Summary average pharmacokinetic parameters of free ezetimibe (N – number of observations; CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	N	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T)		Референтный препарат (R) Reference formulation (R)		Отношение T/R (%) T/R ratio (%)
		Среднее Average	CV (%)	Среднее Average	CV (%)	
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	75	3,44	53,92	3,15	51,16	109,3
AUC_{0-72}, нг · ч/мл AUC_{0-72}, ng · h/ml	75	86,90	46,22	84,63	44,77	102,7
λ_z, $ч^{-1}$ λ_z, h^{-1}	75	0,02	70,46	0,02	59,51	101,2
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	75	62,99	103,1	64,43	133,8	97,76

Таблица 2. Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров общего эзетимиба (N – число измерений; CV – коэффициент вариации)

Table 2. Summary average pharmacokinetic parameters of total ezetimibe (N – number of observations; CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	N	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T)		Референтный препарат (R) Reference formulation (R)		Отношение T/R (%) T/R ratio (%)
		Среднее Average	CV, (%)	Среднее Average	CV (%)	
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	75	72,3	42,63	67,9	43,41	106,5
AUC_{0-72}, нг·ч/мл AUC_{0-72}, ng·h/ml	75	755,16	36,32	719,40	39,12	105,0

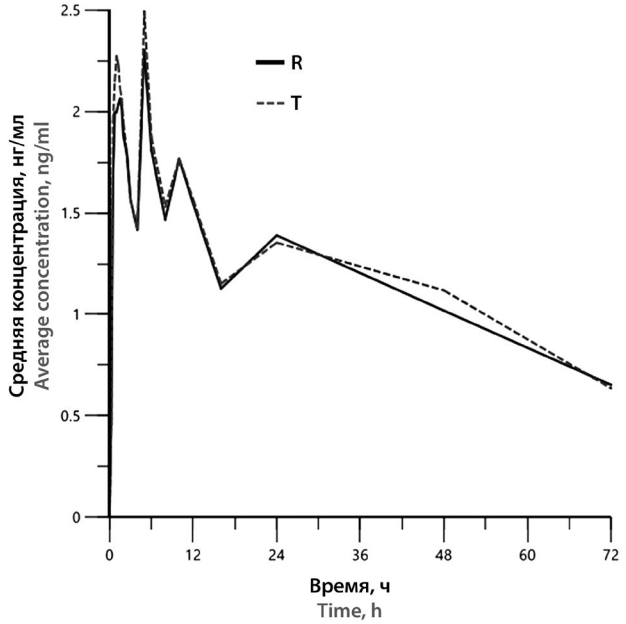


Рисунок 2. Усредненные (среднее по препарату) фармакокинетические профили свободного эзетимиба в плазме крови добровольцев после однократного приема комбинированного исследуемого препарата «Эзетимиб + розувастатин» (эзетимиб + розувастатин, таблетки, 10 + 40 мг, АО «Санофи-авентис груп», Россия) в сравнении с приемом монокомпонентного референтного препарата Эзетрол® (эзетимиб, таблетки, 10 мг, Шеринг-Плау Лабо Н. В., Бельгия).

Т – исследуемый (тестируемый) препарат; R – препарат сравнения (референтный)

Figure 2. Mean pharmacokinetic profiles of free ezetimibe in the blood plasma of volunteers after a single dose of the the test drug fixed-dose combination "Ezetimibe + rosuvastatin" (ezetimibe + rosuvastatin, tablets, 10 + 40 mg, JSC "Sanofi-aventis group", Russia) and comparison drug Ezetrol® (ezetimibe, tablets, 10 mg, Schering-Plough Labo, N. V., Belgium).

T – test drug; R – comparison drug

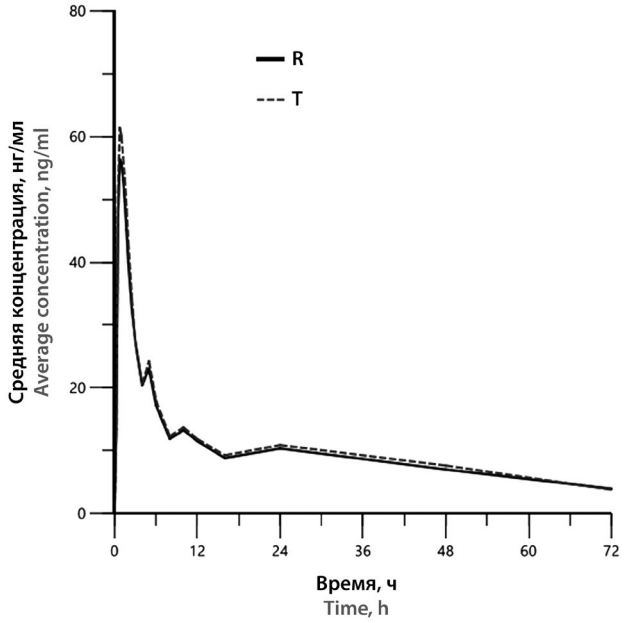


Рисунок 3. Усредненные (среднее по препарату) фармакокинетические профили общего эзетимиба в плазме крови добровольцев после однократного приема комбинированного исследуемого препарата «Эзетимиб + розувастатин» (эзетимиб + розувастатин, таблетки, 10 + 40 мг, АО «Санофи-авентис груп», Россия) в сравнении с приемом монокомпонентного референтного препарата Эзетрол® (эзетимиб, таблетки, 10 мг, Шеринг-Плау Лабо Н. В., Бельгия).

Т – исследуемый (тестируемый) препарат; R – препарат сравнения (референтный)

Figure 3. Mean pharmacokinetic profiles of total ezetimibe in the blood plasma of volunteers after a single dose of the test drug fixed-dose combination "Ezetimibe + rosuvastatin" (ezetimibe + rosuvastatin, tablets, 10 + 40 mg, JSC "Sanofi-aventis group", Russia) and comparison drug Ezetrol® (ezetimibe, tablets, 10 mg, Schering-Plough Labo, N. V., Belgium).

T – test drug; R – comparison drug

Таблица 3. Сводные данные значений параметра T_{max} свободного и общего эзетимиба (N – число измерений)

Table 3. Summary T_{max} of free and total ezetimibe (N – number of observations)

Вещество Compound	**T/R**	**N**	**Медиана, ч** Mediana, h	**Максимум, ч** Maximum, h	**Минимум, ч** Minimum, h
Свободный эзетимиб Free ezetimibe	T	75	5,00	48,00	0,50
	R	75	5,00	24,00	0,50
Общий эзетимиб Total ezetimibe	T	75	0,75	5,00	0,50
	R	75	1,00	8,00	0,50

Фармакокинетические параметры для розувастатина приведены в таблицах 4, 5, усредненные фармакокинетические кривые представлены на рисунке 4.

Оценка биоэквивалентности

Биоэквивалентность исследуемого и референтного препаратов оценивали на основании 90%-го ДИ ln-преобразованных значений AUC_{0-72} и C_{max} свободного эзетимиба и розувастатина как основных параметров. Согласно протоколу, препараты считались биоэквивалентными, если границы оцененного ДИ для AUC_{0-72} и C_{max} находились в пределах 80,00–125,00 %. Результаты оценки биоэквивалентности представлены в таблице 6, результаты ANOVA представлены в таблице 7.

В соответствии с указаниями руководств[1, 2, 3] фармакокинетические параметры эзетимиб-глюкуронида не использовались непосредственно для заключения о биоэквивалентности лекарственных препа-

[1] Draft Guidance on Ezetimibe (FDA). Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Ezetimibe_tab_21445_RC10-08.pdf. Accessed: 09.01.2022.

[2] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. 2016. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107. Ссылка активна на: 23.12.2021.

[3] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf. Accessed: 23.12.2021.

Таблица 4. Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров розувастатина (N – число измерений; CV – коэффициент вариации)

Table 4. Summary average pharmacokinetic parameters of rosuvastatin (N – number of observations; CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	N	Исследуемый препарат (T) Test formulation (T)		Референтный препарат (R) Reference formulation (R)		Отношение T/R, (%) T/R ratio, (%)
		Среднее Average	CV, (%)	Среднее Average	CV, (%)	
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	75	30,02	49,28	32,05	55,48	93,67
AUC_{0-72}, нг · ч/мл AUC_{0-72}, ng · h/ml	75	236,2	43,03	240,2	43,51	98,35
λ_z, $ч^{-1}$ λ_z, h^{-1}	75	0,04	42,88	0,04	47,74	96,48
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	75	22,76	85,63	20,73	66,05	109,8

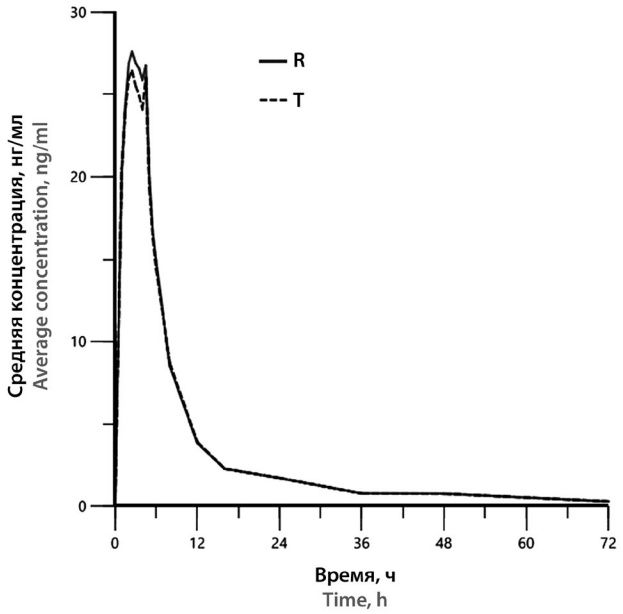


Рисунок 4. Усредненные (среднее по препарату) фармакокинетические профили розувастатина в плазме крови добровольцев после однократного приема комбинированного исследуемого препарата «Эзетимиб + розувастатин» (эзетимиб + розувастатин, таблетки, 10 + 40 мг, АО «Санофи-авентис груп», Россия) в сравнении с приемом монокомпонентного референтного препарата Крестор® (розувастатин, таблетки 40 мг, Астра Зенека ЮК Лимитед, Великобритания).

T – исследуемый (тестируемый) препарат; R – препарат сравнения (референтный)

Figure 4. Mean pharmacokinetic profiles of rosuvastatin in the blood plasma of volunteers after a single dose of the test drug fixed-dose combination "Ezetimibe + rosuvastatin" (ezetimibe + rosuvastatin, tablets, 10 + 40 mg, JSC "Sanofi-aventis group", Russia) and comparison drug Crestor® (rosuvastatin, tablets, 40 mg, AstraZeneca UK, Limited, United Kingdom).

T – test drug; R – comparison drug

ратов, а были представлены как вспомогательные данные.

Результаты описанного исследования биоэквивалентности послужили основанием для регистрации препарата Зенон® (эзетимиб + розувастатин, таблетки, 10 + 40 мг, АО «Санофи-авентис груп», Россия) под номером ЛП-005850.

Таблица 5. Сводные данные значений параметра T_{max} розувастатина (N – число измерений)

Table 5. Summary T_{max} of rosuvastatin (N – number of observations)

Вещество Compound	T/R	N	Медиана, ч Mediana, h	Максимум, ч Maximum, h	Минимум, ч Minimum, h
Розувастатин Rosuvastatin	T	75	3,50	4,50	1,00
	R	75	3,50	4,53	1,00

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках регистрации комбинированного препарата «Эзетимиб + розувастатин» (АО «Санофи-авентис груп», Россия) (зарегистрирован под торговым наименованием Зенон®) было проведено исследование его биоэквивалентности относительно совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Эзетрол® и Крестор® при однократном приеме здоровыми добровольцами натощак. На основании полученных данных можно констатировать, что исследуемые препараты характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики.

Было показано, что использование дополнительных наборов образцов КК субстрата ферментативного гидролиза необходимо как на стадии валидации, так и на стадии анализа клинических образцов, так как позволяет изучить и зафиксировать неполный гидролиз проб в аналитической серии.

В ходе валидации ВЭЖХ-МС/МС методики образцы КК с эзетимиб-глюкуронидом использовали для изучения параметров: правильность и прецизионность; селективность; степень извлечения и эффект матрицы; стабильность.

Было показано, что только использование дополнительного набора образцов КК эзетимиб-глюкуронида позволяет зафиксировать неполный гидролиз проб в аналитической серии и обосновать реанализ образцов в этом случае.

Таблица 6. ДИ для отношений фармакокинетических параметров Cmax и $AUC_{(0-72)}$ (N – число измерений; C Vintra – коэффициент внутрииндивидуальной вариации; CVinter – коэффициент межиндивидуальной вариации; T – исследуемый препарат; R – препарат сравнения; N – число измерений)

Table 6. CI for Cmax and $AUC_{(0-72)}$ ratios (N – number of observations; CVintra – intra-subject coefficient of variation; CVinter – inter-subject coefficient of variation; T – test formulation; R – reference formulation)

Параметр Parameter	Средние геометрические Geometric mean				Отношение T/R (%) T/R ratio, (%)	90 % ДИ (%) 90 % CI (%)		CVintra (%)	CVinter (%)	БЭ BE
	N	T	N	R		Нижний Lower	Верхний Upper			
Эзетимиб *Ezetimibe*										
$AUC_{(0-72)}$, нг · ч/мл AUC_{0-72}, ng · h/ml	75	78,68	75	76,68	102,45	98,04	107,04	16,24	45,26	Да Yes
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	75	3,00	75	2,78	107,86	99,60	116,81	29,91	46,35	Да Yes
Розувастатин *Rosuvaststin*										
$AUC_{(0-72)}$, (нг · ч/мл) AUC_{0-72}, ng · h/ml	75	215,72	75	219,22	98,33	93,81	103,06	17,41	41,10	Да Yes
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	75	26,5	75	27,8	95,47	88,61	102,85	27,90	47,07	Да Yes

Таблица 7. Результаты ANOVA ФК параметров [SS (Sum of Squares) – сумма квадратов для разниц со средним значением; DF – число степеней свободы; MS – дисперсия; F – величина F-критерия]

Table 7. ANOVA results for PK parameters [SS (Sum of Squares) – sum of squares for differences with mean; DF – degrees of freedom; MS – dispersion; F – F-value]

Параметр Parameter	Источник вариации Source of variability	DF	SS	MS	F	p-величина p-value
Эзетимиб *Ezetimibe*						
$Ln(C_{max})$	Последовательность Sequence	1	0,0003329	0,0003329	0,003995	0,9498
	Последовательность группа Sequence group	1	0,3800	0,3800	4,561	0,03617
	Препарат группа Formulation group	1	0,2519	0,2519	0,5332	0,4677
	Период группа Period group	2	0,1425	0,07123	0,8548	0,4297
	Остаточная вариация Residual variability	71	5,916	0,08333	–	–
$Ln(AUC_{0-72})$	Последовательность Sequence	1	0,02391	0,02391	0,9063	0,3443
	Последовательность группа Sequence group	1	0,02841	0,02841	1,077	0,3029
	Препарат группа Formulation group	1	0,001576	0,001576	0,003948	0,9501
	Период группа Period group	2	0,2572	0,1286	4,875	0,01038
	Остаточная вариация Residual variability	71	1,873	0,02638	–	–
Розувастатин *Rosuvaststin*						
$Ln(C_{max})$	Последовательность Sequence	1	0,2937	0,2937	3,891	0,05243
	Последовательность группа Sequence group	1	1,215	1,215	16,10	0,0001471
	Препарат группа Formulation group	1	0,03731	0,03731	0,07843	0,7802
	Период группа Period group	2	0,04630	0,02315	0,3067	0,7368
	Остаточная вариация Residual variability	71	5,359	0,07547	–	–

Окончание табл. 7

Параметр Parameter	**Источник вариации** Source of variability	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**p-величина** p-value
Эзетимиб *Ezetimibe*						
$Ln(AUC_{0-72})$	Последовательность Sequence	1	0,1528	0,1528	5,062	0,02756
	Последовательность группа Sequence group	1	0,8347	0,8347	27,66	1,460E-06
	Препарат группа Formulation group	1	0,006164	0,006164	0,01800	0,8936
	Период группа Period group	2	0,07755	0,03877	1,285	0,2831
	Остаточная вариация Residual variability	71	2,143	0,03018	–	–

ЛИТЕРАТУРА

1. Sniderman A. D., Williams K., Contois J. H., Monroe H. M., McQueen M. J., de Graaf J., Furberg C. D. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2011;4(3):337–345. DOI: 10.1161/circoutcomes.110.959247.
2. Wadhera R. K., Steen D. L., Khan I., Giugliano R. P., Foody J. M. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *Journal of clinical lipidology*. 2016;10(3):472–489. DOI: 10.1016/j.jacl.2015.11.010.
3. Grundy S. M., Stone N. J., Bailey A. L., Beam C., Birtcher K. K., Blumenthal R. S., Braun L. T., de Ferranti S., Faiella-Tommasino J., Forman D. E., Goldberg R., Heidenreich P. A., Hlatky M. A., Jones D. W., Lloyd-Jones D., Lopez-Pajares N., Ndumele C. E., Orringer C. E., Peralta C. A., Saseen J. J., Smith S. C., Sperling L., Virani S.S., Yeboah J. AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;73(24):3168–3209. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.11.002.
4. Yebyo H. G., Aschmann H. E., Kaufmann M., Puhan M. A. Comparative effectiveness and safety of statins as a class and of specific statins for primary prevention of cardiovascular disease: A systematic review, meta-analysis, and network meta-analysis of randomized trials with 94,283 participants. *American heart journal*. 2019;210:18–28. DOI: 10.1016/j.ahj.2018.12.007.
5. Pandor A., Ara R. M., Tumur I., Wilkinson A. J., Paisley S., Duenas A., Chilcott J. Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of internal medicine*. 2009;265(5):568–580. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2008.02062.x.
6. Barkas F., Elisaf M., Liberopoulos E., Klouras E., Liamis G., Rizos E. C. Statin therapy with or without ezetimibe and the progression to diabetes. *Journal of Clinical Lipidology*. 2016;10(2):306–313. DOI: 10.1016/j.jacl.2015.11.015.
7. Lamb Y. N. Rosuvastatin/Ezetimibe: A Review in Hypercholesterolemia. *American journal of cardiovascular drugs*. 2020;20(4):381–392. DOI: 10.1007/s40256-020-00421-1.
8. Mitra A., Wu Y. Challenges and opportunities in achieving bioequivalence for fixed-dose combination products. *The AAPS journal*. 2012;14(3):646–655. DOI: 10.1208/s12248-012-9378-x.
9. Dubey R. Bioequivalence challenges in development of fixed-dose combination products: looking beyond reformulation. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012;9(3):325–332. DOI: 10.1517/17425247.2012.655723.
10. Ушкалова Е. А., Зырянов С. К., Ушкалова А. В. Воспроизведенные лекарственные средства и особенности их регулирования. *Неврология, Нейропсихиатрия, Психосоматика*. 2016;8(3):82–87.
11. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К; 2019. 328 с.

REFERENCES

1. Sniderman A. D., Williams K., Contois J. H., Monroe H. M., McQueen M. J., de Graaf J., Furberg C. D. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2011;4(3):337–345. DOI: 10.1161/circoutcomes.110.959247.
2. Wadhera R. K., Steen D. L., Khan I., Giugliano R. P., Foody J. M. A review of low-density lipoprotein cholesterol, treatment strategies, and its impact on cardiovascular disease morbidity and mortality. *Journal of clinical lipidology*. 2016;10(3):472–489. DOI: 10.1016/j.jacl.2015.11.010.
3. Grundy S. M., Stone N. J., Bailey A. L., Beam C., Birtcher K. K., Blumenthal R. S., Braun L. T., de Ferranti S., Faiella-Tommasino J., Forman D. E., Goldberg R., Heidenreich P. A., Hlatky M. A., Jones D. W., Lloyd-Jones D., Lopez-Pajares N., Ndumele C. E., Orringer C. E., Peralta C. A., Saseen J. J., Smith S. C., Sperling L., Virani S.S., Yeboah J. AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;73(24):3168–3209. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.11.002.
4. Yebyo H. G., Aschmann H. E., Kaufmann M., Puhan M. A. Comparative effectiveness and safety of statins as a class and of specific statins for primary prevention of cardiovascular disease: A systematic review, meta-analysis, and network meta-analysis of randomized trials with 94,283 participants. *American heart journal*. 2019;210:18–28. DOI: 10.1016/j.ahj.2018.12.007.
5. Pandor A., Ara R. M., Tumur I., Wilkinson A. J., Paisley S., Duenas A., Chilcott J. Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of internal medicine*. 2009;265(5):568–580. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2008.02062.x.
6. Barkas F., Elisaf M., Liberopoulos E., Klouras E., Liamis G., Rizos E. C. Statin therapy with or without ezetimibe and the progression to diabetes. *Journal of Clinical Lipidology*. 2016;10(2):306–313. DOI: 10.1016/j.jacl.2015.11.015.
7. Lamb Y. N. Rosuvastatin/Ezetimibe: A Review in Hypercholesterolemia. *American journal of cardiovascular drugs*. 2020;20(4):381–392. DOI: 10.1007/s40256-020-00421-1.
8. Mitra A., Wu Y. Challenges and opportunities in achieving bioequivalence for fixed-dose combination products. *The AAPS journal*. 2012;14(3):646–655. DOI: 10.1208/s12248-012-9378-x.
9. Dubey R. Bioequivalence challenges in development of fixed-dose combination products: looking beyond reformulation. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012;9(3):325–332. DOI: 10.1517/17425247.2012.655723.
10. Ushkalova E. A., Zyryanov S. K., Ushkalova A. V. Generics and the specific features of their regulation. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2016;8(3):82–87. (In Russ.)
11. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. I. Moscow: Grif and K; 2019. 328 p. (In Russ.)

TEG
TRINITY EVENTS GROUP

16–17 МАЯ 2023
ОТЕЛЬ «КОРИНТИЯ САНКТ-ПЕТЕРБУРГ»

ФАРМА

30 ЮБИЛЕЙНЫЙ РОССИЙСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ им. Н.А. СЕМАШКО

РОССИЙСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ — ЭТО:

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ С САМОЙ БОГАТОЙ ИСТОРИЕЙ В РОССИИ!
29 ЛЕТ НА РЫНКЕ!

ПРЯМОЙ ДИАЛОГ С РЕГУЛЯТОРАМИ О СТРАТЕГИИ РАЗВИТИЯ ОТРАСЛИ И ВОЗМОЖНЫХ МЕРАХ ПОДДЕРЖКИ СО СТОРОНЫ ГОСУДАРСТВА

ОБЗОР РЫНКА 360 ГРАДУСОВ ОТ ПЕРВЫХ ЛИЦ КОМПАНИЙ — САМОЕ АВТОРИТЕТНОЕ МЕРОПРИЯТИЕ ПО СОСТАВУ УЧАСТНИКОВ

300+ ДЕЛЕГАТОВ И 100+ ТОП-СПИКЕРОВ ПОДЕЛЯТСЯ ОПЫТОМ ОБ АКТУАЛЬНЫХ СТРАТЕГИЯХ РАЗВИТИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО БИЗНЕСА



RUSSIAN.PHARMA-CONF.RU

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-155-160
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Доклинические исследования нового иммуноглобулина для внутривенного введения против COVID-19

А. М. Николаева[1], А. В. Иванов[1], Т. И. Смолянова[2]✉, М. В. Разумихин[2], О. В. Белякова[1], Е. Г. Шилова[1], Н. Р. Селезнева[1], Т. В. Вязникова[1], А. И. Семичева[1], Е. И. Саканян[1]

[1] АО «НПО «Микроген», 127473, Россия, г. Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10
[2] АО «Нацимбио», 127473, Россия, г. Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10

✉ **Контактное лицо:** Смолянова Татьяна Ивановна. **E-mail:** tatianasmolyanova@gmail.com

ORCID: А. М. Николаева – https://orcid.org/0000-0002-3160-518X; А. В. Иванов – https://orcid.org/0000-0002-7608-1914; Т. И. Смолянова – https://orcid.org/0000-0002-2934-3002; М. В. Разумихин – https://orcid.org/0000-0002-7364-5235; О. В. Белякова – https://orcid.org/0000-0001-6352-9380; Е. Г. Шилова – https://orcid.org/0000-0002-0001-6649; Н. Р. Селезнева – https://orcid.org/0000-0003-3690-4952; Т. В. Вязникова – https://orcid.org/0000-0003-0497-9757; А. И. Семичева – https://orcid.org/0000-0003-0230-3091; Е. И. Саканян – https://orcid.org/0000-0001-8536-4804.

Статья поступила: 19.05.2022 **Статья принята в печать:** 06.02.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Применение иммуноглобулинов, содержащих нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела, может быть эффективным и безопасным средством лечения COVID-19. В Акционерном обществе «Нацимбио» был разработан препарат «КОВИД-глобулин» – иммуноглобулин для внутривенного введения из плазмы крови доноров, содержащей вируснейтрализующие антитела против SARS-CoV-2.

Цель. Целью исследования является экспериментальное изучение безопасности препарата «КОВИД-глобулин».

Материалы и методы. При исследовании безопасности препарата в опытах на животных были оценены следующие показатели: общая токсичность, тромбогенный потенциал, влияние на гематологические и биохимические показатели, свертываемость крови и гемолитическую активность, определение местного раздражающего действия, пирогенных свойств, бактериальных эндотоксинов и аллергизирующего действия препарата, а также его физико-химические свойства.

Результаты и обсуждение. Исследования безопасности «КОВИД-глобулина» в опытах на животных показали отсутствие каких-либо признаков интоксикации и местного раздражающего действия. Макроскопическое и гистологическое исследование органов крыс, получавших КОВИД-глобулин, не выявило признаков некроза, воспаления или каких-либо существенных патологических изменений. Гематологические и биохимические показатели крови лабораторных животных после введения «КОВИД-глобулина» соответствовали норме. Введение «КОВИД-глобулина» кроликам не вызывало образование тромбов. Распределение по подклассам IgG в препарате соответствовало их содержанию в плазме крови человека. Активность Fc-функции молекулы иммуноглобулина составила более 130 % по сравнению с контрольным препаратом, концентрация активатора прекалликреина в препарате «КОВИД-глобулин» находилась в диапазоне от 4,2 до 4,8 МЕ/мл, антикомплементарная активность составила менее 1 ед. комплемента на 1 мг белка.

Заключение. Результаты всех проведенных исследований продемонстрировали высокий уровень безопасности разработанного препарата «КОВИД-глобулин», полностью соответствующего требованиям, предъявляемым к иммуноглобулинам человека для внутривенного введения отечественными нормативными документами и Европейской Фармакопеей.

Ключевые слова: иммуноглобулин для внутривенного введения, доклинические исследования, токсичность, безопасность, коронавирусная инфекция, COVID-19

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

Вклад авторов. А. М. Николаева, А. В. Иванов, Е. И. Саканян разрабатывали дизайн исследования и организовывали проведение работ. Е. Г. Шилова, Н. Р. Селезнева, Т. В. Вязникова, А. И. Семичева участвовали в проведении исследований безопасности препарата. Н. Р. Селезнева, Т. В. Вязникова, О. В. Белякова, А. М. Николаева проводили обработку и интерпретацию полученных данных. Т. И. Смолянова, М. В. Разумихин, О. В. Белякова, Н. Р. Селезнева, А. М. Николаева участвовали в написании текста статьи. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Финансирование. Работа была профинансирована и выполнена АО «Нацимбио». Сотрудники АО «Нацимбио» М. В. Разумихин и Т. И. Смолянова принимали участие в исследовании, однако компания АО «Нацимбио» как источник финансирования не оказывала влияния на анализ или интерпретацию данных.

Для цитирования: Николаева А. М., Иванов А. В., Смолянова Т. И., Разумихин М. В., Белякова О. В., Шилова Е. Г., Селезнева Н. Р., Вязникова Т. В., Семичева А. И., Саканян Е. И. Доклинические исследования нового иммуноглобулина для внутривенного введения против COVID-19. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):155–160. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-155-160

© Николаева А. М., Иванов А. В., Смолянова Т. И., Разумихин М. В., Белякова О. В., Шилова Е. Г., Селезнева Н. Р., Вязникова Т. В., Семичева А. И., Саканян Е. И., 2023
© Nikolaeva A. M., Ivanov A. V., Smolyanova T. I., Razumikhin M. V., Belyakova O. V., Shilova E. G., Selezneva N. R., Vyaznikova T. V., Semicheva A. I., Sakanyan E. I., 2023

Preclinical Evaluation of a New Anti-COVID-19 Intravenous Immunoglobulin

Alevtina M. Nikolaeva[1], Alexander V. Ivanov[1], Tatiana I. Smolyanova[2]✉, Mikhail V. Razumikhin[1], Olga V. Belyakova[1], Ekaterina G. Shilova[1], Natalia R. Selezneva[1], Tatyana V. Vyaznikova[1], Anastasiia I. Semicheva[1], Elena I. Sakanyan[1]

[1] JSC "NPO "Microgen", 10, 2-nd Volkonsky lane, Moscow, 127473, Russia
[2] JSC "Nacimbio", 10, 2-nd Volkonsky lane, Moscow, 127473, Russia

✉ **Corresponding author:** Tatiana I. Smolyanova. **E-mail:** tatianasmolyanova@gmail.com

ORCID: Alevtina M. Nikolaeva – https://orcid.org/0000-0002-3160-518X; Alexander V. Ivanov – https://orcid.org/0000-0002-7608-1914; Tatiana I. Smolyanova – https://orcid.org/0000-0002-2934-3002; Mikhail V. Razumikhin – https://orcid.org/0000-0002-7364-5235; Olga V. Belyakova – https://orcid.org/0000-0001-6352-9380; Ekaterina G. Shilova – https://orcid.org/0000-0002-0001-6649; Natalia R. Selezneva – https://orcid.org/0000-0003-3690-4952; Tatyana V. Vyaznikova – https://orcid.org/0000-0003-0497-9757; Anastasiia I. Semicheva – https://orcid.org/0000-0003-0230-3091; Elena I. Sakanyan – https://orcid.org/0000-0001-8536-4804.

Received: 19.05.2022 **Revised:** 06.02.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Using of immunoglobulins containing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies may be an effective and safe tool for COVID-19 treatment. An intravenous immunoglobulin COVID-globulin from donor blood plasma containing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies was developed at Joint-Stock Company Nacimbio.

Aim. A pilot study of the safety of the "COVID-globulin".

Materials and methods. When studying the safety of the preparation in animals the following parameters were evaluated: general toxicity, thrombogenic potential, influence on hematological and biochemical parameters, blood clotting and hemolytic activity, determination of local irritant action, pyrogenic properties, bacterial endotoxins, allergic effect of the drug preparation and its physicochemical characteristics.

Results and discussion. Safety studies of "COVID-globulin" in animals showed no signs of intoxication, local irritant action and thrombogenic properties. Macroscopic and histological examination of the organs of rats treated with COVID-globulin showed no signs of necrosis, inflammation, atypia, or any significant pathological changes. Hematological and biochemical parameters of the blood of laboratory animals after the administration of "COVID-globulin" corresponded to the reference values. Administration of COVID-globulin to rabbits did not activate blood clot formation. The IgG subclasses distribution in the preparation corresponded to that in human plasma. The activity of the Fc-function of the immunoglobulin molecule was more than 130 % compared to the reference standard preparation, the concentration of the prekallikrein activator in the COVID-globulin ranged from 4.2 to 4.8 IU/ml, anticomplementary activity was less than 1 unit complement per 1 mg of protein.

Conclusion. The results of all studies have demonstrated a high level of safety of the developed COVID-globulin preparation, which meets the safety requirements for human immunoglobulins for intravenous administration by national regulatory documents and the European Pharmacopoeia.

Keywords: intravenous immunoglobulin, preclinical studies, toxicity, safety, coronavirus infection, COVID-19

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

Contribution of the authors. Alevtina M. Nikolaeva, Alexander V. Ivanov, Elena I. Sakanyan designed and coordinated the study. Ekaterina G. Shilova, Natalia R. Selezneva, Tatyana V. Vyaznikova, Anastasiia I. Semicheva performed the safety study of the preparation. Natalia R. Selezneva, Tatyana V. Vyaznikova, Olga V. Belyakova, Alevtina M. Nikolaeva did the statistical analysis and interpretation of the data. Tatiana I. Smolyanova, Mikhail V. Razumikhin, Olga V. Belyakova, Natalia R. Selezneva, Alevtina M. Nikolaeva wrote the manuscript. All authors participated in discussion of the data in the in the form of scientific discussion.

Funding. The work was financed and carried out by JSC "Nacimbio". Employees of JSC "Nacimbio" Mikhail V. Razumikhin and Tatiana I. Smolyanova took part in the study, but JSC "Nacimbio" as a source of funding did not influence the analysis or interpretation of the data.

For citation: Nikolaeva A. M., Ivanov A. V., Smolyanova T. I., Razumikhin M. V., Belyakova O. V., Shilova E. G., Selezneva N. R., Vyaznikova T. V., Semicheva A. I., Sakanyan E. I. Preclinical evaluation of a new anti-COVID-19 intravenous immunoglobulin. *Drug development & registration*. 2023;12(1):155–160. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-155-160

ВВЕДЕНИЕ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 марта 2020 г. официально признала вспышку новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванную SARS-CoV-2, пандемией. Почти с самого начала пандемии COVID19 появились сообщения об использовании плазмы реконвалесцентов, как перспективном методе лечения [1]. Подобная терапия в прошлом была успешно использована для улучшения выживаемости у пациентов с такими серьезными острыми респираторными синдромами, как SARS и MERS, которые также вызваны коронавирусами [2]. Однако использование плазмы всегда сопряжено с риском посттрансфузионных осложнений различного характера, в том числе заражения гемотрансмиссивными инфекциями [3]. В качестве альтернативы прямому переливанию для лечения COVID-19 возможно использование поликлональных иммуноглобулинов, полученных из плазмы доноров, содержащих нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела.

В АО «Нацимбио» разработана технология получения лекарственного препарата «КОВИД-глобулин» Иммуноглобулин для внутривенного введения, содержащего специфические антитела, обладающие нейтрализующей активностью в отношении возбудителя SARS-CoV-2.

Цель исследования: экспериментальное доклиническое исследование безопасности препарата «КОВИД-глобулин».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемый препарат «КОВИД-глобулин» (иммуноглобулин человека против COVID-19, раствор для инфузий, 100 мг/мл) представляет собой высокоочищенный препарат иммуноглобулина G, выделенный из плазмы крови доноров, содержащей нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела, протестированной на наличие маркеров инфекций, передающихся с кровью, и соответствующей показателям качества ФС.3.3.2.0001.19 «Плазма человека для фракционирования». Действующим началом препарата являются иммуноглобулины класса G, обладающие нейтрализующей активностью антител к SARS-CoV-2.

Технология производства иммуноглобулина G включает процедуры инактивации и/или удаления вирусов: обработка иммуноглобулина сольвент/детергентной смесью, хроматографическая очистка, выдерживание при низком pH, для которых доказано снижение концентрации модельных вирусов.

Каждая серия иммуноглобулина изготавливается из пула плазмы доноров, содержащей нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела, индивидуально и минипулах проверенной на отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита B (HBsAg), антител к вирусу гепатита C, антител к вирусу иммунодефицита человека ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена p24 ВИЧ-1, антител к возбудителю сифилиса (*Treponema pallidum*). В производстве используется плазма только с отрицательными результатами тестирования.

В 1 мл препарата содержится:

- **Действующее вещество**: белки плазмы человека, из которых иммуноглобулин G не менее 95 % – 100 мг. Специфическая активность антител к SARS-CoV-2 в ИФА – не менее 160 АКЕ/мл (за 1 единицу АКЕ иммуноглобулина была принята величина, обратная его разведению, обладающему способностью ингибировать появление на монослое культуры клеток Vero цитопатогенного действия SARS-CoV-2 в двух из трех лунок в реакции нейтрализации против 100 БОЕ вируса SARS-CoV-2).
- **Вспомогательные вещества**: глицин (кислота аминоуксусная) – 25 мг; вода для инъекций – до 1 мл.

МЕТОДЫ

Доклинические испытания были проведены на лабораторных животных пяти видов: крысы (60 голов), мыши (25 голов), кролики (75 голов), морские свинки (32 головы), хомяки (60 голов). Содержание животных и исследования проводили в соответствии с методическими рекомендациями по проведению доклинических испытаний лекарственных средств [4], а также в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей[1].

Изучение **токсического действия** проводили при однократном (острая токсичность) и многократном введении (субхроническая токсичность). Изучение острой токсичности проводили на двух видах животных: на беспородных крысах обоего пола массой 130–200 г и кроликах породы советская шиншилла обоего пола массой 1,8–2,3 кг. При изучении острой токсичности и влияния на гематологические и биохимические показатели препарат вводили в максимально возможном объеме для данного вида животных: 20 мл для кроликов и 2 мл для крыс. Изучение субхронической токсичности проводили на сирийских золотистых хомяках (SPF) обоего пола массой 30–40 г. Исследуемый препарат вводили внутрибрюшинно четырехкратно с интервалом сутки в максимальном для данного вида лабораторных животных объеме: по 1,0 мл ежедневно.

Контрольным животным вводили в том же количестве физиологический раствор. За животными наблюдали в течение 14 суток. Ежедневной регистрации подлежали: гибель животных, их масса, поведение, внешнее состояние, наличие клинических симптомов интоксикации. Патоморфологическое исследование при изучении острой токсичности включало в себя макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов: головного мозга, сердца, печени, легких, селезенки, почек, надпочечников, тимуса, лимфатических узлов (паховых и брыжеечных), яичников и семенников.

При изучении **влияния на гематологические и биохимические показатели крови** в периферической крови, взятой из хвостовой (крысы) или ушной (кролики) вены определяли уровень гемоглобина, содержание эритроцитов, лейкоцитов, показатели лейкограммы, а также биохимические показатели с использованием полуавтоматического биохимического анализатора Clima MC-15 (АО «ДИАКОН-ДС», Россия) с автоматическим учетом стандартов и контрольных тестов.

[1] Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Страсбург. 18 марта 1986 г. Доступно по: https://rm.coe.int/168007a6a8. Ссылка активна на 16.08.2022.

Определение **местного раздражающего действия** было проведено на кроликах. Препарат вводили животным в правое ухо перивенозно, артериально или внутривенно, в левое ухо аналогичным образом и в эквивалентных количествах вводили физиологически раствор. Реакция регистрировалась через 24, 48, 72 часа и 7 суток после введения препаратов. На гистологическое исследование были взяты фрагменты вен и артерий по ходу вены и артерии и регионарные лимфатические узлы у 3 животных, подвергнутых эвтаназии через 24 часа и 3 животных, подвергнутых эвтаназии через 7 суток после введения препарата.

Оценку **тромбогенного потенциала** осуществляли на модели венозного стаза по методу S. Wessler [5] с использованием кроликов породы советская шиншилла (вес 2,0–2,5 кг) по 3 кролика на препарат. Миорелаксацию проводили препаратом «Ксила» (Interchemie Werken "De Adelaar" B.V., Нидерланды, 0,15 мл/кг – 0,2 мл/кг внутримышечно), общую анестезию – препаратом «Золетил-100» (Virbac Sante Animale, Франция, 0,15 мл/кг – 0,2 мл/кг с добавлением 0,9%-го раствора натрия хлорида до объема 1,0 мл; внутримышечно). «КОВИД-глобулин» вводили по 2,5 мл, 0,9%-й раствор натрия хлорида – по 5,0 мл, плазму крови человека – по 2,5 мл каждому кролику.

Определение подклассов IgG проводили с применением тест-системы Human IgG Subclass ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции по применению.

Определение **функционального состояния Fc-фрагмента** иммуноглобулинов проводили с помощью реакции коагглютинации, которая основана на способности белка А стафилококка штамма Cowan I избирательно связываться с Fc-фрагментом иммуноглобулинов класса G. Функциональное состояние Fc-фрагмента испытуемых иммуноглобулинов определяли с помощью индекса функции Fc (IFc), вычисляемого как отношение времени образования агглютинатов в стандарте иммуноглобулина (Ph. Eur. Reference Standard, Sigma-Aldrich, code Y0001512) ко времени образования агглютинатов в испытуемом препарате.

Изучение пирогенных свойств и специфической безопасности по показателям антикомплементарная активность и активатор прекалликреина проводили в соответствии с методиками, описанными в Государственной фармакопее РФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование общетоксических свойств препарата «КОВИД-глобулин» показало, что как однократное, так и многократное введение исследуемого препарата не вызывало гибели животных, видимых признаков изменения общего клинического состояния. Внешний вид подопытных животных, поведенческие реакции, двигательная активность, а также потребление корма и воды у лабораторных животных всех групп существенно не отличались и соответствовали показателям нормы для каждого вида лабораторных животных. На протяжении всего эксперимента у подопытных животных наблюдалась положительная динамика изменения массы тела (таблица 1). Статистически значимых различий между опытной и контрольной группами выявлено не было (t-критерий Стьюдента, $p > 0,05$).

Макроскопическое исследование внутренних органов лабораторных животных не выявило различий между животными опытной и контрольной групп как при однократном, так и при многократном введении препарата «КОВИД-глобулин», внутренние органы всех животных имели характерные признаки, расположение и строение. Оболочки, выстилающие внутренние полости, влажные, серовато-розового цвета, без признаков воспаления. Морфологических признаков токсичности в виде альтеративных процессов в паренхиматозных органах (некрозы, выраженные дистрофические изменения, тяжелые расстройства кровообращения) не установлено.

При исследовании периферической крови на 14-й день опыта у животных (крысы, кролики), которым вводили препарат «КОВИД-глобулин» внутривенно

Таблица 1. Прирост массы тела лабораторных животных при изучении токсичности препарата «КОВИД-глобулин»

Table 1. Increasing of body weight of laboratory animals during "COVID-globulin" toxicity studies

	Крысы (*n* = 60) Rats (*n* = 60)		**Кролики (*n* = 24)** Rabbits (*n* = 24)		**Хомяки (*n* = 60)** Hamsters (*n* = 60)	
	КОВИД-глобулин COVID-globulin	**Контроль** Control	**КОВИД-глобулин** COVID-globulin	**Контроль** Control	**КОВИД-глобулин** COVID-globulin	**Контроль** Control
24 часа 24 hours	9,00 ± 6,07	6,30 ± 3,09	96,25 ± 14,36	94,00 ± 16,25	13,36 ± 0,24	14,14 ± 1,76
7 сут. 7 days	33,60 ± 15,72	34,50 ± 19,54	96,25 ± 14,36	130,00 ± 54,16	34,07 ± 1,05	34,97 ± 0,66
14 сут. 14 days	68,70 ± 20,17	72,80 ± 27,01	96,25 ± 14,36	90,00 ± 8,16	53,73 ± 1,26	54,53 ± 0,88

Примечание. *M* ± *m* – среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

Note. *M* ± *m* is the arithmetic mean ± standard deviation.

в максимальной дозе, не было отмечено изменений в морфологическом составе крови и биохимических показателях по сравнению с показателями животных контрольной группы. Колебания значений всех исследуемых показателей находились в пределах физиологических норм для данных видов животных.

Изучение влияния препарата «КОВИД-глобулин» на свертываемость крови и гемолитическое действие показало, что время свертываемости крови у кроликов до введения препарата, через 24 часа, 7 и 14 суток после введения препарата находилось в норме, то есть в пределах 5–10 минут, количество эритроцитов в крови лабораторных животных до и после введения препарата (через 24 часа, 7 суток и 14 суток) статистически не отличалось. Таким образом показано, что введение препарата не оказывало влияния на свертываемость крови и не оказывало гемолитическое действие.

При изучении местного раздражающего действия было установлено, что «КОВИД-глобулин» не вызывал видимого раздражения кожи, а проведенные морфологические исследования тканей при перивенозном, внутриартериальном и внутривенном введениях не выявили признаков, указывающих на патологические изменения мягких тканей и кровеносных сосудов (артерий, вен) животных.

Введение кролику препарата иммуноглобулина против COVID-19 не активировало образование тромба, в то время как введение плазмы крови человека вызывало образование тромбов у 100 % подопытных животных (размер тромбов составил от 4,5 до 5,0 мм, вес тромбов – от 8,0 до 11,0 мг), а введение 0,9%-го раствора натрия хлорида подтвердило отсутствие спонтанного тромбообразования.

При производстве иммуноглобулинов для внутривенного введения важным является сохранение распределения подклассов IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), близкого к естественному. Анализ показал, что разработанная технология обеспечивает сохранение естественного соотношения подклассов иммуноглобулинов (таблица 2). Важно отметить, что содержания минорных подклассов IgG3 и IgG4 превышает 3 и 6 % соответственно, что свидетельствует о хорошей специфичности процесса очистки по отношению к иммуноглобулинам класса G.

«КОВИД-глобулин» обладал высокой активностью Fc-фрагмента, не уступающей активности стандартного образца. Представленные в таблице 3 результаты свидетельствуют о сохранении целостности Fc-фрагментов антител в процессе производства препарата иммуноглобулина против COVID-19.

Таблица 3. Результаты определения Fc-функции препаратов иммуноглобулинов

Table 3. Results of Fc function determination in immunoglobulin preparations

Образец Sample	**Среднее время агглютинации, сек.** Mean agglutination time, sec.	**Активность Fc-функции, %** Fc-function activity, %
«КОВИД-глобулин» «COVID-globulin»	168 ± 13	135,4
Неогепатект (BIOTEST PHARMA GmbH, Германия) Neohepatekt (BIOTEST PHARMA GmbH, Germany)	132 ± 13	166,7
Октагам (OCTAPHARMA Pharmazeutika Produktionsges, m.b.H., Австрия) Octagam (OCTAPHARMA Pharmazeutika Produktionsges, m.b.H., Austria)	160 ± 10	137,5
Положительный контроль. Стандартный образец Human Immunoglobulin BRP (Fc Function and Molecular size) (Ph. Eur.) Positive control. Standard sample Human Immunoglobulin BRP (Fc Function and Molecular size) (Ph. Eur.)	220 ± 10	100
Отрицательный контроль (Fab_2 – фрагменты) Negative control (Fab_2 – region)	Отсутствие агглютинации в течение 10 минут No agglutination within 10 minutes	0

Примечание. $M \pm m$ – среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

Note. $M \pm m$ is the arithmetic mean ± standard deviation.

Таблица 2. Определение подклассов IgG в препарате «КОВИД-глобулин»

Table 2. Determination of IgG subclasses distribution in COVID-globulin

Показатель Characteristic		**Серии препарата** Batch number				**Нормальное распределение** Distribution corresponding to normal human serum
		1	**2**	**3**	**4**	
Подклассы IgG IgG subclasses	IgG1, %	57,0	59,3	59,6	64,2	43–75
	IgG2, %	32,9	30,9	31,4	30,7	16–48
	IgG3, %	4,8	3,8	4,2	3,1	1,7–7,5
	IgG4, %	5,3	6,1	5,8	5,0	0,8–11,7

По результатам исследования концентрация активатора прекалликреина (АПК) находилась в диапазоне от 4,2 до 4,8 МЕ/мл, что значительно ниже нормируемого показателя (35 МЕ/мл).

Было установлено, что 1 мг белка «КОВИД-глобулина» связывал от 0,62 до 0,71 ед. (CH50) комплемента, при норме менее 1 ед. (CH50), что свидетельствовало о низкой комплементарной активности препарата.

Препарат «КОВИД-глобулин» не обладал пирогенными свойствами: при введении препарата кроликам в дозе 500 мг/кг массы тела животного сумма индивидуального максимального повышения температуры тела у трех кроликов не превышала 1,2 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты всех проведенных исследований демонстрируют высокий уровень безопасности разработанного препарата против COVID-19 «КОВИД-глобулин». «КОВИД-глобулин» полностью соответствует требованиям безопасности, предъявляемым к иммуноглобулинам человека для внутривенного введения отечественными нормативными документами и Европейской фармакопеей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rojas M., Rodríguez Y., Monsalve D. M., Acosta-Ampudia Y., Camacho B., Gallo J. E., Rojas-Villarraga A., Ramírez-Santana C., Díaz-Coronado J. C., Manrique R., Mantilla R. D., Shoenfeld Y., Anaya J. M. Convalescent plasma in Covid-19: Possible mechanisms of action. *Autoimmunity Reviews*. 2020;19(7):102554. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102554.
2. 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.
3. Захаров В. В., Афонин Н. И. Безопасность гемотрансфузионной терапии. *Вестник службы крови России*. 2006;3(09):6–12.
4. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть 2. М.: Гриф и К; 2012. 536 с.
5. Wessler S., Reiner S. M., Sheps M. C. Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum. *Journal of applied physiology*. 1959;14:943–946.

REFERENCES

1. Rojas M., Rodríguez Y., Monsalve D. M., Acosta-Ampudia Y., Camacho B., Gallo J. E., Rojas-Villarraga A., Ramírez-Santana C., Díaz-Coronado J. C., Manrique R., Mantilla R. D., Shoenfeld Y., Anaya J. M. Convalescent plasma in Covid-19: Possible mechanisms of action. *Autoimmunity Reviews*. 2020;19(7):102554. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102554.
2. 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.
3. Zakharov V. V., Afonin N. I. Safety of blood transfusion therapy. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2006;3(09):6–12. (In Russ.)
4. Mironov A. N. Guidelines for Preclinical Trials of Medicinal Products. Part 2. Moscow: Grif i K; 2012. 536 p. (In Russ.)
5. Wessler S., Reiner S. M., Sheps M. C. Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum. *Journal of applied physiology*. 1959;14:943–946.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-161-181
УДК 615.032: 615.035

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Поведенческая фармакология как основной подход в изучении эффективности потенциальных психотропных средств: анализ современных методов (обзор)

И. И. Семина[1,2]✉, А. З. Байчурина[2], Д. О. Никитин[2], А. В. Никитина[2], Р. И. Мустафин[1,4]✉✉, В. В. Хуторянский[3]

[1] Центральная научно-исследовательская лаборатория, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Толстого, д. 6/30
[2] Кафедра фармакологии, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Толстого, д. 6/30
[3] Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom
[4] Институт фармации, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

✉ **Контактное лицо:** Семина Ирина Ивановна. **E-mail:** seminai@mail.ru
✉✉ **Контактное лицо:** Мустафин Руслан Ибрагимович. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: И. И. Семина – https://orcid.org/0000-0003-3515-0845; А. З. Байчурина – https://orcid.org/0000-0002-7779-6583;
Д. О. Никитин – https://orcid.org/0000-0001-5773-867X; А. В. Никитина – https://orcid.org/0000-0001-6219-6246;
Р. И. Мустафин – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853; В. В. Хуторянский – https://orcid.org/0000-0002-7221-2630.

Статья поступила: 08.07.2022 **Статья принята в печать:** 00.02.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Поведенческие методы на лабораторных животных признаны основным подходом при изучении активности потенциальных психотропных средств и позволяют оценить основные эффекты новых соединений, повысить возможность прогнозирования удачного исхода будущих клинических испытаний.

Текст. В предлагаемой обзорной статье осуществлен анализ основных современных поведенческих моделей на грызунах, широко применяемых для скрининга и изучения фармакологической активности потенциальных психотропных средств. Выделены преимущества и недостатки каждого теста и продемонстрированы комплексы поведенческих методов, наиболее доказательно подтверждающих воспроизводимость полученных результатов при клинических испытаниях. Проведено описание и оценка поведенческих методов, характеризующих состояние тревожности, которые используются для скрининга новых соединений с анксиолитической активностью (тесты «Открытое поле», «Темно-светлая камера», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Последовательность лучей»). Широко представлен спектр тестов, применяемых для изучения когнитивных функций и процессов памяти (различные лабиринты – Т-образный, У-образный, радиальный лабиринт, лабиринт Барнс, Е-лабиринт; водные лабиринты – Морриса, Т-лабиринт) с описанием сравнительного анализа и необходимых условий, обеспечивающих достоверность информации. Важным направлением в области поведенческой фармакологии является моделирование нарушений социального поведения и исследование подходов для его коррекции – основные методы, необходимые для исследования социального поведения, представлены в обзоре тестами «Трехкамерный социальный тест», тест «Открытое поле» расширенный и др.

Заключение. Фармакология поведения диктует необходимость тесного взаимодействия доклинических и клинических этапов исследований в рамках развития трансляционной медицины и разработки подходов, доказательно подтверждающих воспроизводимость полученных результатов при клинических испытаниях. Необходимы также усовершенствование существующих и разработка новых поведенческих моделей психических расстройств, и поиск новых путей к изучению механизмов формирования нарушений поведения.

Ключевые слова: поведенческие методы, психофармакология, когнитивные функции, тревожные расстройства, социальное поведение, психопатологические состояния, грызуны, видеотрекинг

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

Вклад авторов. И. И. Семина произвела обработку материалов, подготовку драфта статьи. Д. О. Никитин проводил сбор материалов, подготовку и оформление рисунков. А. З. Байчурина, А. В. Никитина, Р. И. Мустафин и В. В. Хуторянский участвовали в написании, редактировании и анализе материалов, рецензировании и корректировке драфта манускрипта. Манускрипт был написан при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию манускрипта.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда в рамках научного проекта № 20-65-46007.

Для цитирования: Семина И. И., Байчурина А. З., Никитин Д. О., Никитина А. В., Мустафин Р. И., Хуторянский В. В. Поведенческая фармакология как основной подход в изучении эффективности потенциальных психотропных средств: анализ современных методов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):161–181. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-161-181

Behavioral Pharmacology as the Main Approach to Study the Efficiency of Potential Psychotropic Drugs: Analysis of Modern Methods (Review)

Irina I. Semina[1,2]✉, Afrida Z. Baichurina[2], Dmitry O. Nikitin[2], Anastasiya V. Nikitina[2], Rouslan I. Moustafine[1,4]✉✉, Vitaliy V. Khutoryanskiy[3]

© Семина И. И., Байчурина А. З., Никитин Д. О., Никитина А. В., Мустафин Р. И., Хуторянский В. В., 2023
© Semina I. I., Baichurina A. Z., Nikitin D. O., Nikitina A. V., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V., 2023

[1] Central Research Laboratory, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 6/30, Tolstoy str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420012, Russia
[2] Department of Pharmacology, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 6/30, Tolstoy str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420012, Russia
[3] Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom
[4] Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

✉ **Corresponding author:** Irina I. Semina. **E-mail:** seminai@mail.ru
✉✉ **Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Irina I. Semina – https://orcid.org/0000-0003-3515-0845; Afrida Z. Baichurina – https://orcid.org/0000-0002-7779-6583;
Dmitry O. Nikitin – https://orcid.org/0000-0001-5773-867X; Anastasiya V. Nikitina – https://orcid.org/0000-0001-6219-6246;
Rouslan I. Moustafine – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853; Vitaliy V. Khutoryanskiy – https://orcid.org/0000-0002-7221-2630.

Received: 08.07.2022 **Revised:** 00.02.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Behavioral methods on laboratory animals are recognized as the main approach in studying the activity of potential psychotropic drugs and allow us to evaluate the main effects of new compounds, increase the possibility of predicting a successful outcome of future clinical trials.

Text. This review article analyzes the main modern behavioral models in rodents that are widely used for screening and studying the pharmacological activity of potential psychotropic drugs. The advantages and disadvantages of each test are highlighted and complexes of behavioral methods are demonstrated that most conclusively confirm the reproducibility of the results obtained in clinical trials. The description and evaluation of behavioral methods that characterize the state of anxiety, which are used to screen for new compounds with anxiolytic activity (tests «Open field», «Dark-light chamber», «Elevated plus maze», «Sequence of rays»). The range of tests used to study cognitive functions and memory processes is widely presented (various mazes – T-shaped, U-shaped, radial maze, Barnes maze, E-maze; water mazes – Morris, T-maze) with a description of a comparative analysis and necessary conditions that ensure the reliability of information. An important direction in the field of behavioral pharmacology is the modeling of violations of social behavior and the study of approaches for its correction – the main methods necessary for the study of social behavior are presented in the review by the tests «Three-chamber social test», «Open field» extended test, etc.

Conclusion. Behavioral pharmacology dictates the need for close interaction between preclinical and clinical stages of research in the framework of the development of translational medicine and the development of approaches that provide evidence for the reproducibility of the results obtained in clinical trials. It is also necessary to improve existing and develop new behavioral models of mental disorders and to search for new ways to study the mechanisms of formation of behavioral disorders.

Keywords: behavioral methods, psychopharmacology, cognitive functions, anxiety disorders, psychopathological conditions, video tracking

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. Irina I. Semina processed the materials, preparation of a draft article, Dmitry O. Nikitin collected materials, preparation and design of drawings. Afrida Z. Baichurina, Anastasiya V. Nikitina, Rouslan I. Moustafine and Vitaliy V. Khutoryanskiy participated in writing, editing and analyzing materials, reviewing and correcting the manuscript draft. The manuscript was written with the participation of all co-authors. All of the above authors agreed on the final version of the manuscript.

Acknowledgment. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF) within the framework of the scientific project No. 20-65-46007 (to I.I.S., D.O.N., A.V.N., R.I.M., V.V.K.).

For citation: Semina I. I., Baichurina A. Z., Nikitin D. O., Nikitina A. V., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Behavioral pharmacology as the main approach to study the efficiency of potential psychotropic drugs: analysis of modern methods. *Drug development & registration*. 2023;12(1):161–181. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-161-181

ВВЕДЕНИЕ

Поведенческие методы на лабораторных животных признаны основным подходом при изучении активности потенциальных психотропных средств и позволяют оценить основные эффекты новых соединений, получить некоторые данные об их предполагаемом механизме действия и повысить прогноз благоприятного прогноза клинических испытаний психотропных средств [1–3]. Именно поведенческие методы играют важную инструментальную роль, подтверждая на уровне целостного организма, что исследуемое вещество достигает мишени и взаимодействует с ней адекватным образом.

Основная идея поведенческой фармакологии – использование поведенческого анализа для понимания эффектов биологически активных веществ и лекарственных препаратов. В настоящее время разработан широкий спектр поведенческих тестов, служащих конкретным исследовательским целям. Поведенческие модели используют в качестве скрининговых тестов при разработке новых лекарственных средств (анксиолитиков, нейролептиков, антидепрессантов, улучшающих когнитивные функции и др.) и как инструменты исследования патогенетических механизмов при моделировании различных психических и психопатологических состояний, таких, как например болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, аутистические расстройства, когнитивные нарушения, депрессивные и тревожные состояния и др.

Цель нашей обзорной статьи – анализ основных современных поведенческих моделей на грызунах, широко применяемых для скрининга и изучения фармакологической активности потенциальных психотропных средств.

Ценность и достоверность информации, полученной в поведенческих экспериментах на лабораторных животных, в значительной мере зависит от степени соответствия выбранной модели целям и задачам исследования, а также от соблюдения множества условий. Необходимо обязательно учитывать такие параметры как вид, возраст, пол, генетические линии лабораторных животных, условия их содержания и отношения к ним со стороны экспериментатора, предыдущий опыт тестирования, количество повторений тестов. Результаты эксперимента зависят также от наличия и продолжительности периода адаптации животного к испытательной лаборатории, времени суток при проведении испытаний, уровня освещенности; присутствия или отсутствия экспериментатора в помещении, где проводится опыт. Исследования необходимо проводить на сертифицированном оборудовании с использованием валидизированных методов [4, 5].

В данном обзоре нами описаны только этологические поведенческие методы, которые основаны на характерных аспектах в поведении исследуемых животных, без использования агрессивного воздействия.

Поведенческие тесты для изучения состояния тревожности. Исследование новых лекарственных веществ, влияющих на состояние тревожности (анксиолитики)

Сложная характеристика тревожности у человека свидетельствует о трудностях, связанных с поиском подходящих моделей тревожных состояний у животных. Необходимо провести целый комплекс тестов, чтобы выявить спектр симптомов, которые можно рассматривать как прогностические для терапевтической эффективности анксиолитиков у пациентов. Использование экспериментальных поведенческих моделей для выявления противотревожной активности веществ в фармакологических исследованиях имеет давнюю традицию. Эти методы могут быть конфликтными и неконфликтными. В настоящее время все более популярными становятся неконфликтные методы как наиболее гуманные по отношению к животным, среди которых основное место занимают методы с использованием этологических подходов (рисунок 1)

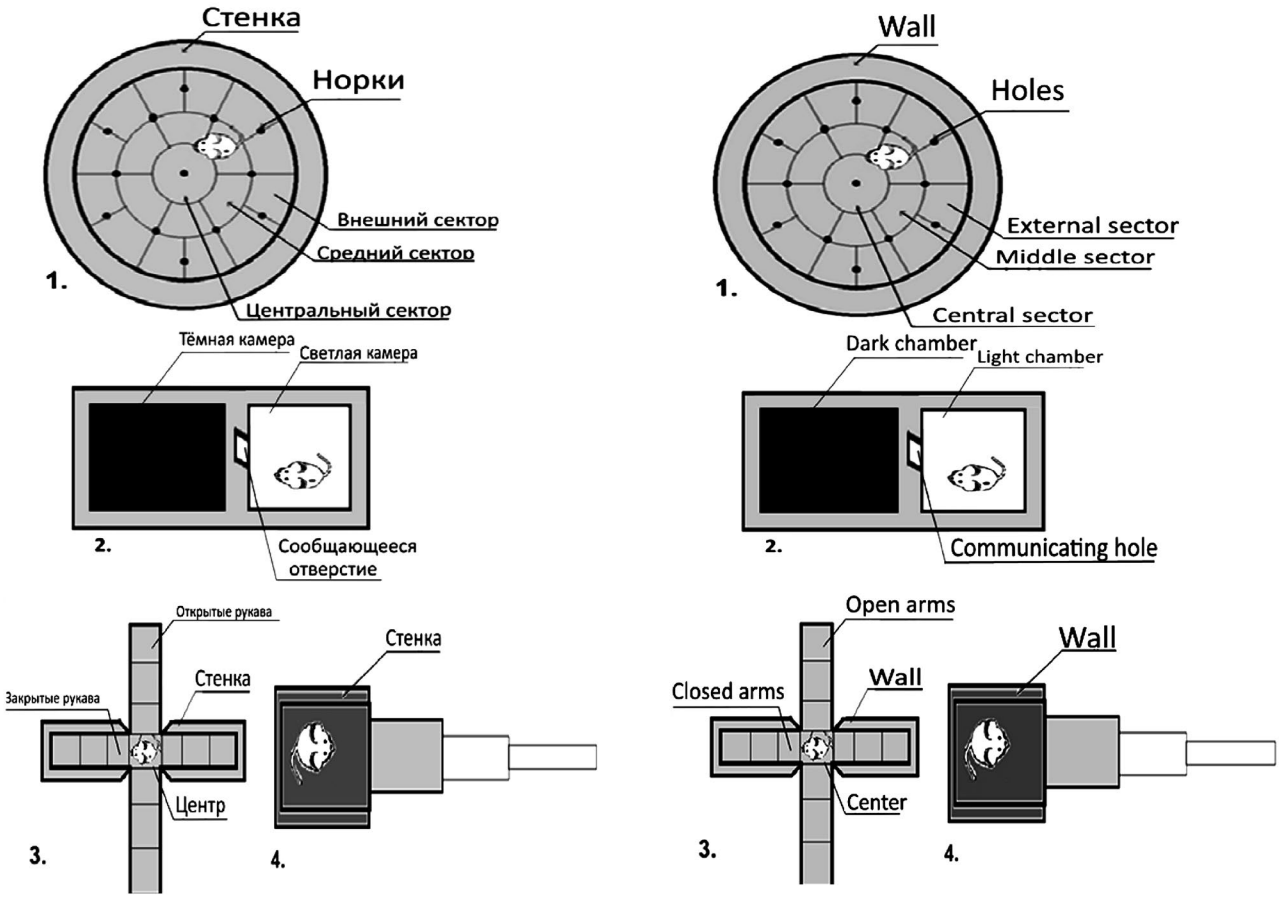


Рисунок 1. Поведенческие методы для исследования тревожности:

1 – тест «Открытое поле» (ОП); 2 – тест «Темно-светлая камера» (ТСК); 3 – тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ); 4 – тест «Последовательность лучей» (ПЛ)

Figure 1. Behavioral methods for the study of anxiety:

1 – test "Open field" (OF); 2 – test "Dark-light chamber" (DLC); 3 – test "Elevated plus maze" (EPM); 4 – test "Successive alleys" (SA)

«Открытое поле» (ОП) – наиболее часто применяемый метод исследования поведения, используемый для изучения состояния тревожности у грызунов и скрининга новых веществ с потенциальной психотропной активностью. Метод впервые был опубликован в 1932 году [6] и подробно описан в 1969 г. [7]. С помощью данного теста можно оценить проявление и динамику отдельных поведенческих элементов, уровень эмоционально-поведенческой активности, уровень исследовательского поведения у мышей и крыс [8, 5, 9, 10].

ОП и условия тестирования в нем довольно разнообразны. Различия касаются формы (круглое, квадратное, прямоугольное), цвета (черное или белое), размера, освещения при тестировании и др. [11–14]. Стандартное, наиболее часто используемое ОП, представляет собой квадратную или круглую площадку, разделенную на 3 ряда равных секторов, на пересечении которых имеются отверстия. Длительность тестирования каждого животного обычно составляет от 3 до 5 мин.

Важным фактором, способным влиять на настроение животных и соответствующие показатели в ОП, является освещенность. К сожалению, во многих публикациях отсутствует информация об освещенности поверхности, что снижает возможность сравнения результатов отдельных исследований. В тех же случаях, когда информация предоставляется, показатели освещенности варьируют в очень широком диапазоне (от 7–8 лк до 600 лк). В работе [13] представлены результаты исследований, демонстрирующие зависимость влияния освещенности на тревожность и исследовательское поведение мышей линии С57 в тесте ОП в контрольных условиях и после применения анксиолитического или анксиогенного агентов. Проведя анализ данных, представленных в этой и других статьях [11, 15, 16], мы сделали вывод, что оптимальными показателями освещенности являются 80–100 лк, так как в этих условиях возникают дискомфорт и тревога у мышей и крыс, в естественных условиях предпочитающих темноту. При исследовании предполагаемой анксиолитической активности изучаемых агентов этот уровень можно повысить до 250–350 лк, а при тестировании стрессогенных и анксиогенных веществ – снизить до 40–30 лк. Следует отметить, что уменьшение интенсивности света до 7–8 лк вообще устраняет световой дискомфорт в ОП [5, 13].

Процедура тестирования обычно начинается с помещения испытуемого животного в центр ОП. Однако некоторые авторы предпочитают начинать тестирование с размещения крысы в углу поля или с краю [10]. В литературе отсутствуют данные о влиянии на общие показатели тестирования места первоначальной посадки животного. В наших экспериментах мы всегда начинаем тестирование и у крыс, и у мышей с центра ОП [17].

Классическими показателями, регистрируемыми в ОП, являются:

1) двигательная активность: горизонтальная (количество пересеченных квадратов) и вертикальная (количество вертикальных стоек грызуна на задних лапах);
2) исследовательская активность (количество обследованных отверстий;
3) груминг (умывание), короткий и длительный;
4) акты дефекации.

Показателем для регистрации горизонтальной двигательной активности является количество пересечений животным одной из сторон квадрата или сектора. По мнению некоторых авторов, следует регистрировать только случаи, когда животное пересекает линию всеми четырьмя лапами [18] в то время как другие авторы регистрируют и пересечение линии передними лапами [19, 20]. По-нашему мнению, достаточно информативна регистрация количества пересечений линий хотя бы двумя передними лапами, так как животное может быть крупным и полностью не помещаться в квадрате или секторе.

Вертикальная двигательная активность в ОП может быть представлена двумя вариантами стоек – либо животное держит передние лапы на весу, либо касается ими стенки поля.

Исследовательская активность оценивается по количеству обследованных отверстий в полу ОП, то есть, по числу обнюхиваний краев отверстий или заглядываний внутрь отверстий головой «по глаза». Последнее наиболее часто подразумевается под «обследованием отверстий».

Груминг у грызунов является одним из поведенческих маркеров стресса и усиливается при помещении животных в незнакомую среду [21]. Подсчитывается количество актов груминга за тестовый период.

Уровень дефекации считается индексом «эмоциональности» животного. Для определения этого показателя рекомендуется подсчитывать не количество болюсов, а число актов дефекации как наиболее точный показатель. Было высказано предположение, что реакция страха (или беспокойства) животного, подвергшегося воздействию новой и, следовательно, потенциально опасной среды, сопровождается повышением уровня дефекации [5].

При тестировании грызунов с моделями психопатологических состояний необходимо учитывать, что основным «симптомом» поведения грызунов в ОП является тревожность, характеризующаяся снижением общей двигательной активности, меньшим процентом времени, проведенным в центральной зоне и более длительным пребыванием в периферийной [9, 10].

Длительность тестирования каждого животного в ОП зависит от целей эксперимента, и обычно составляет от 3 до 5 минут, но иногда увеличивается до 60 мин [12, 22–24]. Необходимо учитывать, что на поведение грызунов в первые 2–4 минуты тестирования

влияют такие эмоциогенные аспекты, как новизна и внезапность, поэтому длительность большинства исследований не превышает 5 мин [10, 17, 20].

В настоящее время многими исследователями для тестирования используются системы видеонаблюдения, позволяющие вести непрерывную запись с последующим анализом полученных результатов с помощью различных компьютерных программ – EthoVision® XT Noldus Inc. (США), ANY-maze, Stoelting CO (США) и др. Это существенно облегчает работу экспериментатора и позволяет расширить возможности теста, зафиксировав дополнительные показатели, такие как общее пройденное расстояние, время, проведенное в центральной и периферийной зоне, пройденное расстояние в центральной и периферийной зонах, время неподвижности, средняя скорость, максимальная скорость и др. Следует отметить, что чаще всего программы не могут анализировать такой показатель как «обследование отверстий», и в данном случае необходимо использовать ручную регистрацию видеоматериала. В нашей лаборатории мы успешно применяем компьютерную программу EthoVision® XT Noldus Inc., а для регистрации сложных этологических показателей используем программы ручной обработки видеоматериала Real-Timer (ООО «НПК Открытая Наука», Россия).

При тестировании грызунов в ОП следует принимать во внимание важные аспекты, без учета которых полученные результаты могут быть сомнительными: пол животного, характер обращения с животными до и во время тестирования, количество повторений тестов, выполненных на одном животном.

Пол животного оказывает важное влияние на модуляцию поведения в ОП. Показано, что самки грызунов разных линий обычно передвигаются интенсивнее, чем самцы, и показатели поведения у них менее стабильны [25–27]. Считается, что результаты, полученные с использованием самцов, в целом, более последовательны и предсказуемы, поэтому целесообразно исследование в ОП проводить на самцах [13].

Характер обращения с животными до и во время тестирования может существенно изменять поведенческие характеристики. Описана корреляция между обращением с животными, условиями содержания и поведением в ОП [28, 29]. Необходимо иметь ввиду, что дополнительный стресс может оказывать существенное влияние на поведенческие характеристики в ОП, вызывая симптомы тревожности у грызунов [13]. Чтобы избежать этих ошибок, эксперименты необходимо проводить в звукоизоляционной комнате с постоянным световым режимом, без присутствия экспериментатора.

Еще один значимый аспект, который следует принимать во внимание при тестировании в ОП – это количество повторений тестов, выполненных на одном животном. Повторное тестирование приводит к снижению активности в ОП из-за привыкания, в результате которого снижаются такие эмоциогенные факторы как новизна и неожиданность [5, 13].

Тестирование новых соединений с предполагаемой психотропной активностью могут вызывать следующие изменения поведения в ОП: уменьшение количества пересечений линий и заглядываний в отверстия, что является показателем седативной активности; соответствующее их увеличение – показателем стимулирующего эффекта; удлинение периода нахождения в центре ОП характеризует анксиолитическое действие [14, 30], а динамика изменения исследовательских показателей – предполагаемые ноотропные [31, 32].

Установка «Темно-светлая камера» (ТСК) используется для исследования поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет анализировать такие показатели как предпочтение темноты или света. Методика разработана для анализа развития состояния тревожности у лабораторных грызунов и изучения анксиолитической активности психотропных веществ. Первоначально ТСК была описана для тестирования мышей [33], а затем была модифицирована и адаптирована для крыс [30]. Этот тест, подобно другим, предназначенным для исследования тревожности и анксиолитической активности психотропных веществ, основан на врожденном дискомфорте грызунов к яркому свету и их естественному стремлению к исследованиям в ответ на легкие стрессовые факторы, такие как новая среда. Установка ТСК включает 2 камеры, одна из которых (примерно 2/3 общей площади аппарата) состоит из прозрачных или белых пластиковых стенок и хорошо освещена. Другая камера (примерно 1/3 общей площади) окрашена в черный цвет и не освещена. Светлая и темная камеры соединены небольшим проходом, через который животные могут свободно передвигаться [34]. Освещенность камеры зависит от задач эксперимента. При низком уровне освещения (10–240 лк) контрольные животные проводят приблизительно 60–70 % своего времени в светлой камере и 30 % – в темной. При 400 лк время, проведенное животным в светлой части, укорачивается с соответствующим увеличением его пребывания в темном отсеке [15]. Длительность тестирования каждого животного равна 5 мин. Животное помещают на середину светлого отсека, носом к отверстию в темный отсек. Считается, что грызун вошел в другой отсек, если он там размещается всеми четырьмя лапами [35]. Во время эксперимента регистрируют время, проведенное в светлом отсеке, количество переходов из одного отсека в другой [15, 36–38], латентный период захода в темный отсек и время, проведенное в нем [5, 39]. Можно оценивать вертикальную и горизонтальную двигательную активность в светлом отсеке камеры при условии использования видеотрекинга. Для анализа поведения также используют компьютерные программы, аналогично таковым в открытом поле.

Исследования показали, что соединения с анксиолитической активностью увеличивают количество переходов и время, проведенное в светлой зоне, тогда как вещества с анксиогенными свойствами уменьшают эти показатели [30, 35]. Увеличение латентного периода первого перехода из светлого отсека в темный может быть также результатом поведения, характерного для анксиолитиков, в результате чего животные проводят больше времени, исследуя светлую часть ТСК. Следует отметить, что вещества, влияющие на общую двигательную функцию, могут изменять выполнение тестов на тревожность, и это не будет связано с их анксиогенными или анксиолитическими свойствами. Таким образом, до тестирования нового соединения в ТСК необходимо провести изучение и анализ его влияния на двигательную активность грызунов для исключения неспецифического двигательного эффекта, способного затруднить интерпретацию результатов тестов на тревожность [30].

Таким образом, тестирование в ТСК может быть полезным для прогнозирования анксиолитической или анксиогенной активности у потенциальных лекарственных средств у мышей и крыс. Преимущества этого теста заключаются в том, что он быстрый и простой в использовании, не требует предварительного обучения животных, а также лишения их пищи или воды.

Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) – один из широко используемых методов определения тревожности у грызунов – впервые был описан в 1955 году Montgomery [40]. В отличие от других поведенческих тестов, используемых для оценки тревожных реакций, связанных с представлением агрессивных раздражителей (например, электрошок, лишение пищи/воды, громкие звуки, воздействие запаха хищника и т. д.), обычно вызывающих условную реакцию, тест ПКЛ основан на склонности грызунов к темноте и замкнутому пространству, неприязни к свету, безусловному страху высоты и открытых пространств. Этот тест является логичным дополнением к тестам ОП и ТСК. ПКЛ представляет установку с четырьмя перпендикулярно расположенными «рукавами»: два закрытых и два открытых. Закрытые «рукава» являются аналогом норы, а открытые – потенциально опасной областью. Пол «рукавов» разлинован на квадраты для определения двигательной активности. Каждое животное тестируют в течение 5 мин, поскольку исследованиями было показано, что наиболее устойчивые реакции избегания после помещения в открытые «рукава» проявляются у грызунов именно в этот промежуток времени [14, 40–43]. В начале эксперимента животное помещают в центр лабиринта, носом к открытому «рукаву» [42, 44]. Фиксируют следующие показатели: двигательную активность (вертикальную по количеству стоек и горизонтальную по количеству пересеченных квадратов во всех рукавах, включая центральную зону); время пребывания в закрытых и открытых «рукавах», количество заходов в открытые и закрытые «рукава» и выходов из них. Кроме того, регистрируют длительность нахождения в центральной зоне и время выхода из нее. Дополнительно можно проводить анализ следующих показателей: отношение числа заходов в открытые «рукава» к общему числу заходов; отношение времени нахождения в открытых «рукавах» к суммарному времени тестирования. Эти показатели могут быть особенно информативны, если в ходе эксперимента есть различия между группами по общей двигательной активности в ПКЛ [45]. В данной работе авторы предлагают также дополнительно фиксировать и количество поз с растяжкой (когда грызун неподвижен, но его тело вытянуто вперед).

Непосредственно перед началом эксперимента в лабиринт посещают животное «нулевой» группы и позволяют ему в течение 5 минут изучить установку, что необходимо для уравнивания условий тестирования (по запаховым меткам) между первым и последующими грызунами, оказавшимися в условиях лабиринта. В «нулевой» группе может быть не одно, а два животных, которых помещают в лабиринт последовательно (каждого – на 5 минут). После «нулевого» животного лабиринт протирают или моют стандартным методом (тем, который будет использоваться во время эксперимента). Для повышения точности результатов исследования рекомендуется использовать систему видеотрекинга, т. е. сначала делать видеосъемку эксперимента, а затем анализировать видеозапись с использованием компьютерной программы. При проведении экспериментов в ПКЛ следует учитывать ряд определенных условий, необходимых для получения достоверных результатов. Как и при других поведенческих методиках, все животные перед тестированием должны находиться в одинаковых условиях и проходить процедуру адаптации после их помещения в лабораторию. Имеет значение и время суток, так как на поведение крыс и мышей могут влиять циркадные ритмы и световой цикл [46, 47]. Эксперименты следует проводить в одно и то же время, тогда в организме животных поддерживаются относительно постоянные значения эндогенных концентраций кортикостерона, эстрогенов, прогестинов и андрогенов, оказывающих влияние на поведенческие характеристики в ПКЛ. В нашей лаборатории тестирование в ПКЛ проводится в одно и то же время между 11:00 и 16:00 в специальной комнате без доступа естественного света. На показатели поведения грызунов в приподнятом крестообразном лабиринте может влиять его освещение, которое следует обязательно учитывать при планировании экспериментов. В подавляющем большинстве публикаций показатели освещенности не указываются, но отмечается, что свет должен быть ярким и все участки установки, особенно открытые и закрытые «рукава», должны быть освещены одинаково [42]. Еще один важный вопрос, возникающий у исследователей – возможное количество тестирований одних и тех же животных в ПКЛ. По мнению большинства авторов, грызунов, уже участвовавших в эксперименте, мож-

но повторно тестировать на этой установке не ранее, чем через 28 суток, причем эксперимент следует проводить в другом помещении, иначе поведенческая активность в открытых «рукавах» лабиринта будет ниже, чем при первом тестировании [48, 49, 50]. При изучении влияния повторного тестирования на показатели поведения в ПКЛ было показано, что у грызунов не изменяется при повторных испытаниях такой показатель, как общее пройденное расстояние [45]. Имеются также сведения, что, хотя показатели избегания грызунами открытых «рукавов» снижаются при повторных испытаниях, дискомфорт к ним все равно остается даже при многократном тестировании [51]. Мы придерживаемся мнения, что повторное тестирование одних и тех же животных в ПКЛ следует проводить не ранее, чем через 3–4 недели после предыдущего и лишь при необходимости, поскольку исчезает фактор внезапности.

Часто возникает необходимость в последовательном тестировании одних и тех же групп животных на нескольких поведенческих установках, например при моделировании патологических состояний (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, аутизм и др.), в опытах на трансгенных животных, в процессе хронического введения препаратов. В таких случаях мы соблюдаем временные интервалы между экспериментами не менее 5–7 дней [52, 53]. Об аналогичных режимах также сообщается другими авторами [54]. Некоторые исследователи совсем не делают перерывов при тестировании одних и тех же групп животных на разных установках [51].

В настоящее время ПКЛ дает большие возможности для проведения поведенческих исследований. Примером является изучение потенциальных лекарственных препаратов с анксиолитической или анксиогенной активностью [32, 44, 48], изучение уровня тревожности при моделировании на грызунах различных психопатологических состояний, исследования на трансгенных животных [32, 53, 55]. Анализ результатов экспериментов показывает, что контрольные животные избегают выходить в открытые рукава или находятся там короткое время. Применение анксиолитиков способствует более длительному нахождению животных в открытых «рукавах», тогда как анксиогенные агенты, напротив, уменьшают этот показатель и удлиняют время пребывания в закрытых «рукавах» [54].

Перед началом проведения экспериментов на ПКЛ необходимо сначала осуществить валидизацию метода, откалибровав условия тестирования в конкретной лаборатории. С этой целью в лабораториях используют разные подходы. Наиболее оптимальным, на наш взгляд, является применение в качестве положительного контроля анксиолитика [54], при этом важно учитывать дозу, введение которой не должно вызывать выраженного угнетения двигательной активности. Мы применяем в качестве положительного контроля феназепам 0,25 мг/кг в/б в соответствии с рекомендациями www.openscience.ru.

Компоненты многофакторного поведения при состоянии тревоги невозможно уловить с использованием только одного конкретного теста, поэтому для анализа тревожного поведения необходимо использовать комплексный подход с применением методов, дополняющих друг друга.

Тест «Последовательность лучей» (ПЛ) – относительно новая разновидность ПКЛ, стандартного и общепризнанного метода исследования тревожного поведения (см. предыдущий раздел). Почему же возникла необходимость создания прототипа ПКЛ и в чем заключается отличия между этими двумя тестами?

Одной из проблем при тестировании грызунов в ПКЛ является наличие в нем так называемой центральной зоны, находящейся на пересечении открытого и закрытого «рукавов» лабиринта. Однозначным показателем тревожности считается увеличение процента времени пребывания животного в закрытых «рукавах» и, соответственно его уменьшение в открытых. Время же нахождения животного в центральной зоне интерпретировать сложнее и несмотря на то, что оно классифицируется как «принятие решений», с точки зрения тревожного поведения этот показатель является неоднозначным [56]. Установка ПЛ исключает наличие центральной зоны и состоит из серии четырех последовательных аллей с нарастающими анксиогенными свойствами. Цвет аллей меняется с черного (аллея 1) через серый (аллея 2) на белый (аллеи 3 и 4). Эта модификация разработана на основе наблюдений, согласно которым мыши предпочитают более темные области, что подтверждается тестом ТСК. Стенки аллей в ПЛ постепенно уменьшаются по высоте, в отличие от ПКЛ, где есть резкий переход между высокими стенками (закрытые рукава) и их отсутствием (открытые «рукава»). Ширина аллей, подобно высоте стенок, также уменьшается постепенно. Эти факторы способны повысить чувствительность теста и охватить более широкий диапазон тревожно-подобного поведения [56, 57]. Тестирование начинают с помещения грызуна, не участвующего в эксперименте, на несколько минут на установку, чтобы обеспечить легкий равномерный фоновый запах животного. Затем установку необходимо очистить, как и во время всего эксперимента. Протокол исследования подробно прописан в работе [56]. Тестирование осуществляется в течение 5 мин. Регистрируют латентный период захода в каждую аллею (всеми четырьмя лапами); время, проведенное в аллее 1; общее время, проведенное в каждой аллее; количество входов (как вперед, так и назад); количество болюсов и мочеиспусканий.

Признаки тревожного поведения животных в ПЛ: увеличение процента времени нахождения в аллее 1 (черного цвета), увеличение латентного периода и количество входов в аллеи 2–4. Применение анксиолитиков уменьшает время, проведенное в аллее 1 и количество входов в аллеи 2–4 [58, 59].

Исследования показывают, что иногда, в зависимости от причины развития тревожности, результаты тестирования животных в ПЛ и ПКЛ у грызунов заметно различаются [56, 59]. Таким образом, использование и ПКЛ, и ПЛ может исключить ложноположительные или ложноотрицательные результаты, поскольку эти два теста, хотя и похожи по направленности, функционально не идентичны друг другу.

Поведенческие методы для исследования процессов памяти и обучения

Использование поведенческих методов для изучения когнитивных и мнестических функций у грызунов занимает важное место в поведенческой фармакологии. Моделирование различных психопатологических состояний у лабораторных животных с последующей коррекцией когнитивных изменений служит одним из важнейших подходов в разработке лекарственных препаратов для лечения психических заболеваний, при которых нарушаются процессы памяти и способность к обучению. Эти методы также необходимы для изучения препаратов с ноотропной активностью.

Существует большое количество поведенческих методов по изучению когнитивных и мнестических функций у грызунов и подробное их описание в данном обзоре нецелесообразно, так как опубликованы десятки экспериментальных протоколов с модификациями методов в зависимости от поставленных целей и задач. В данном обзоре сделана попытка изложить общие представления об этих методах, общие принципы работы и направления их применения для конкретных исследований.

Методы для изучения процессов памяти и когнитивных функций можно разделить на две группы: с положительным подкреплением, когда животное получает вознаграждение (еда, вода, укрытие и др.) за правильно выполненную реакцию, и с отрицательным подкреплением, когда животное получает наказание (например, удар током) за неправильно выполненную реакцию.

Тесты с положительным подкреплением основаны на этологических подходах и позволяют изучать пространственную память грызунов, в формировании который принимает участие гиппокамп [60–62]. Пространственная память у грызунов обеспечивает запись информации об их среде и пространственной ориентации. Именно она позволяет грызунам перемещаться через различные типы лабиринтов, помня правильные и неправильные пути. Нарушение пространственной памяти может привести к потере ориентиров в лабиринте, причем, независимо от того, насколько успешными были предыдущие попытки. Для изучения этого вида памяти существует большое количество методов с использованием разнообразных лабиринтов. Лабиринты могут иметь разную форму, в зависимости от сложности которой, могут использоваться как при исследовании условно-рефлекторной деятельности, так и для оценки когнитивных процессов животных. Перед подопытным животным, помещенным в лабиринт, ставится задача нахождения пути к определенной цели, чаще всего пищевой приманке. В некоторых случаях целью может служить убежище или другие благоприятные условия. В исследовательских целях применяются установки Т-образный, У-образный, радиальный лабиринт, лабиринт Барнс, Е-лабиринт, а также водные лабиринты (Морриса, Т-лабиринт) (рисунок 2).

Одним из самых простых лабиринтов является Т-лабиринт, представляющий собой приподнятый или закрытый с боков горизонтальный Т-образный аппарат со стартовым (основание) и боковыми рукавами в модификациях для крыс и мышей. Метод подробно описан в работах [63, 64], а порядок тестирования в нем и его модификации представлены в протоколах экспериментальных исследований [65].

Основа тестирования заключается в том, что животное помещается в основание лабиринта и после адаптации в течение 5 мин, выбирает один из двух рукавов. Если предлагать ему лабиринт два раза подряд, на второй попытке оно выбирает другой рукав, что свидетельствует об его готовности исследовать новые раздражители окружающей среды. Этот тип исследовательского поведения, характерного для грызунов, называется «спонтанное чередование» [66, 67, 62]. Рефлекс исследования новой среды усиливается, если второй выбор подкрепляется пищей (приманкой), помещаемой в один из рукавов. В этом случае тестирование осуществляется с пищевым подкреплением, и до начала эксперимента грызун не должен получать пищи в течение 48 ч. Необходимо обратить внимание, что при тестировании с пищевым подкреплением следует подбирать пищу, которую животное будет есть с удовольствием. В наших экспериментах, несмотря на пищевую депривацию в 48 ч, грызуны были привередливы и не соблазнялись даже сыром и семечками. Мы использовали в этом случае картофельные чипсы.

Тестирование повторяют 10 раз, с интервалом 3 мин в зависимости от задачи. Регистрируются количество правильных входов в рукава с приманкой, возвращений из рукавов без приманки, повторные посещения неправильного рукава. В качестве критерия выработки рефлекса обычно считается 7–8 правильных побежек из 10. У контрольных животных ошибки памяти обычно составляют меньше 15 %. Варьируя длительность интервала, можно оценивать объем пространственной рабочей памяти. Как спонтанный, так и награждаемый выборы очень чувствительны к дисфункции гиппокампа [60–62]. Учитывая, что при развитии болезни Альцгеймера у человека нарушения процессов памяти обусловлены именно поражением гиппокампа, Т-образный лабиринт широко используется при тестировании трансгенных мышей с болезнью Альцгеймера [53, 68–70] и других поражениях гиппокампа. Он также применяется как тест система при моделировании аутизма (в этом случае отмечают стереотипность поведения, т. е., захо-

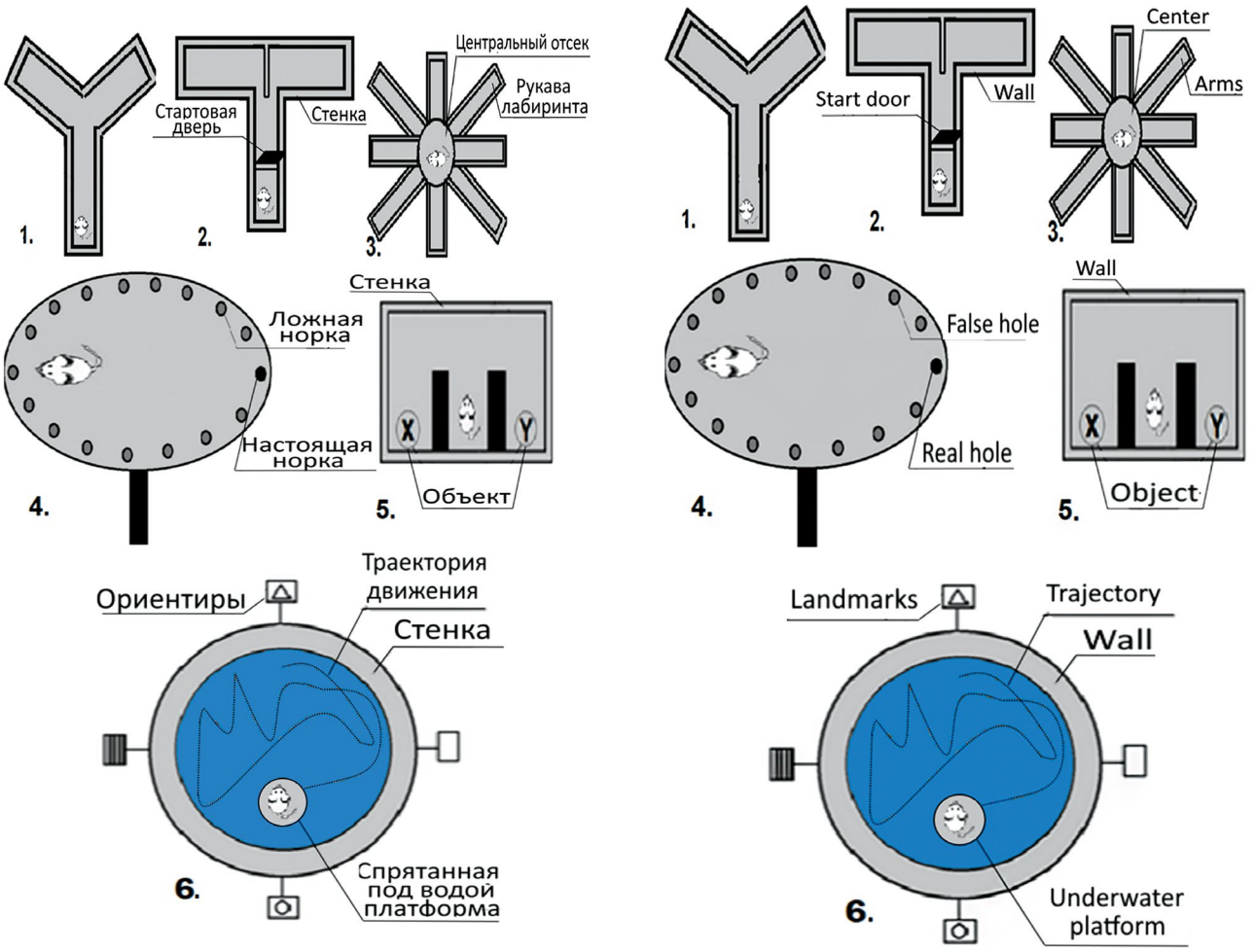


Рисунок 2. Поведенческие методы для исследования когнитивных функций.

1 – тест Y-лабиринт; 2 – тест Т-лабиринт; 3 – радиальный лабиринт; 4 – лабиринт Барнес; 5 – Е-лабиринт; 6 – водный лабиринт Морриса

Figure 2. Behavioral methods for the study of cognitive functions.

1 – test Y-maze; 2 – test T-maze; 3 – radial maze; 4 – Barnes maze; 5 – E-labyrinth; 6 – Morris water maze

ды животного в один и тот же рукав) [71, 72], а также при разработке препаратов с ноотропными свойствами [32, 73, 74].

Y-лабиринт практически является аналогом Т-лабиринта, отличия заключаются только в том, что основание этого лабиринта переходит в рукава более плавно, чем в Т-образном и длина всех рукавов одинакова. Считается, что животное в этом лабиринте адаптируется быстрее, чем в Т-образном. Эта установка позволяет так же, как и в Т-образном, исследовать пространственную и рабочую память грызунов, лежащую в основе выбора ими рукавов (спонтанного или подкрепленного пищей) и чувствительную к дисфункции септо-гиппокампальной системы. Метод описан в работе [75] с применением этого метода можно ознакомиться в работах [76, 77].

Радиальный лабиринт предназначен для изучения рабочей и референтной пространственной памяти у лабораторных животных. В радиальном лабиринте перед тестируемым животным стоит задача выбора оптимальной стратегии исследования и нахождения. Установка представляет собой шести-, восьми- или двенадцатилучевой лабиринт (количество рукавов может варьировать) с центральной площадкой, оснащенной свободно открывающимися гильотинными дверцами [78]. Существуют модификации для крыс и мышей, различающиеся длиной рукавов. В конце каждого рукава установлена кормушка для пищевого подкрепления. Удобство конструкции состоит в том, что ее легко модифицировать в зависимости от установленного протокола исследования. За 48 ч до эксперимента животное подвергают пищевой депривации. Установлено, что время обучения связано с ее длительностью. При недостаточной депривации животное хуже обучается. Существует различное количество экспериментальных протоколов, используемых для проведения данного теста. Один из вариантов заключается в том, что в конец каждого рукава помещается пища, и грызуна тренируют до тех пор, пока он не найдет все кусочки пищи. После несколь-

ких тренировочных заходов животные заходят только в те рукава, где есть подкрепление и игнорируют рукава без еды. В течение обучения у грызуна формируется пространственное представление об этом лабиринте. После процедуры обучения голодное животное сажают в центральную часть установки, откуда оно начинает заходить в рукава лабиринта в поисках еды. При повторном заходе в один и тот же рукав животное пищи там не находит, и такой вариант поведения рассматривается как ошибочный, что позволяет оценивать рабочую и референтную память [79].

Лабиринт Барнс с момента изобретения [80] обеспечил простой подход к экспериментальной оценке пространственной памяти у мелких грызунов. Преимущество метода: он в меньшей степени вызывает стресс у животных по сравнению с другими лабиринтами [81, 82]. В данном лабиринте также исследуются процессы памяти и обучения на основе пространственной навигации [78, 81, 83]. Установка имеется в модификации для крыс и мышей и состоит из платформы с двадцатью отверстиями диаметром 5 см, расположенными по ее краю. Только одно из отверстий пригодно для того, чтобы там спрятаться (норка), остальные являются ложными. Установка приподнята над полом на 105 сантиметров. В качестве раздражающего стимула используют яркий свет, сильный шум, вентилятор или непосредственный дискомфорт грызунов к открытому пространству как мотивацию для поиска укрытия [80, 84, 85]. Контрольные животные, как правило, относительно быстро находят спасательную норку, не пытаясь сбежать через ложные отверстия. Грызуны с нарушением пространственной памяти будут каждый раз спонтанно и случайно исследовать все отверстия. В качестве дополнительной мотивации можно положить в норку пищу. Для лучшей ориентации в пространстве возможно применение специальных ориентиров [82, 86]. Согласно экспериментам в нашей лаборатории, применение ориентиров (квадраты, треугольники и др.) способствует более высокой эффективности обучения.

Лабиринт Барнс используется для тестирования грызунов с моделями нарушенной памяти, трансгенных животных с болезнью Альцгеймера, а также с целью разработки препаратов, улучшающих когнитивные функции [82, 84, 87].

Е-лабиринт. С помощью Е-лабиринта можно решить несколько иные задачи по сравнению с предыдущими типами лабиринтов. Е-лабиринт предназначен для оценки контекстной памяти у грызунов и применяется в качестве модели эпизодической памяти человека, за которую отвечает гиппокамп [88, 89]. Лабиринт по форме напоминает заглавную букву Е, за что и получил свое название. Коридор соединяет три отсека, центральный (стартовый) и тестовые отсеки по одному справа и слева от него. Эксперименты проводят на крысах. Порядок и задачи тестирования памяти в Е-лабиринте подробно представлены в работе исследователей [90], попытавшихся создать одну из моделей эпизодической памяти человека, являющейся сознательным воспоминанием о прошлом событии. Модель позволяет оценить, «что», «где», либо «когда» это произошло, либо в «каком» контексте это произошло [91]. Подробнее ознакомиться с этим методом можно на сайте http://www.openscience.ru.

При проведении исследований на разных типах лабиринтов необходимо учитывать все требования к экспериментальных животным и порядок обращения с ними, аналогично таковым при исследовании на тревожность и прописанных в протоколах исследований. Необходимо учитывать, что при выполнении поведенческих тестов важное значение имеет фактор наличия запаха предыдущего животного в лабиринте, поэтому необходимо обрабатывать поверхности после каждого тестируемого грызуна. В то же время, аналогично предыдущим экспериментам, нужно помнить об эффекте абсолютной новизны, поэтому до тестирования необходимо использовать «нулевое» животное, которое не должно впоследствии участвовать в эксперименте.

Следует обратить внимание на необходимость фиксации всех тестов с использованием системы видеотрекинга и последующим анализом с использованием компьютерных программ EthoVision® XT Noldus Inc. (США), ANY-maze, Stoelting CO (США) и др., что позволяет более точно и объективно фиксировать, и оценивать все изменения в поведении.

Представленные выше установки лаабиринтов могут быть в виде водных аналогов, например, водный вариант Т-лабиринта, Е-лабиринта и др., позволяющих избежать обонятельных меток животных и сочетающих в себе преимущества сухого и водного тестов. Из водных тестов на сегодняшний день одним из наиболее широко используемых для исследования когнитивных функций служит водный лабиринт Морриса.

Водный лабиринт Морриса. Тест Морриса, известный также как водный лабиринт Морриса применяется, как и предыдущие, для исследования пространственной памяти у животных. Метод основан на том, что животное ищет кратчайший путь в бассейне с водой до спрятанной там спасательной платформы на основании предыдущих знаний в процессе обучения об ее местонахождении [92]. Ниже мы приводим один из вариантов этой методики с описанием типичной установки.

Лабиринт Морриса представляет собой круглый бассейн, заполненный водой [93]. Диаметр бассейна варьирует от 1 до 2 м, глубина – от 0,3 до 0,6 м, в зависимости от вида тестируемого животного. В центре одного из секторов бассейна на глубине 1,5–2 см под водой располагается скрытая платформа размером 10×10 см, которая в процессе обучения животных должна находиться на одном и том же месте. Воду перед началом эксперимента подкрашивают обезжиренным молочным порошком или нетоксичным

красителем, чтобы животное не видело сквозь воду установленную платформу. Во время эксперимента, как и во всех водных тестах, необходимо поддерживать постоянную температуру воды (+25…+28 °C), так как температурные перепады могут искажать достоверность полученных результатов. Для ориентации в бассейне необходим набор так называемых зрительных ориентиров, устанавливаемых вокруг бассейна [92, 93]. Эксперимент состоит из нескольких этапов в зависимости от протокола исследования. На первом этапе животное обучают около 3–5 дней. Крыс опускают в воду мордочкой к бортику в одной из четырех стартовых точек на периметре бассейна, выбранных таким образом, чтобы расстояние от них до платформы было приблизительно равным. Животному дают 3 мин на самостоятельный поиск платформы. Если в течение этого времени крыса не находит платформу, ей следует ее показать. Крысе дают посидеть на платформе в течение примерно 30 с, после чего перемещают в клетку для просушки. Каждый день очередность старта каждой крысы определяется псевдослучайно. На следующий день после окончания этапа обучения проверяют пространственную память. Для этого платформу убирают, животное несколько раз помещают в определенную точку бассейна в центре или возле стенки рядом с одним из ориентиров (эта точка должна быть постоянной для каждого животного) и в течение минуты наблюдают за его движением. Правильно обученное животное относительно быстро доплывет и будет плавать в том секторе, где находилась платформа, а при нарушениях процессов памяти будет случайно исследовать все сектора бассейна в поисках платформы.

В этом тесте обязательно наличие системы видеотрекинга с компьютерной программой, ручной вариант регистрации в данном случае не корректен. Основные параметры для регистрации: время, за которое обученная крыса доплывет до сектора, где находилась платформа, длительность нахождения в этом секторе, пройденное расстояние, скорость. Возможные дополнительные параметры: прыжки, длительность замираний на одном месте и др. Например, некоторые авторы предлагают также оценивать траектории движения животных в лабиринте [94–96]. Считается, что этот тест дает большое количество возможностей, и экспериментатор может выбирать показатели, имеющие, на его взгляд, важное значение в конкретном эксперименте.

В отличие от сухих лабиринтов, водный лабиринт Морриса, требует серьезной подготовки перед запуском, начиная от системы забора, слива воды и поддержания ее нормальной температуры, до освещения и видеорегистрации показателей при тестировании. Здесь хотелось бы обратить внимание на проблемы режима освещения и видеорегистрации, с которыми мы столкнулись в нашей лаборатории. Лампы освещения в лаборатории иногда располагаются так, что свет мешает компьютерной программе регистрировать движения животного, выдавая блики в воде от света за видимые помехи. Для избегания этого отрицательного фактора мы поместили под дном бассейна лампы инфракрасного излучения, все процедуры проводили при выключенном свете. В этом случае получалась картинка всех движений животного с четкими треками, нарисованными программой.

Метод Морриса незаменим в области психофармакологии и позволяет изучать и анализировать влияние препаратов с психотропной активностью на процессы памяти, обучения и когнитивные функции, как у нормальных животных, так и у грызунов с моделями психопатологических состояний. Водный лабиринт Морриса широко используется как тест система при моделировании болезни Альцгеймера, аутизма [97, 98], других нарушений процессов памяти и обучения [99–104].

Методы изучения социального поведения

Социальное поведение – поведение, требующее для своей реализации взаимодействия с другими представителями своего вида и включающее все виды социального взаимодействия (социальное познание, социальное предпочтение, межполовое и родительское поведение и др.). Социальное поведение может нарушаться при многих психических расстройствах и патологических состояниях, например при шизофрении, депрессии, болезни Альцгеймера, аутизме. Моделирование нарушений социального поведения и исследование подходов для его коррекции является важным направлением в области поведенческой фармакологии.

Для изучения социального поведения лабораторных животных существует значительное количество тестов, позволяющих анализировать нарушения социального взаимодействия, социального подхода и избегания, социальной тревожности и др. В данном обзоре мы рассмотрим некоторые методы, являющиеся, с одной стороны, наиболее востребованными, а с другой – не требующие сложного оборудования и отличающиеся простотой воспроизведения (рисунок 3).

Трехкамерный социальный тест [72, 105] считается общепринятым методом оценки социального поведения у крыс. Метод основан на том, что животные, как правило, предпочитают проводить больше времени с другими особями (общительность) и проявляют больший интерес к новому объекту, чем к знакомому (социальная новизна). Тест позволяет выявить грызунов с дефицитом общительности и социальной новизны. Установка представляет собой камеру (60 × 40 см) с тремя отсеками. Размер центрального отсека равен 20 × 60 см, боковых – 19,5 × 40 см. Боковые отсеки содержат два сетчатых ограждения для новых объектов. Тестирование состоит из последовательных трех 10-минутных сессий. Во время первой сессии исследуемое животное помещают в центр установки для адаптации, после чего убирают на время обработки камер, которую следует

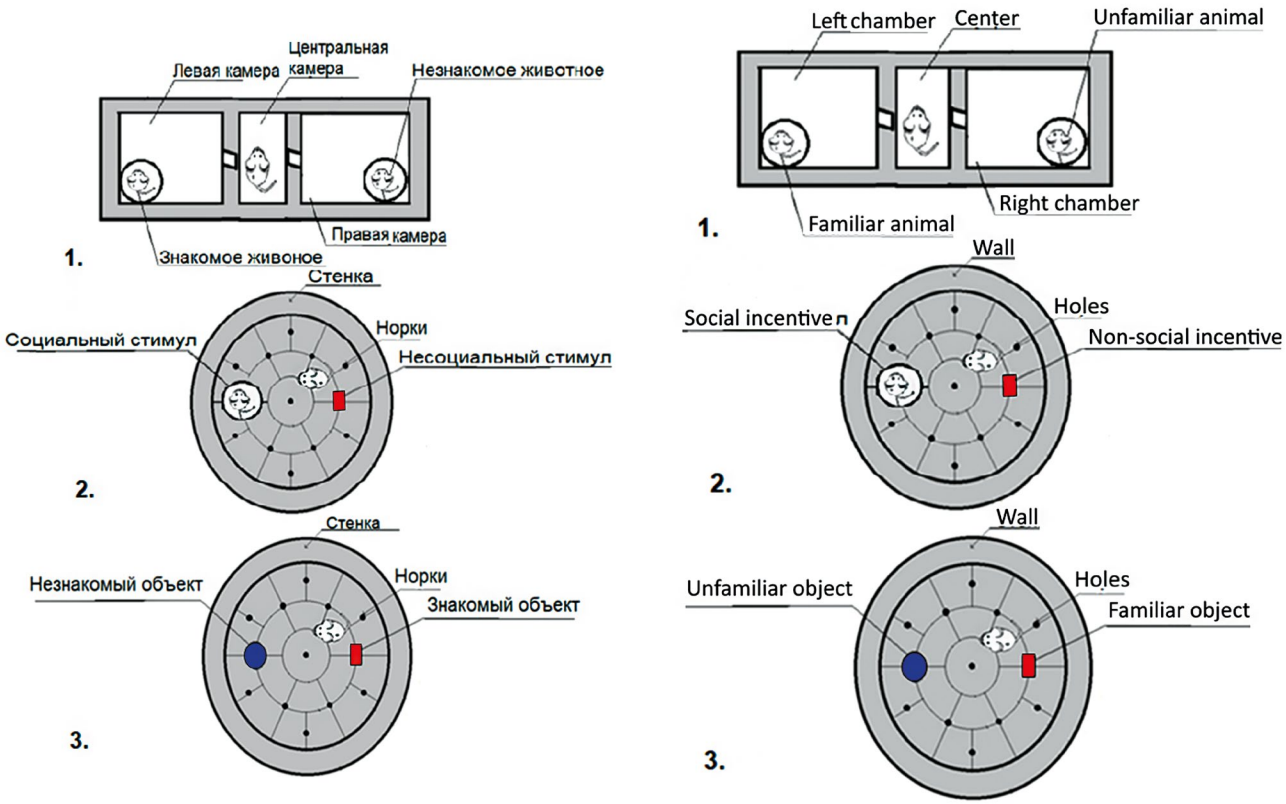


Рисунок 3. Поведенческие методы для исследования социального поведения.

1 – метод «Социальное взаимодействие»; 2 – тест «Открытое поле» расширенный; 3 – тест «Распознавание объекта»

Figure 3. Behavioral methods for the study of social behavior.

1 – method "Social interaction"; 2 – extended open field test; 3 – test "Object recognition"

проводить тщательно между испытаниями. Затем в один из боковых отсеков помещают «стимул» (незнакомую для исследуемой крысы особь того же пола), а в центральный высаживают исследуемое животное. С этого момента начинается вторая сессия, в ходе которой «стимул» становится знакомым животным. По окончании второй сессии испытуемую крысу вновь отсаживают, камеру обрабатывают, затем в противоположный боковой отсек помещают новый «стимул», а в центральный – тестируемое животное, то есть в третьей сессии оно находится в камере со знакомым грызуном и незнакомым. Во второй и третьей сессии необходимо осуществлять видеорегистрацию поведения. Стоит отметить, что «стимулы» следует помещать в камеру в закрытых пластиковых контейнерах с отверстиями, не позволяющими проявлять агрессию к исследуемому животному, но стимулирующие социальный интерес. Регистрируют время, проведенное крысой со знакомым и незнакомым животным, количество входов в отсеки, что отражает уровень интереса к объекту. Незнакомых животных берут из разных клеток, до тестирования они не находились в физическом контакте с объектом исследования. При нарушении социального поведения сокращается время контакта с незнакомым животным и, соответственно, увеличивается длительность контакта со знакомым.

Трехкамерный социальный тест считается приоритетным при исследовании социального поведения животных на моделях аутизма [71, 101, 106–108], также применяется при оценке изменений поведения, например, после стресса [109]. Использование этого теста возможно и на других моделях психопатологических состояний, например, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона с последующей коррекцией этих нарушений изучаемыми лекарственными препаратами.

Тест «Открытое поле» расширенный применяется для оценки интереса к новому неодушевленному (несоциальному) и социальному объектам [72, 110]. Тестирование состоит из последовательных трех 10-минутных сессий. Крыса делает предпочтения между социальным и несоциальным объектами. В первой сессии испытуемое животное помещают на арену на 10 мин для адаптации (исследование нового пространства, привыкание к полю перед второй сессией). В второй сессии (интерес к новому неодушевленному предмету) в центре поля располагают новый для животного неодушевленный объект (металлическую клетку или иной неодушевленный предмет) и вновь помещают животное на 10 мин. В третьей сес-

сии (интерес к новому социальному объекту) в центр арены помещают незнакомую особь того же пола и веса, что и исследуемое животное, заключенную в металлическую клетку, и вновь помещают животное на 10 мин. Перерыв между сессиями 3–10 мин в зависимости от поставленных задач. В каждой из трех сессий оценивают время, проведенное животным в центре и на периферии, число входов в зоны, количество вертикальных стоек.

Тест распознавания нового объекта. В этом тесте, отличие от предыдущего, оба объекта являются несоциальными, поэтому его нельзя назвать социальным, но он характеризует предпочтение новизны, которое изменяется при нарушении социального поведения. Тест состоит из трех сессий. В первую сессию крысу помещают в установку на 10 мин (сеанс привыкания). После привыкания животное убирают, а на арену выставляют два одинаковых неодушевленных предмета (объемные фигуры определенного цвета). Во вторую сессию крысу возвращают в установку к несоциальным объектам и в течение следующих 10 мин регистрируют ее поведение. Затем один из объектов меняют на другой новый, другого цвета и другой формы. Тестируемое животное вновь запускают в установку на 10 мин (третья сессия). Регистрируют время изучения животным каждого из несоциальных объектов, нового (незнакомого) и старого (знакомого). Средний временной интервал между сессиями составляет в среднем 2–3 мин.

При выполнении перечисленных двух тестов необходима видеорегистрация, позволяющая более точную оценку малейших изменений в поведении животных.

Тесты распознавания нового объекта и «Открытое поле» расширенный также могут быть применены при моделировании расстройств аутистического спектра и других психопатологических состояний у крыс и мышей.

Следует подчеркнуть, что при изучении социального поведения необходимо использование нескольких тестов, характеризующих разные типы взаимодействий. Кроме того, следует учитывать, что на инициацию и интенсивность социальных взаимодействий оказывает влияние уровень тревожности: чем выше тревожность, тем более выраженными будут нарушения социального поведения. Поэтому важным дополнением будет исследование показателей тревожности, которые обычно осуществляются в приподнятом крестообразном лабиринте.

Тест «Закапывание шариков» [111, 112] не совсем относится к социальным, но служит простым и информативным методом оценки обсессивно-компульсивного расстройства грызунов, связанного с навязчивыми идеями и действиями. Процесс закапывания – это обычная поведенческая привычка у грызунов, однако аберрантное закапывание может представлять собой неофобное (боязнь новых или странных предметов) [65] и компульсивное (чрезмерное выполнение каких-то действий) поведение [113]. Тест основан на том, что грызуны используют подстилку в клетке, чтобы закопать источники дискомфорта в своем окружении. В качестве источника дискомфорта обычно используют стеклянные шарики диаметром 1 см, которые в количестве 20 штук плотно укладывают на слой подстилки толщиной 3 см в случайном порядке. Животное помещают на 30 минут в подготовленную клетку с шариками, затем аккуратно извлекают и подсчитывают количество шариков, закопанных более чем на 2/3, что отражает уровень стереотипного поведения животного, т. е., чем больше их закопано по сравнению с контрольными животными, тем сильнее выражена стереотипность. Для выполнения эксперимента мы не переносим животных в лабораторию, а тестируем их непосредственно в виварии, в привычной для них обстановке.

Тест нашел широкое применение для изучения выраженности стереотипного поведения грызунов при моделировании аутизма [72, 111–115], как модель обсессивно-компульсивного расстройства и разработки его лекарственной коррекции [116].

Поведенческие методы в комплексе с фармакологическими анализаторами

В заключение необходимо остановиться на поведенческих методиках, которые проводятся с использованием известных фармакологических анализаторов. Классической моделью является каталепсия [117, 118]. Каталепсия – это способность животного удерживать приданную ему позу и является одним из проявлений побочных эффектов нейролептиков. Чаще всего состояние каталепсии модулируют с использованием галоперидола и трифтазина.

Галоперидол является типичным нейролептиком – производным бутирофенона. Действие его наступает быстро и продолжается длительное время. Наиболее частым побочным эффектом галоперидола являются экстрапирамидные расстройства. Чаще всего каталепсию вызывают внутрибрюшинным введением галоперидола крысам в дозе 1 мг/кг.

Для изучения каталептогенного действия применяют широкий спектр тестов, позволяющих оценить способность животного сохранять неестественную для них позу [117]. Наиболее часто используют положение в виде «позы лектора», где передние лапы животного помещают на горизонтальную перекладину на высоте 10 см и регистрируют время сохранения этой неестественной позы в течение 60 или 120 сек. на 30, 60, 120 и 180 мин наблюдений [118].

В другом варианте, по Morpurgo [119], регистрируется удержание лап на ступеньках высотой 3 см и 10 см (тест «лестница») и удержание животного на параллельных стенках. В тесте «лестница» оценивается способность крысы в течение 10 сек. не возвращать в исходное положение лапу, поднятую на ступеньку. Глубина каталепсии оценивается по 6-балльной системе:

1) только одна из передних лап остается на нижней ступеньке;
2) последовательно обе лапы остаются на нижней ступеньке;
3) только одна из передних лап остается на верхней ступеньке;
4) последовательно обе лапы остаются на верхней ступеньке.

Изменение степени каталептогенного действия галоперидола может быть использовано при изучении потенциальных антидепрессантов, средств для лечения болезни Паркинсона. В этом случае, обладая необходимой эффективностью, исследуемые соединения должны уменьшать выраженность каталептогенного действия галоперидола.

В последнее время галоперидол привлекает внимание как инструмент для изучения систем доставки лекарств в организме, а его каталепогенное действие является удобной и прогностически значимой моделью для разработки и тестирования носителей для интраназальной доставки потенциальных лекарственных средств в мозг [120]. Нами было показано, то интраназальное введение субстанции галоперидола развивается почти на уровне внутрибрюшинного и применение его в комплексе с микро- или наноструктурированными носителями может замедлять или ускорять развитие каталепсии, изменять ее длительность и интенсивность при анализе на разных сроках наблюдения [121].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные исследования с применением поведенческих методов – сложный процесс, требующий тщательной подготовки экспериментов и соблюдения ряда требований. Прежде всего, соответствие исследований этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных в рамках Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и Методическим рекомендациям по содержанию лабораторных животных в виварииях научно-исследовательских институтов и учебных заведений РД-АПК 3.10.07.02-09 (утв. Министерством сельского хозяйства РФ 1 декабря 2009 г.).

Для получения достоверных и информативных результатов каждое тестирование следует проводить по протоколу опыта, на сертифицированном оборудовании, с соблюдением всех условий от подготовки экспериментальных животных с учетом их генетических линий, условий содержания, температурно-светового режима в лаборатории до квалифицированной интерпретации полученных результатов. И даже в этом случае при проведении поведенческих исследований необходимы терпение, иногда их повторение и профессиональный анализ. Поведенческие методы имеют важнейшее значение при изучении потенциальных психотропных средств. Имеется широкий выбор методов и тестов в области поведенческой фармакологии, позволяющих получить информацию о фармакодинамике, эффективности, особенностях, оптимальном режиме дозирования исследуемых препаратов. Для выявления каждого вида активности необходимо одновременное использование нескольких тестов, как функционально неидентичных, так и дополняющих или подтверждающих друг друга.

Фармакология поведения диктует необходимость тесного взаимодействия доклинических и клинических этапов исследований в рамках развития трансляционной медицины и разработки подходов, доказательно подтверждающих воспроизводимость полученных результатов при клинических испытаниях.

Необходимы также усовершенствование существующих и разработка новых поведенческих моделей психических расстройств, поиск новых путей к изучению механизмов формирования нарушений поведения, в том числе с применением молекулярно-генетических подходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. You R., Liu Y., Chang R. C. C. A behavioral test battery for the repeated assessment of motor skills, mood, and cognition in mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2019;(145):e58973. DOI: 10.3791/58973.
2. Беспалов А. Ю., Звартау Э. Э., Бирдсли П., Катц. Д. Ж. Фармакология поведения. Хрестоматия.СПб.: СПбГМУ; 2013. 466 с.
3. Hock F. J. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological assays. Berlin: Springer. 2015; 306 p. DOI: 10.1007/978-3-319-05392-9.
4. Rodgers R. J., Cao B. J., Dalvi A., Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997;30:289–304. DOI: 10.1590/s0100-879x1997000300002.
5. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M., Bernatova I., Determination of motor activity and anxiety related behavior in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013;6(3):126–135. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.
6. Hall C., Ballachey E. L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*. 1932;6:1–12. DOI: 10.1007/978-1-60761-303-9_1.
7. Broadhurst P. L. Psychogenetics of emotionality in the rat. *NYASA*. 1969;159(3):806–824. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1969.tb12980.x.
8. Henry B. L. Minassian A., Young J. W., Paulus M. P., Geyer M. A., Perry W. Cross–species assessments of motor and exploratory behavior related to bipolar disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2010;34(8):1296–1306. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.002.
9. Aitken P., Zheng Y., Smith P. F. Ethovision™ analysis of open field behaviour in rats following bilateral vestibular loss. *Journal of Vestibular Research*. 2017;27(2-3):89–101. DOI:10.3233/ves-170612.
10. Zamani M., Budde T., Bozorgi H. Intracerebroventricular administration of N-type calcium channel blocker ziconotide displays anticonvulsant, anxiolytic, and sedative effects in rats: A preclinical and pilot study. *Epilepsy & Behavior*. 2020;111:107251. DOI: 10.1016/j.yebeh.2020.107251.
11. Berton O. Ramos A., Chaouloff F., Mormede P. Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains. *Behavioral Genetics*. 1997;27:155–166. DOI: 10.1023/A:1025641509809.
12. Krishna S., Dodd C. A., Hekmatyar S. K., Filipov N. M. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. *Archives of Toxicology*. 2014;88(1):47–64. DOI: 10.1007/s00204-013-1088-3.
13. Martin–Arenas F. J., Pintado C.O. Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice. *Proceeding of Measuring Behavior*. 2014;322–326. DOI: 10.13140/RG.2.2.29920.74247.

14. Ковалев Г. И., Васильева Е. В., Салимов Р. М. Сравнение поведения мышей в тестах открытого поля, закрытого и приподнятого крестообразного лабиринтов с помощью факторного анализа. Журнал высшей нервной деятельности им И. П. Павлова. 2019;69(1):123–130. DOI: 10.1134/S0044467719010064.
15. Ramos A., Correia E. C., Izídio G. S., Brüske G. R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics*. 2003;33:657–668. DOI: 10.1023/A:1026131130686.
16. Абдурасулова И. Н., Екимова И. В., Чернышев М. В., Мацулевич А. В., Пастухов Ю. Ф. Нарушение когнитивных функций у крыс Вистар в модели доклинической стадии болезни Паркинсона. *Журнал высшей нервной деятельности им И. П Павлова*. 2019;69(3):364–381. DOI: 10.1134/S0044467719030031.
17. Пашина И. П., Семина И. И., Сидуллина С. А., Тарасова Р. И., Газизов М. Б., Мустафин Р. И. Синтез и психотропная активность гидразидов арилгидроксифосфорилуксусных кислот и их солей. *Химико-фармацевтический журнал*. 2013;47(8):19–22. DOI: 10.30906/0023-1134-2013-47-8-19-22.
18. Swiergiel A. H., Dunn A. J. Effects of interleukin–1β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the evaluated plus–maze and open field tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2007;86:651–659. DOI: 10.1016/j.pbb.2007.02.010.
19. Schiller G. D., Daws L. C., Overstreet D. H., Orbach J. Lack of anxiety in an animal model of depression with cholinergic supersensitivity. *Brain Research Bulletin*. 1991;26:433–435. DOI: 10.1016/0361-9230(91)90019-G.
20. Никитин Д. О., Никитина А. В., Семина И. И., Байчурина А. З., Садыкова Р. Г., Овчинникова А. Г., Крутов И. А., Габдрахманова Д. Ф., Бурангулова Р. Н., Гаврилова Е. Л. К вопросу о психотропных свойствах новых производных фосфорилацетогидразидов – солей арилфосфиновых кислот. *Современные проблемы науки и образования*. 2019;3:107–107.
21. van Erp. A. M., Kruk M. R., Meelis W., Willekens–Bramer D. C. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self–grooming in the rat: handing, social contact, defeat, novelty, restrain and fut moistening. *Behavioural Brain Research*. 1994;65(1):47–55. DOI: 10.1016/0166-4328(94)90072-8.
22. Weiss I. C., Pryce C. R., Jonger–Relo A. L., Nanz–Bahr N. I., Feldon J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2004;152(2):279–295. DOI: 10.1016/j.bbr.2003.10.015.
23. Mach M., Grubbs R. D., Price W. A., Nagaoka M., Dubovický M., Lucot J. B. Delayed behavioral and endocrine effects of sarin and stress exposure in mice. *Journal of Applied Toxicology*. 2008;28(2):132–139. DOI: 10.1002/jat.1258.
24. Talarovičová A., Kršková L., Blažeková J. Testosterone enhancement during pregnancy influences the 2D: 4D ratio and open field motor activity of rat siblings in adulthood. *Hormones and Behavior*. 2009;55(1):235–239. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2008.10.010.
25. Ramos A., Berton O., Mormede P., Chaouloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioral Brain Research*. 1997;85(1):57–69. DOI: 10.1016/s0166-4328(96)00164-7.
26. McCormick C. M., Robarts D., Kopeikina K., Kelsey J. E. Long-lasting, sex-and age-specific effects of social stressors on corticosterone responses to restraint and on locomotor responses to psychostimulants in rats. *Hormones and Behavior*. 2005;48(1):64–74. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2005.01.008.
27. Bernatova I., Puzserova A., Dubovicky M. Sex differences in social stress-induced pressor and behavioral responses in normotensive and prehypertensive rats. *General Physiology and Biophysics*. 2010;29(4):346–354. DOI: 10.4149/gpb_2010_04_346.
28. Rasmussen S., Miller M. M., Filipski S. B., Tolwani R. J. Cage change influences serum corticosterone and anxiety-like behaviors in the mouse. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011;50(4):479–483.
29. Pritchard L. M., Van Kempen T. A., Zimmerberg B. Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. *Neuroscience Letters*. 2013;536:47–51. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.048.
30. Pitsikas N., Georgiadou G., Delis F., Antoniou K. Effects of Anesthetic Ketamine on Anxiety-Like Behaviour in Rats. *Neurochemical Research*. 2019;44(4):829–838. DOI: 10.1007/s11064-018-02715-y.
31. Ковалев Г. И., Фирстова Ю. Ю., Салимов Р. М. Влияние пирацетама и ацефена на NMDA и никотиновые рецепторы мозга мышей с различной эффективностью исследовательского поведения в крестообразном лабиринте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008;71(1):12–17. DOI: 10.30906/0869-2092-2008-71-1-12-17.
32. Воронина Т. А., Островская Р. У., Гарибова Т. Л. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Гриф и К; 2012. 264–275 с.
33. Crawley J., Goodwin F. K., Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1980;13(2):167–170. DOI: 10.1016/0091-3057(80)90067-2.
34. Ramos A., Mormede P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1998;22:33–57. DOI: 10.1016/S0149-7634 (97)00001-8.
35. Bourin M., Hascoët M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463(1–3):55–65. DOI: 10.1016/s0014-2999(03)01274-3.
36. Crawley J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1981;15(5):695–699. DOI: 10.1016/0091-3057(81)90007-1.
37. Salim S., Asghar M., Chugh G., Taneja M., Xia Z., Saha K., Oxidative stress: a potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. *Brain Research*. 2010;1359:178–185. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.08.093.
38. Aguilar B. L., Malkova L., N'Gouemo P., Forcelli P. A. Genetically epilepsy-prone rats display anxiety-like behaviors and neuropsychiatric comorbidities of epilepsy. *Frontiers in Neurology*. 2018;9:1–15. DOI: 10.3389/fneur.2018.00476.
39. Costall B., Jones B. J., Kelly M. E., Naylor R. J., Tomkins D. M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1989;32(3):777–758. DOI: 10.1016/0091-3057(89)90033-6.
40. Montgomery K. C., The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1955;48(4):254–260. DOI: 10.1037/h0043788.
41. Gonzales L. E., File S. E. A five minute experience in the evaluated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17(4):1505–1511. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-04-01505.1997.
42. Walf A. A., Frye C. A. The use of the evaluated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
43. Forcelli P. A., Turner J. R., Lee B. G., Olson T. T., Xie T., Xiao Y., Kellar K. J. Anxiolytic-and antidepressant-like effects of the methadone metabolite 2-ethyl-5-methyl-3, 3-diphenyl-1-pyrroline (EMDP). *Neuropharmacology*. 2016;101:46–56. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.012.
44. Ari C., D'Agostinio D. P., Diamond D. M., Kindy M., Park C., Kovacs Z., Elevated plus maze test combined with video tracking software to investigate the anxiolytic effect of exogenous ketogenic supplements. *Journal of Visualized Experiments*. 2019;143:1–10. DOI: 10.3791/58396.
45. Schrader A. J., Taylor R. M., Lowery-Gionta E. G., Moore N. L. Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking within-subjects behavioral performance in rats (Rattus norvegicus). *PLoS One*. 2018;13(11):e0207804. DOI: 10.1371/journal.pone.0207804.
46. Andrade M. M. M., Tomé M. F., Santiago E. S., Lúcia-Santos A., de Andrade T. G. C. S. Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*. 2003;78(1):125–133. DOI: 10.1016/s0031-9384(02)00941-1.
47. Carobrez A. P., Bertoglio L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the ebaluated plus-maze model 20 years. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005;29(8):1193–1205. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.04.017.
48. Treit D., Menard J., Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993;44(2):463–469. DOI: 10.1016/0091-3057(93)90492-c.

49. Bertoglio L. J., Carobrez A. P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the evaluated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behavioural Brain Research*. 2002;132(2):135–143. DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00396-5.
50. Adamec R., Strasser K., Blundell J., Burton P., McKay D. W. Protein synthesis and the mechanisms of lasting change in anxiety induced by severe stress. *Behavioural Brain Research*. 2006;167(2):270–286. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.09.019.
51. Tucker L. B., McCabe J. T. Behavior of male and female C57BL/6J mice is more consistent with repeated trails in the elevated zero maze than in the evaluated plus maze. *Frontiers in journals behavioral neuroscience*. 2017;11. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00013.
52. Шиловская Е. В., Семина И. И., Тарасова Р. И., Байчурина А. З., Пашина И. П., Воскресенская О. В., Гараев Р. С., Фаттахов Ш. А., Газизов М. Б. Компьютерный прогноз, синтез и психотропные свойства гидразиниевых солей фосфорилацетогидразидов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2013;47(4):26–29. DOI: 10.30906/0023-1134-2013-47-4-26-29.
53. Семина И. И., Байчурина А. З., Макарова Е. А., Леушина А. В., Казакевич Ж. В., Габдрахманова М. Р., Мухамедьяров М. А., Зефиров А. Л. Динамика развития поведенческих нарушений у трансгенных мышей с моделью болезни Альцхаймера. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014;158(11):568–571. DOI: 10.1007/s10517-015-2821-0.
54. Herbst L. S., Gaigher T., Siqueira A. A., Joca S. R. L., Sampaio K. N., Beijamini V. New evidence for refinement of anesthetic choice in procedures preceding the forced swimming test and the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*. 2019;368:111897. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.04.011.
55. Oguchi-Katayama A., Monma A., Sekino Y., Moriguchi T., Sato K. Comparative gene expression analysis of the amygdala in autistic rat models produced by pre-and post-natal exposures to valproic acid. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2013;38(3):391–402. DOI: 10.2131/jts.38.391.
56. Deacon R. M. The successive alleys test of anxiety in mice and rats. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;76. DOI: 10.3791/2705.
57. Lahmann C., Clark R. H., Iberl M., Ashcroft F. M. A mutation causing increased KATP channel activity leads to reduced anxiety in mice. *Physiology & Behavior*. 2014;129:79–84. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.02.031.
58. Sakaguchi Y., Sakurai Y. Left–right functional asymmetry of ventral hippocampus depends on aversiveness of situations. *Behavioural Brain Research*. 2017;325:25–33. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.02.028.
59. Ewin S. E., Morgan J. W., Niere F., McMullen N. P., Barth S. H., Almonte A. G., Weiner J. L. Chronic intermittent ethanol exposure selectively increases synaptic excitability in the ventral domain of the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2019;398:144–157. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.028.
60. Olton D. S., Becker J. T. Handelmann G. E. Hippocampus, space and memory. *Behavioral and Brain Sciences*. 1979;2(3):313–322. DOI: 10.1017/S0140525X00062713.
61. Rawlins J. N. P., Olton D. S. The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behavioural Brain Research*. 1982;5(4):331–358. DOI: 10.1016/0166-4328(82)90039-0.
62. Lalon R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2002;26(1):91–104. DOI: 10.1016/s0149-7634(01)00041-0.
63. Deacon R. M., Bannerman D. M., Kirby B. P., Croucher A., Rawlins J. N. P. Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behavioural Brain Research*. 2002;133(1):57–68. DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00451-x.
64. Deacon R. M. J., Penny C., Rawlins J. N. P. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behavioural Brain Research*. 2003;139(1–2):139–155. DOI: 10.1016/s0166-4328(02)00225-5.
65. Deacon R. M. J. Digging and marble burying mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols*. 2006;1(1):122–124. DOI: 10.1038/nprot.2006.20
66. Dember W. N., Fowler H. Spontaneous alternation behavior. *Psychological Bulletin*. 1958;55(6):412–428. DOI: 10.1037/h0045446.
67. Asin K. E., Fibiger H. C. Spontaneous and delayed spatial alteration following damage to specific neuronal elements within the nucleus medianus raphe. *Behavioural Brain Research*. 1984;13(3):241–250. DOI: 10.1016/0166-4328(84)90166-9.
68. Duff K., Suleman F. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: how useful have they been for therapeutic development? Brief. *Functional genomics*. 2004;3(1):47–59. DOI: 10.1093/bfgp/3.1.47.
69. Hsiao K., Borchelt D. R., Olson K., Johannsdottir R., Kitt C., Yunis W., Xu S., Eckman C., Younkin S., Price D., Iadecola C., Clark H. B., Carlson G. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB-Nmice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*. 1995;15(5):1203–1218. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90107-8.
70. Demas G. E., Nelson R. J., Krueger B. K., Yarowsky P. J. Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behavioural Brain Research*. 1996;82(1):85–92. DOI: 10.1016/s0166-4328(97)81111-4.
71. Campolongo M., Kazlauskas N., Falasco G., Urrutia L., Salgueiro N., Höcht C., Depino A. M. Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Molecular Autism*. 2018;9(1):1–17. DOI: 10.1186/s13229-018-0221-9.
72. Семенова А. А., Лопатина О. Л., Салмина А. Б. Модели аутизма и методики оценки аутистически-подобного поведения у животных. *Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова*. 2020;70(2):147–162. DOI: 10.31857/S0044467720020112.
73. Van Dam D., De Deyn P. P. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006;5(11):956–970. DOI: 10.1038/nrd2075.
74. Bali Z. K., Inkeller J., Csurgyók R., Bruszt N., Horváth H., Hernádi I. Differential effects of α7 nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behavioural Brain Research*. 2015;278:404–410. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.10.030.
75. Hidaka N., Suemaru K., Takechi K., Li B., Araki H. Inhibitory effects of valproate on impairment of Y-maze alternation behavior induced by repeated electroconvulsive seizures and c-Fos protein levels in rat brains. *Acta medica Okayama*. 2011;65(4):269–277. DOI: 10.18926/AMO/46853.
76. Magen I., Fleming S. M., Zhu C., Garcia E. C., Cardiff K. M., Dinh D., David Jentsch J. Cognitive deficits in a mouse model of premanifest Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*. 2012;35(6):870–882. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08012.x.
77. Плаксина Д. В., Екимова И. В. Возрастные особенности альфа-синуклеиновой патологии в головном мозге при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2018;104(6):709–716. DOI: 10.7868/S086981391806014X.
78. Lieberwirth C., Pan Y., Liu Y., Zhang Z., Wang Z. Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Research*. 2016;1644:127–140. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.05.015.
79. Горина Я. В., Лопатина О. Л., Комлева Ю. К., Иптышев А. М., Польников А. М., Салмина А. Б. Восьмирукавный радиальный лабиринт как инструмент для оценки пространственного обучения и памяти у мышей. *Сибирское медицинское обозрение*. 2016;5(101):46–52.
80. Barnes C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative Physiology*. 1979;93(1):74–104. DOI: 10.1037/h0077579.
81. O'Leary T. P., Brown R. E. Optimization of apparatus design and behavioral measures for the assessment of visuo-spatial learning and memory of mice on the Barnes maze. *Learning & Memory*. 2013;20(2):85–96. DOI: 10.1101/lm.028076.112.
82. Uriarte M., Ogundele O. M., Pardo J. Long-lasting training in the Barnes maze prompts hippocampal spinogenesis and habituation in rats. *NeuroReport*. 2017;28(6):307–312. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000755.
83. Yamada M., Sakurai Y. An observational learning task using Barnes maze in rats. *Cognitive Neurodynamics*. 2018;12(5):519–523. DOI: 10.1007/s11571-018-9493-1.
84. Morel G. R., Andersen T., Pardo J., Zuccolilli G. O., Cambiaggi V. L., Hereñú C. B., Goya R. G. Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats. *Neuroscience*. 2015;303:189–199. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.050.

85. Tan H. M., Wills T. J., Cacucci F. The development of spatial and memory circuits in the rat. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*. 2016;125:159–167. DOI: 10.1002/wcs.1424.
86. Rosenfeld C. S., Ferguson S. A. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;84. DOI: 10.3791/51194.
87. Gawel K., Labuz K., Gibula-Bruzda E., Jenda M., Marszalek-Grabska M., Filarowska J., Kotlinska, J. H. Cholinesterase inhibitors, donepezil and rivastigmine, attenuate spatial memory and cognitive flexibility impairment induced by acute ethanol in the Barnes maze task in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2016;389(10):1059–1071. DOI: 10.1007/s00210-016-1269-8.
88. Vargha-Khadem F. Differential Effects of Early Hippocampal Pathology on Episodic and Semantic Memory. *Science*. 1997;277(5324):376–380. DOI: 10.1126/science.277.5324.376.
89. Aggleton J. P., Brown M. W. Episodic memory, amnesia and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behavioral and Brain Sciences*.1999; 22(3): 425-444. DOI: 10.1017/S0140525X99002034
90. Eacott M. J., Easton A., Zinkivskay A. Recollection in an episodic-like memory task in the rat. *Learning & Memory*. 2005;12(3):221–223. DOI: 10.1101/lm.92505.
91. Fortin N. J., Wright S. P., Eichenbaum H. Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature*. 2004;431(7005):188–191. DOI: 10.1038/nature02853.
92. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1984;11(1):47–60. DOI: 10.1016/0165-0270(84)90007-4.
93. Vorhees C. V. Williams M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*. 2006;1(2):848–858. DOI: 10.1038/nprot.2006.116.
94. Leggio M. G., Graziano A., Mandolesi L., Molinari M., Neri P., Petrosini L. A new paradigm to analyze observational learning in rats. *Brain research protocols*. 2003;12(2):83–90. DOI: 10.1016/j.brainresprot.2003.08.001.
95. Gehring T. V., Luksys G., Sandi C., Vasilaki E. detailed classification of swimming path in the Morris Water Maze: multiple strategies within one trial. *Scientific Reports*. 2015;5:14562. DOI: 10.1038/srep14562.
96. Левина А. С., Захаров Г. А., Ширяева Н. В., Вайдо А. И. Сравнительная характеристика поведения крыс двух линий, различающихся по порогу возбудимости нервной системы, в модели пространственного обучения в водном лабиринте Морриса. *Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова*. 2018;68(3):366–377. DOI: 10.7868/S0044467718030097
97. Zhang L., Fang Y., Cheng X., Lian Y., Xu H., Zeng Z., Zhu H. TRPML1 participates in the progression of Alzheimer's disease by regulating the PPARγ/AMPK/Mtor signalling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(6):2446–2456. DOI: 10.1159/000484449.
98. Jaramillo T. C., Speed H. E., Xuan Z., Reimers J. M., Escamilla C. O., Weaver T. P., Powell C. M. Novel Shank3 mutant exhibits behaviors with face validity for autism and altered striatal and hippocampal function. *Autism Research*. 2017;10(1):42–65. DOI: 10.1002/aur.1664.
99. Svenson M., Hallin T., Broms J., Ekstrand J., Tingström A. Spatial memory impairment in Morris water maze after electroconvulsive seizures. *Acta Neuropsychiatrica*. 2016;29(01):17–26. DOI: 10.1017/neu.2016.22.
100. Laczó J., Markova H., Lobellova V., Gazova I., Parizkova M., Cerman J., Windisch M. Scopolamine disrupts place navigation in rats and humans: a translational validation of the Hidden Goal Task in the Morris water maze and a real maze for humans. *Journal of Psychopharmacology*. 2017;234(4):535–547. DOI: 10.1007/s00213-016-4488-2.
101. Liu Q., Shi J., Lin R., Wen T. Dopamine and dopamine receptor D1 associated with decreased social interaction. *Behavioural Brain Research*. 2017;324:51–57. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.01.045.
102. Ahmadi M., Rajaei Z., Hadjzadeh M. A., Nemati H., Hosseini M. Crocin improves spatial learning and memory deficits in the Morris water maze via attenuating cortical oxidative damage in diabetic rats. *Neuroscience Letters*. 2017;642:1–6. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.01.049.
103. de la Tremblaye P. B., Wellcome J. L., de Witt B. W., Cheng J. P., Skidmore E. R., Bondi C. O., Kline A. E. Rehabilitative success after brain trauma by augmenting a subtherapeutic dose of environmental enrichment with Galantamine. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2017;31(10–11):977–985. DOI: 10.1177/1545968317739999.
104. Alcalá J. A., Callejas-Aguilera J. E., Nelson J. B., Rosas J. M. Reversal training facilitates acquisition of new learning in a Morris water maze. *Learning & Behavior*. 2019;48:208–220. DOI: 10.3758/s13420-019-00392-7.
105. Cho H., Kim C. H., Knight E. Q., Oh H. W., Park B., Kim D. G., Park H.-J. Changes in brain metabolic connectivity underlie autistic-like social deficits in a rat model of autism spectrum disorder. *Scientific Reports*. 2017;7(1):13213. DOI: 10.1038/s41598-017-13642-3.
106. Fortunato J. J., da Rosa N., Laurentino A. O. M., Goulart M., Michalak C., Borges L. P., da Cruz Cittadin Soares E., Reis P. A., de Castro Faria Neto H. C., Petronilho F. Effects of ω-3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccarides. *Nutrition*. 2017;35:119–127. DOI: 10.1016/j.nut.2016.10.019.
107. Tickerhoof M. C., Hale L. H., Butler M. J., Smith A. S. Regulation of defeat-induced social avoidance by medial amygdala DRD1 in male and female prairie voles. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;113:104542. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2019.104542.
108. Homberg J. R., Olivier J. D. A., VandenBroeke M., Youn J., Ellenbroe A. K., Karel P., Shan L., van Boxtel R., Ooms S., Balemans M., Langedijk J., Muller M., Vriend G., Cools A. R., Cuppen E., Ellenbroek B. A. The role of the dopamine D1 receptor in social cognition: studies using a novel genetic rat model. *Disease Models & Mechanisms*. 2016;9(10):1147–1158. DOI: 10.1242/dmm.024752.
109. Ahern M., Goodell D. J., Adams J., Bland S. T. Brain regional differences in social encounter-induced. Fos expression in male and female rats after post-weaning social isolation. *Brain Research*. 2016;1630:120–133. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.11.006.
110. Lopatina O., Yoshihara T., Nishimura T., Zhong J., Akther S., Fakhrul A. A. K. M., Liang M., Higashida C., Sumi K., Furuhara K., Inhata Y., Huang J.-J., Kozumi K., Yokoyama S., Tsuji T., Petugina Y., Sumarokov A., Salmina A. B., Hashida K., Kitano Y., Hori O., Asano M., Kitamura Y., Kozaka T., Shiba K., Zhong F., Xie M.-J., Sato M. Ishihara K., Higashida H. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the C157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2014;8(133). DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00133.
111. Degroote S., Hunting D. J., Baccarelli A. A., Takser L. Maternal gut and fetal brain connection: Increased anxiety and reduced social interactions in Wistar rat offspring following peri-conceptional antibiotic exposure. Prog. Neuropsychopharmacol. *Biological Psychiatry*. 2016;71:76–82. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.06.010.
112. Wu C. Y., Lerner F. M., e Silva A. C., Possoit H. E., Hsieh T. H., Neumann J. T., Lee R. H. Utilizing the modified T-maze to assess functional memory outcomes after cardiac arrest. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;(131):e56694. DOI: 10.3791/56694.
113. Wang L., Simpson H. B., Dulawa S. C. Assessing the validity of current mouse genetic models of obsessive–compulsive disorder. *Behavioural Pharmacology*. 2009;20(2):119–133. DOI: 10.1097/fbp.0b013e32832a80ad.
114. Çalişkan H., Şentunali B., Özden F. M., Cihan K. H., Uzunkulaoğlu M., Çakan O., Zaloğlu N. Marble burying test analysis in terms of biological and non-biological factors. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2017;11(1):54–57.
115. Choi C. S., Gonzales E. L., Kim K. C., Yang S. M., Kim J.-W., Mabunga D. F., Cheong J. H., Han S.-H., Bahn G. H., Shin C. Y. The transgenerational inheritance of autism-like phenotypes in mice exposed to valproic acid during pregnancy. *Scientific Reports*. 2016;6(1):36250. DOI: 10.1038/srep36250.
116. Salunke B. P., Umathe S. N., Chavan J. G. Experimental evidence for involvement of nitric oxide in low frequency magnetic field induced obsessive compulsive disorder-like behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014;122:273–278. DOI: 10.1016/j.pbb.2014.04.007.
117. Vogel H. G., editor. Drug Effects on Learning and Memory. In: Drug discovery and evaluation: pharmacological assays. Berlin: Springer-Verlag; 2008. P. 715–774. DOI: 10.1007/978-3-540-70995-4.
118. Costall B., Naylor R. J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. *Psychopharmacologia*. 1974;34(3):233–241. DOI: 10.1007/BF00421964.
119. Morpurgo C. Effects of antiparkinsonian drugs on a phenothiazine-induced catatonic reaction. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*. 1962;137:84-90.

120. Порфирьева Н. Н., Семина И. И., Мустафин Р. И., Хуторянский В. В. Интраназальное введение как способ доставки лекарств в головной мозг (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):117–127. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127.
121. Porfiryeva N. N., Semina, I. I., Salakhov I. A., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive and mucus-penetrating interpolyelectrolyte complexes for nose-to-brain drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicin*e. 2021;37:102432. DOI: 10.1016/j.nano.2021.102432.

REFERENCES

1. You R., Liu Y., Chang R. C. C. A behavioral test battery for the repeated assessment of motor skills, mood, and cognition in mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2019;(145):e58973. DOI: 10.3791/58973.
2. Bespalova A. Yu., Zvartau E. E., Birdsli P., Katts. D. Zh. Pharmacology of Behavior. A Reader. St. Petersburg: St. Petersburg State Medical University; 2013. 466 p. (In Russ.)
3. Hock F. J. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological assays. Berlin: Springer. 2015; 306 p. DOI: 10.1007/978-3-319-05392-9.
4. Rodgers R. J., Cao B. J., Dalvi A., Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997;30:289–304. DOI: 10.1590/s0100-879x1997000300002.
5. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M., Bernatova I., Determination of motor activity and anxiety related behavior in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013;6(3):126–135. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.
6. Hall C., Ballachey E. L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*. 1932;6:1–12. DOI: 10.1007/978-1-60761-303-9_1.
7. Broadhurst P. L. Psychogenetics of emotionality in the rat. *NYASA*. 1969;159(3):806–824. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1969.tb12980.x.
8. Henry B. L. Minassian A., Young J. W., Paulus M. P., Geyer M. A., Perry W. Cross–species assessments of motor and exploratory behavior related to bipolar disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2010;34(8):1296–1306. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2010.04.002.
9. Aitken P., Zheng Y., Smith P. F. Ethovision™ analysis of open field behaviour in rats following bilateral vestibular loss. *Journal of Vestibular Research*. 2017;27(2-3):89–101. DOI:10.3233/ves-170612.
10. Zamani M., Budde T., Bozorgi H. Intracerebroventricular administration of N-type calcium channel blocker ziconotide displays anticonvulsant, anxiolytic, and sedative effects in rats: A preclinical and pilot study. *Epilepsy & Behavior*. 2020;111:107251. DOI: 10.1016/j.yebeh.2020.107251.
11. Berton O. Ramos A., Chaouloff F., Mormede P. Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains. *Behavioral Genetics*. 1997;27:155–166. DOI: 10.1023/A:1025641509809.
12. Krishna S., Dodd C. A., Hekmatyar S. K., Filipov N. M. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. *Archives of Toxicology*. 2014;88(1):47–64. DOI: 10.1007/s00204-013-1088-3.
13. Martin–Arenas F. J., Pintado C.O. Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice. *Proceeding of Measuring Behavior*. 2014;322–326. DOI: 10.13140/RG.2.2.29920.74247.
14. Kovalev G. I., Vasil'eva E. V., Salimov R. M. Comparison of Mice Behavior in Open Field, Closed, and Elevated Plus Maze Tests Using Factor Analysis. *I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2019;69(1):123–130. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0044467719010064.
15. Ramos A., Correia E. C., Izídio G. S., Brüske G. R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics*. 2003;33:657–668. DOI: 10.1023/A:1026131130686.
16. Abdurasulova I. N., Ekimova I. V., Chernyshev M. V., Matsulevich A. V., Pastukhov Yu. F. Impairment of cognitive functions in Wistar rats in a model of the preclinical stage of Parkinson's disease. *Journal of Higher Nervous Activity*. 2019;69(3):364–381. DOI: 10.1134/S004446771903003117. (In Russ.)
17. Pashina I. P., Semina I. I., Sidullina S. A., Tarasova R. I., Gazizov M. B., Mustafin R. I. Synthesis and psychotropic activity of hydrazides of arylhydroxyphosphorylacetic acids and their salts. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2013;47(8):19–22. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2013-47-8-19-22.
18. Swiergiel A. H., Dunn A. J. Effects of interleukin–1β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the evaluated plus–maze and open field tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2007;86:651–659. DOI: 10.1016/j.pbb.2007.02.010.
19. Schiller G. D., Daws L. C., Overstreet D. H., Orbach J. Lack of anxiety in an animal model of depression with cholinergic supersensitivity. *Brain Research Bulletin*. 1991;26:433–435. DOI: 10.1016/0361-9230(91)90019-G.
20. Nikitin D. O., Nikitina A. V., Semina I. I., Baychurina A. Z., Sadykova R. G., Ovchinnikova A. G., Krutov I. A., Gabdrakhmanova D. F., Burangulova R. N., Gavrilova E. L. On the issue of psychotropic properties of new derivatives of phosphorylacetohydrazides – salts of arylphosphinic acids. *Modern problems of science and education*. 2019;3:107–107. (In Russ.)
21. van Erp. A. M., Kruk M. R., Meelis W., Willekens–Bramer D. C. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self–grooming in the rat: handing, social contact, defeat, novelty, restrain and fut moistening. *Behavioural Brain Research*. 1994;65(1):47–55. DOI: 10.1016/0166-4328(94)90072-8.
22. Weiss I. C., Pryce C. R., Jonger–Relo A. L., Nanz–Bahr N. I., Feldon J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2004;152(2):279–295. DOI: 10.1016/j.bbr.2003.10.015.
23. Mach M., Grubbs R. D., Price W. A., Nagaoka M., Dubovický M., Lucot J. B. Delayed behavioral and endocrine effects of sarin and stress exposure in mice. *Journal of Applied Toxicology*. 2008;28(2):132–139. DOI: 10.1002/jat.1258.
24. Talarovičová A., Kršková L., Blažeková J. Testosterone enhancement during pregnancy influences the 2D: 4D ratio and open field motor activity of rat siblings in adulthood. *Hormones and Behavior*. 2009;55(1):235–239. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2008.10.010.
25. Ramos A., Berton O., Mormede P., Chaouloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioral Brain Research*. 1997;85(1):57–69. DOI: 10.1016/s0166-4328(96)00164-7.
26. McCormick C. M., Robarts D., Kopeikina K., Kelsey J. E. Long-lasting, sex-and age-specific effects of social stressors on corticosterone responses to restraint and on locomotor responses to psychostimulants in rats. *Hormones and Behavior*. 2005;48(1):64–74. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2005.01.008.
27. Bernatova I., Puzserova A., Dubovicky M. Sex differences in social stress-induced pressor and behavioral responses in normotensive and prehypertensive rats. *General Physiology and Biophysics*. 2010;29(4):346–354. DOI: 10.4149/gpb_2010_04_346.
28. Rasmussen S., Miller M. M., Filipski S. B., Tolwani R. J. Cage change influences serum corticosterone and anxiety-like behaviors in the mouse. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011;50(4):479–483.
29. Pritchard L. M., Van Kempen T. A., Zimmerberg B. Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. *Neuroscience Letters*. 2013;536:47–51. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.048.
30. Pitsikas N., Georgiadou G., Delis F., Antoniou K. Effects of Anesthetic Ketamine on Anxiety-Like Behaviour in Rats. *Neurochemical Research*. 2019;44(4):829–838. DOI: 10.1007/s11064-018-02715-y.
31. Kovalev G. I., Firstova Yu. Yu., Salimov R. M. Effects of piracetam and acephene on NMDA and nicotinic receptors in the brains of mice with different exploratory behavior in the plus maze. *Experimental and clinical pharmacology*. 2008;71(1):12–17. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2008-71-1-12-17.
32. Voronina T. A., Ostrovskaya R. U., Garibova, T. L. Guidelines for the preclinical study of drugs with a nootropic type of action. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: FSBI "NTsESMP" of the Ministry of Health and Social Development of Russia, Grif and K; 2012. 264–275 p. (In Russ.)

33. Crawley J., Goodwin F. K., Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1980;13(2):167–170. DOI: 10.1016/0091-3057(80)90067-2.
34. Ramos A., Mormede P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1998;22:33–57. DOI: 10.1016/S0149-7634 (97)00001-8.
35. Bourin M., Hascoët M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463(1–3):55–65. DOI: 10.1016/s0014-2999(03)01274-3.
36. Crawley J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1981;15(5):695–699. DOI: 10.1016/0091-3057(81)90007-1.
37. Salim S., Asghar M., Chugh G., Taneja M., Xia Z., Saha K., Oxidative stress: a potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. *Brain Research*. 2010;1359:178–185. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.08.093.
38. Aguilar B. L., Malkova L., N'Gouemo P., Forcelli P. A. Genetically epilepsy-prone rats display anxiety-like behaviors and neuropsychiatric comorbidities of epilepsy. *Frontiers in Neurology*. 2018;9:1–15. DOI: 10.3389/fneur.2018.00476.
39. Costall B., Jones B. J., Kelly M. E., Naylor R. J., Tomkins D. M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1989;32(3):777–758. DOI: 10.1016/0091-3057(89)90033-6.
40. Montgomery K. C., The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1955;48(4):254–260. DOI: 10.1037/h0043788.
41. Gonzales L. E., File S. E. A five minute experience in the evaluated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17(4):1505–1511. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-04-01505.1997.
42. Walf A. A., Frye C. A. The use of the evaluated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
43. Forcelli P. A., Turner J. R., Lee B. G., Olson T. T., Xie T., Xiao Y., Kellar K. J. Anxiolytic-and antidepressant-like effects of the methadone metabolite 2-ethyl-5-methyl-3, 3-diphenyl-1-pyrroline (EMDP). *Neuropharmacology*. 2016;101:46–56. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.012.
44. Ari C., D'Agostinio D. P., Diamond D. M., Kindy M., Park C., Kovacs Z., Elevated plus maze test combined with video tracking software to investigate the anxiolytic effect of exogenous ketogenic supplements. *Journal of Visualized Experiments*. 2019;143:1–10. DOI: 10.3791/58396.
45. Schrader A. J., Taylor R. M., Lowery-Gionta E. G., Moore N. L. Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking within-subjects behavioral performance in rats (Rattus norvegicus). *PLoS One*. 2018;13(11):e0207804. DOI: 10.1371/journal.pone.0207804.
46. Andrade M. M. M., Tomé M. F., Santiago E. S., Lúcia-Santos A., de Andrade T. G. C. S. Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*. 2003;78(1):125–133. DOI: 10.1016/s0031-9384(02)00941-1.
47. Carobrez A. P., Bertoglio L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the ebaluated plus-maze model 20 years. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005;29(8):1193–1205. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.04.017.
48. Treit D., Menard J., Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1993;44(2):463–469. DOI: 10.1016/0091-3057(93)90492-c.
49. Bertoglio L. J., Carobrez A. P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the evaluated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behavioural Brain Research*. 2002;132(2):135–143. DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00396-5.
50. Adamec R., Strasser K., Blundell J., Burton P., McKay D. W. Protein synthesis and the mechanisms of lasting change in anxiety induced by severe stress. *Behavioural Brain Research*. 2006;167(2):270–286. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.09.019.
51. Tucker L. B., McCabe J. T. Behavior of male and female C57BL/6J mice is more consistent with repeated trails in the elevated zero maze than in the evaluated plus maze. *Frontiers in journals behavioral neuroscience*. 2017;11. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00013.
52. Shilovskaya E. V., Semina I. I., Tarasova R. I., Baychurina A. Z., Pashina I. P., Voskresenskaya O. V., Garaev R. S., Fattakhov Sh. A., Gazizov M. B. Computer prediction, synthesis and psychotropic properties of hydrazinium salts of phosphorylacetohydrazides. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2013;47(4):26–29. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2013-47-4-26-29.
53. Semina I. I., Baychurina A. Z., Makarova E. A., Leushina A. V., Kazakevich Zh. V., Gabdrakhmanova M. R., Mukhamed'yarov M. A., Zefirov A. L. Dynamics of the development of behavioral disorders in transgenic mice with a model of Alzheimer's disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014;158(11):568–571. (In Russ.) DOI: 10.1007/s10517-015-2821-0.
54. Herbst L. S., Gaigher T., Siqueira A. A., Joca S. R. L., Sampaio K. N., Beijamini V. New evidence for refinement of anesthetic choice in procedures preceding the forced swimming test and the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*. 2019;368:111897. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.04.011.
55. Oguchi-Katayama A., Monma A., Sekino Y., Moriguchi T., Sato K. Comparative gene expression analysis of the amygdala in autistic rat models produced by pre-and post-natal exposures to valproic acid. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2013;38(3):391–402. DOI: 10.2131/jts.38.391.
56. Deacon R. M. The successive alleys test of anxiety in mice and rats. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;76. DOI: 10.3791/2705.
57. Lahmann C., Clark R. H., Iberl M., Ashcroft F. M. A mutation causing increased KATP channel activity leads to reduced anxiety in mice. *Physiology & Behavior*. 2014;129:79–84. DOI: 10.1016/j.physbeh.2014.02.031.
58. Sakaguchi Y., Sakurai Y. Left–right functional asymmetry of ventral hippocampus depends on aversiveness of situations. *Behavioural Brain Research*. 2017;325:25–33. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.02.028.
59. Ewin S. E., Morgan J. W., Niere F., McMullen N. P., Barth S. H., Almonte A. G., Weiner J. L. Chronic intermittent ethanol exposure selectively increases synaptic excitability in the ventral domain of the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2019;398:144–157. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.028.
60. Olton D. S., Becker J. T. Handelmann G. E. Hippocampus, space and memory. *Behavioral and Brain Sciences*. 1979;2(3):313–322. DOI: 10.1017/S0140525X00062713.
61. Rawlins J. N. P., Olton D. S. The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behavioural Brain Research*. 1982;5(4):331–358. DOI: 10.1016/0166-4328(82)90039-0.
62. Lalon R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2002;26(1):91–104. DOI: 10.1016/s0149-7634(01)00041-0.
63. Deacon R. M., Bannerman D. M., Kirby B. P., Croucher A., Rawlins J. N. P. Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behavioural Brain Research*. 2002;133(1):57–68. DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00451-x.
64. Deacon R. M. J., Penny C., Rawlins J. N. P. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behavioural Brain Research*. 2003;139(1–2):139–155. DOI: 10.1016/s0166-4328(02)00225-5.
65. Deacon R. M. J. Digging and marble burying mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols*. 2006;1(1):122–124. DOI: 10.1038/nprot.2006.20
66. Dember W. N., Fowler H. Spontaneous alternation behavior. *Psychological Bulletin*. 1958;55(6):412–428. DOI: 10.1037/h0045446.
67. Asin K. E., Fibiger H. C. Spontaneous and delayed spatial alteration following damage to specific neuronal elements within the nucleus medianus raphe. *Behavioural Brain Research*. 1984;13(3):241–250. DOI: 10.1016/0166-4328(84)90166-9.
68. Duff K., Suleman F. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: how useful have they been for therapeutic development? Brief. *Functional genomics*. 2004;3(1):47–59. DOI: 10.1093/bfgp/3.1.47.
69. Hsiao K., Borchelt D. R., Olson K., Johannsdottir R., Kitt C., Yunis W., Xu S., Eckman C., Younkin S., Price D., Iadecola C., Clark H. B., Carlson G. Age-related CNS disorder and early death in transgenic

FVB-Nmice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron*. 1995;15(5):1203–1218. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90107-8.
70. Demas G. E., Nelson R. J., Krueger B. K., Yarowsky P. J. Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behavioural Brain Research*. 1996;82(1):85–92. DOI: 10.1016/s0166-4328(97)81111-4.
71. Campolongo M., Kazlauskas N., Falasco G., Urrutia L., Salgueiro N., Höcht C., Depino A. M. Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Molecular Autism*. 2018;9(1):1–17. DOI: 10.1186/s13229-018-0221-9.
72. Semenova A. A., Lopatina O. L., Salmina A. B. Models of autism and methods for assessing autism-like behavior in animals. *I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2020;70(2):147–162. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0044467720020112.
73. Van Dam D., De Deyn P. P. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006;5(11):956–970. DOI: 10.1038/nrd2075.
74. Bali Z. K., Inkeller J., Csurgyók R., Bruszt N., Horváth H., Hernádi I. Differential effects of α7 nicotinic receptor agonist PHA-543613 on spatial memory performance of rats in two distinct pharmacological dementia models. *Behavioural Brain Research*. 2015;278:404–410. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.10.030.
75. Hidaka N., Suemaru K., Takechi K., Li B., Araki H. Inhibitory effects of valproate on impairment of Y-maze alternation behavior induced by repeated electroconvulsive seizures and c-Fos protein levels in rat brains. *Acta medica Okayama*. 2011;65(4):269–277. DOI: 10.18926/AMO/46853.
76. Magen I., Fleming S. M., Zhu C., Garcia E. C., Cardiff K. M., Dinh D., David Jentsch J. Cognitive deficits in a mouse model of premanifest Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*. 2012;35(6):870–882. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08012.x.
77. Plaksina D. V., Ekimova I. V. Age-related features of alpha-synuclein pathology in the brain in modeling the preclinical stage of Parkinson's disease in rats. *Russian Physiological Journal. I. M. Sechenov*. 2018;104(6):709–716. (In Russ.) DOI: 10.7868/S086981391806014X.
78. Lieberwirth C., Pan Y., Liu Y., Zhang Z., Wang Z. Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Research*. 2016;1644:127–140. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.05.015.
79. Gorina Y. V., Lopatina O. L., Komleva Y. K., Iptyshev A. M., Pol'nikov A. M., Salmina A. B. Eight-arm radial maze as a tool for evaluating spatial learning and memory in mice. *Siberian Medical Review*. 2016;5(101):46–52. (In Russ.)
80. Barnes C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative Physiology*. 1979;93(1):74–104. DOI: 10.1037/h0077579.
81. O'Leary T. P., Brown R. E. Optimization of apparatus design and behavioral measures for the assessment of visuo-spatial learning and memory of mice on the Barnes maze. *Learning & Memory*. 2013;20(2):85–96. DOI: 10.1101/lm.028076.112.
82. Uriarte M., Ogundele O. M., Pardo J. Long-lasting training in the Barnes maze prompts hippocampal spinogenesis and habituation in rats. *NeuroReport*. 2017;28(6):307–312. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000755.
83. Yamada M., Sakurai Y. An observational learning task using Barnes maze in rats. *Cognitive Neurodynamics*. 2018;12(5):519–523. DOI: 10.1007/s11571-018-9493-1.
84. Morel G. R., Andersen T., Pardo J., Zuccolilli G. O., Cambiaggi V. L., Hereñú C. B., Goya R. G. Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats. *Neuroscience*. 2015;303:189–199. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.050.
85. Tan H. M., Wills T. J., Cacucci F. The development of spatial and memory circuits in the rat. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*. 2016;125:159–167. DOI: 10.1002/wcs.1424.
86. Rosenfeld C. S., Ferguson S. A. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;84. DOI: 10.3791/51194.
87. Gawel K., Labuz K., Gibula-Bruzda E., Jenda M., Marszalek-Grabska M., Filarowska J., Kotlinska, J. H. Cholinesterase inhibitors, donepezil and rivastigmine, attenuate spatial memory and cognitive flexibility impairment induced by acute ethanol in the Barnes maze task in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2016;389(10):1059–1071. DOI: 10.1007/s00210-016-1269-8.
88. Vargha-Khadem F. Differential Effects of Early Hippocampal Pathology on Episodic and Semantic Memory. *Science*. 1997;277(5324):376–380. DOI: 10.1126/science.277.5324.376.
89. Aggleton J. P., Brown M. W. Episodic memory, amnesia and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behavioral and Brain Sciences*.1999; 22(3): 425-444. DOI: 10.1017/S0140525X99002034
90. Eacott M. J., Easton A., Zinkivskay A. Recollection in an episodic-like memory task in the rat. *Learning & Memory*. 2005;12(3):221–223. DOI: 10.1101/lm.92505.
91. Fortin N. J., Wright S. P., Eichenbaum H. Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature*. 2004;431(7005):188–191. DOI: 10.1038/nature02853.
92. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1984;11(1):47–60. DOI: 10.1016/0165-0270(84)90007-4.
93. Vorhees C. V. Williams M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*. 2006;1(2):848–858. DOI: 10.1038/nprot.2006.116.
94. Leggio M. G., Graziano A., Mandolesi L., Molinari M., Neri P., Petrosini L. A new paradigm to analyze observational learning in rats. *Brain research protocols*. 2003;12(2):83–90. DOI: 10.1016/j.brainresprot.2003.08.001.
95. Gehring T. V., Luksys G., Sandi C., Vasilaki E. detailed classification of swimming path in the Morris Water Maze: multiple strategies within one trial. *Scientific Reports*. 2015;5:14562. DOI: 10.1038/srep14562.
96. Levina A. S., Zakharov G. A., Shiryaeva N. V., Vaydo A. I. Comparative characteristics of the behavior of rats of two lines, differing in the threshold of excitability of the nervous system, in the model of spatial learning in the Morris water maze. *I. P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2018;68(3):366–377. (In Russ.) DOI: 10.7868/S0044467718030097.
97. Zhang L., Fang Y., Cheng X., Lian Y., Xu H., Zeng Z., Zhu H. TRPML1 participates in the progression of Alzheimer's disease by regulating the PPARγ/AMPK/Mtor signalling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(6):2446–2456. DOI: 10.1159/000484449.
98. Jaramillo T. C., Speed H. E., Xuan Z., Reimers J. M., Escamilla C. O., Weaver T. P., Powell C. M. Novel Shank3 mutant exhibits behaviors with face validity for autism and altered striatal and hippocampal function. *Autism Research*. 2017;10(1):42–65. DOI: 10.1002/aur.1664.
99. Svenson M., Hallin T., Broms J., Ekstrand J., Tingström A. Spatial memory impairment in Morris water maze after electroconvulsive seizures. *Acta Neuropsychiatrica*. 2016;29(01):17–26. DOI: 10.1017/neu.2016.22.
100. Laczó J., Markova H., Lobellova V., Gazova I., Parizkova M., Cerman J., Windisch M. Scopolamine disrupts place navigation in rats and humans: a translational validation of the Hidden Goal Task in the Morris water maze and a real maze for humans. *Journal of Psychopharmacology*. 2017;234(4):535–547. DOI: 10.1007/s00213-016-4488-2.
101. Liu Q., Shi J., Lin R., Wen T. Dopamine and dopamine receptor D1 associated with decreased social interaction. *Behavioural Brain Research*. 2017;324:51–57. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.01.045.
102. Ahmadi M., Rajaei Z., Hadjzadeh M. A., Nemati H., Hosseini M. Crocin improves spatial learning and memory deficits in the Morris water maze via attenuating cortical oxidative damage in diabetic rats. *Neuroscience Letters*. 2017;642:1–6. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.01.049.
103. de la Tremblaye P. B., Wellcome J. L., de Witt B. W., Cheng J. P., Skidmore E. R., Bondi C. O., Kline A. E. Rehabilitative success after brain trauma by augmenting a subtherapeutic dose of environmental enrichment with Galantamine. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2017;31(10–11):977–985. DOI: 10.1177/1545968317739999.
104. Alcalá J. A., Callejas-Aguilera J. E., Nelson J. B., Rosas J. M. Reversal training facilitates acquisition of new learning in a Morris water maze. *Learning & Behavior*. 2019;48:208–220. DOI: 10.3758/s13420-019-00392-7.
105. Cho H., Kim C. H., Knight E. Q., Oh H. W., Park B., Kim D. G., Park H.-J. Changes in brain metabolic connectivity underlie autistic-like social deficits in a rat model of autism spectrum disorder. *Scientific Reports*. 2017;7(1):13213. DOI: 10.1038/s41598-017-13642-3.

106. Fortunato J. J., da Rosa N., Laurentino A. O. M., Goulart M., Michalak C., Borges L. P., da Cruz Cittadin Soares E., Reis P. A., de Castro Faria Neto H. C., Petronilho F. Effects of ω-3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccarides. *Nutrition*. 2017;35:119–127. DOI: 10.1016/j.nut.2016.10.019.
107. Tickerhoof M. C., Hale L. H., Butler M. J., Smith A. S. Regulation of defeat-induced social avoidance by medial amygdala DRD1 in male and female prairie voles. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;113:104542. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2019.104542.
108. Homberg J. R., Olivier J. D. A., VandenBroeke M., Youn J., Ellenbroe A. K., Karel P., Shan L., van Boxtel R., Ooms S., Balemans M., Langedijk J., Muller M., Vriend G., Cools A. R., Cuppen E., Ellenbroek B. A. The role of the dopamine D1 receptor in social cognition: studies using a novel genetic rat model. *Disease Models & Mechanisms*. 2016;9(10):1147–1158. DOI: 10.1242/dmm.024752.
109. Ahern M., Goodell D. J., Adams J., Bland S. T. Brain regional differences in social encounter-induced. Fos expression in male and female rats after post-weaning social isolation. *Brain Research*. 2016;1630:120–133. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.11.006.
110. Lopatina O., Yoshihara T., Nishimura T., Zhong J., Akther S., Fakhrul A. A. K. M., Liang M., Higashida C., Sumi K., Furuhara K., Inhata Y., Huang J.-J., Kozumi K., Yokoyama S., Tsuji T., Petugina Y., Sumarokov A., Salmina A. B., Hashida K., Kitano Y., Hori O., Asano M., Kitamura Y., Kozaka T., Shiba K., Zhong F., Xie M.-J., Sato M. Ishihara K., Higashida H. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the C157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2014;8(133). DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00133.
111. Degroote S., Hunting D. J., Baccarelli A. A., Takser L. Maternal gut and fetal brain connection: Increased anxiety and reduced social interactions in Wistar rat offspring following peri-conceptional antibiotic exposure. Prog. Neuropsychopharmacol. *Biological Psychiatry*. 2016;71:76–82. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.06.010.
112. Wu C. Y., Lerner F. M., e Silva A. C., Possoit H. E., Hsieh T. H., Neumann J. T., Lee R. H. Utilizing the modified T-maze to assess functional memory outcomes after cardiac arrest. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;(131):e56694. DOI: 10.3791/56694.
113. Wang L., Simpson H. B., Dulawa S. C. Assessing the validity of current mouse genetic models of obsessive–compulsive disorder. *Behavioural Pharmacology*. 2009;20(2):119–133. DOI: 10.1097/fbp.0b013e32832a80ad.
114. Çalişkan H., Şentunali B., Özden F. M., Cihan K. H., Uzunkulaoğlu M., Çakan O., Zaloğlu N. Marble burying test analysis in terms of biological and non-biological factors. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2017;11(1):54–57.
115. Choi C. S., Gonzales E. L., Kim K. C., Yang S. M., Kim J.-W., Mabunga D. F., Cheong J. H., Han S.-H., Bahn G. H., Shin C. Y. The transgenerational inheritance of autism-like phenotypes in mice exposed to valproic acid during pregnancy. *Scientific Reports*. 2016;6(1):36250. DOI: 10.1038/srep36250.
116. Salunke B. P., Umathe S. N., Chavan J. G. Experimental evidence for involvement of nitric oxide in low frequency magnetic field induced obsessive compulsive disorder-like behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014;122:273–278. DOI: 10.1016/j.pbb.2014.04.007.
117. Vogel H. G., editor. Drug Effects on Learning and Memory. In: Drug discovery and evaluation: pharmacological assays. Berlin: Springer-Verlag; 2008. P. 715–774. DOI: 10.1007/978-3-540-70995-4.
118. Costall B., Naylor R. J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. *Psychopharmacologia*. 1974;34(3):233–241. DOI: 10.1007/BF00421964.
119. Morpurgo C. Effects of antiparkinsonian drugs on a phenothiazine-induced catatonic reaction. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*. 1962;137:84-90.
120. Porfiryeva N. N., Semina I. I., Mustafin R. I., Khutoryanskiy V. V. Intranasal administration as a way to deliver drugs to the brain (review). *Drug Development & Registration*. 2021;10(4):117–127. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127.
121. Porfiryeva N. N., Semina, I. I., Salakhov I. A., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive and mucus-penetrating interpolyelectrolyte complexes for nose-to-brain drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicin*e. 2021;37:102432. DOI: 10.1016/j.nano.2021.102432.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-182-190
УДК 615.2

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Новое предназначение старых лекарств (обзор)

И. И. Мирошниченко[1]✉, Е. А. Вальдман[2], И. И. Кузьмин[1]

[1] ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» (ФГБНУ НЦПЗ), 115522, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34
[2] ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова», 125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

✉ **Контактное лицо:** Мирошниченко Игорь Иванович. **E-mail:** igormir@psychiatry.ru

ORCID: И. И. Мирошниченко – https://orcid.org/0000-0003-4950-5336; Е. А. Вальдман – https://orcid.org/0000-0001-9716-499X;
И. И. Кузьмин – https://orcid.org/0000-0002-9326-4683.

Статья поступила: 11.05.2022 **Статья принята в печать:** 10.02.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Для использования лекарственного препарата, который применяют при лечении одного заболевания, на профилактику и лечение другого патологического процесса существует метод перепрофилирования лекарственных средств (ЛС). Создание лекарств с нуля занимает долгое время разработки и внедрения, что ведет к крупным финансовым расходам, а также имеет высокий процент отсева веществ-кандидатов и требует значительных финансовых расходов. Основное преимущество перепрофилирования вместо создания новых ЛС – относительно низкие финансовые затраты и значительное сокращение первых двух фаз клинических исследований.

Текст. Перепрофилирование ЛС базируется на фармакологии, фармакокинетике, фармакодинамике, фармацевтике и клиническим испытания, где первые две фазы существенно сокращаются в сравнении с созданием полностью нового ЛС. Имеются примеры успешного перепрофилирования и негативных побочных эффектов при off-label применении лекарств, что является небезопасным, но лучшим решением при орфанных заболеваниях. Проводится направленный поиск возможностей перепрофилирования ЛС с применением автоматической процедуры, где проверяется большое количество химических соединений на активность или аффинность по отношению к рецепторам и ферментам – высокопроизводительного скрининга. Широкое распространение получил компьютерный дизайн, который или перепрофилирование «*in silico*», где используется информация о препарате: мишени, химические структуры, метаболические пути, побочные эффекты, с последующим построением соответствующих моделей. Алгоритмы машинного обучения (МО): байесовский классификатор, логистическая регрессия, дерево решений, машина опорных векторов, случайный лес и другие успешно используются в биохимических фармацевтических, токсикологических исследованиях. Но наиболее перспективное развитие перепрофилирования связывают с использованием глубинных нейронных сетей (ГНС). С применением глубинного обучения было обнаружено, что ГНС превзошли прочие алгоритмы для разработки препаратов и предсказания их токсичности.

Заключение. В настоящее время интерес к перепрофилированию лекарственных препаратов заметно вырос. Поиск, по ключевым словам, «drug repurposing» выдал 2422 статьи, посвященных проблеме нового применения уже применяемых в медицине лекарств.

Ключевые слова: перепрофилирование, скрининг, терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ), машинное обучение (МО), глубокие нейронные сети (ГНС)

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

Вклад авторов. И. И. Мирошниченко ответственен за постановку задачи, цель исследования и общую структуру статьи. Е. А. Вальдман произвела поиск примеров перепрофилированных лекарственных средств. И. И. Кузьмин отвечает за раздел с машинным обучением и статистическими методами. Все авторы внесли равный вклад в оформление и редактирование рукописи.

Для цитирования: Мирошниченко И. И., Вальдман Е. А., Кузьмин И. И. Новое предназначение старых лекарств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):182–190. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-182-190

Old Drugs, New Indications (Review)

Igor I. Miroshnichenko[1]✉, Elena A. Valdman[2], Ivan I. Kuz'min[1]

[1] FSBSI "Mental Health Research Center", 34, Kashirskoe highway, Moscow, 115522, Russia
[2] FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", 8, Baltiyskaya str., Moscow, 115522, Russia

✉ **Corresponding author:** Igor I. Miroshnichenko. **E-mail:** igormir@psychiatry.ru

ORCID: Igor I. Miroshnichenko – https://orcid.org/0000-0003-4950-5336; Elena A. Valdman – https://orcid.org/0000-0001-9716-499X;
Ivan I. Kuz'min – https://orcid.org/0000-0002-9326-4683.

Received: 11.05.2022 **Revised:** 10.02.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. The drug can be used in the treatment of one disease and for the prevention and treatment of another pathological process. this is possible due to the repurposing of medicines. Creating drugs from scratch takes a long time to develop and implement, which leads to large financial costs, and also has a high dropout rate of candidate substances and requires significant financial costs. The main advantage of repurposing instead of creating new drug is relatively low financial costs and a significant reduction in the first two phases of clinical trials.

Text. Drug repurposing is based on pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, pharmaceuticals and clinical trials, where the first two phases are significantly reduced compared to the creation of a completely new. There are examples of successful repurposing and negative side effects with off-label drug use, which is unsafe but the best solution for orphan diseases. A targeted search for the possibility of repurposing drugs using an automatic procedure is being carried out, where a large number of chemical compounds are tested for activity or affinity for receptors and enzymes – high-throughput screening. Computer design has become widespread, which or repurposing "*in silico*", where information about

© Мирошниченко И. И., Вальдман Е. А., Кузьмин И. И., 2023
© Miroshnichenko I. I., Valdman E. A., Kuz'min I. I., 2023

the drug is used: targets, chemical structures, metabolic pathways, side effects, followed by the construction of appropriate models. Machine learning (ML) algorithms: Bayes classifier, logistic regression, support vector machine, decision tree, random forest and others are successfully used in biochemical pharmaceutical, toxicological research. But the most promising development of reprofiling is associated with the use of deep neural networks (DNN). Using deep learning, DNN were found to outperform other algorithms for drug development and toxicity prediction.
Conclusion. Currently, interest in drug repurposing has grown markedly. A search for the keywords «drug repurposing» showed 2,422 articles on the problem of new uses for drugs that already exist in medicine.

Keywords: repurposing, screening, therapeutic drug monitoring (TDM), machine learning (ML), deep neural networks (DNN)

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 I. Miroshnichenko is responsible for setting the problem, the purpose of the study and the general structure of the article. Elena A. Valdman searched for examples of repurposed drugs. Ivan I. Kuzmin is responsible for the section on machine learning and statistical methods. All authors contributed equally to the writing and editing of the manuscript.

For citation: Miroshnichenko I. I., Valdman E. A., Kuz'min I. I. Old drugs, new indications. *Drug development & registration*. 2023;12(1):182–190. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-182-190

ВВЕДЕНИЕ

Под перепрофилированием лекарственного средства (ЛС) подразумевается использование известного лекарственного препарата, успешно используемого при лечении одного заболевания, для профилактики и лечения другого патологического процесса. Т. е. новые показания применения апробированного лекарственного препарата или комбинация его с другими известными веществами для усиления активности препарата или снижения частоты побочных эффектов [1].

Проблемы разработки препарата *de novo* – общеизвестны: высокий процент отсева веществ-кандидатов (так называемое «бутылочное горло»), долгое время разработки и внедрения ЛС, изменение регуляторных требований, что приводит к значительным финансовым расходам [2]. Перепрофилирование уже зарегистрированных, так называемых «старых» ЛС, позволяет значительно сократить объем доклинических исследований, а также первой и второй фаз клинических испытаний за счет сокращения изучения безопасности применения в медицинской практике. В ряде случаев можно обойтись без разработки оригинальной лекарственной формы и использовать готовые технологические схемы химического синтеза активного вещества, что существенно сокращает время и размер инвестиций, поэтому перепрофилированные ЛС стоят намного дешевле новых, а, следовательно, доступнее для больных [3].

Затраты на регуляторные испытания в рамках третьей фазы клинических исследований для перепрофилирования ранее апробированного лекарственного средства в среднем составляют 300 млн долларов США, по сравнению с 2–3 млрд долларов, которые требуются для разработки нового ЛС [4].

Общий механизм перепрофилирования ЛС в российской практике

Успешное перепрофилирование ЛС базируется на результатах 4 основных направлений исследований:

- фармакология, включая фармакокинетику, фармакодинамику, определение механизма нового эффекта, безопасности, терапевтического индекса;
- фармацевтическая разработка и рецептура – определение дозы, пути и режима введения, лекарственной формы для достижения желаемого эффекта;
- доказательство эффективности по новым показаниям в трансляционных биологических моделях;
- клинические испытания, дополненные определением биомаркеров, для получения убедительных доказательств эффективности применения препарата по новым показаниям [5].

В прошлом перепрофилирование препаратов было преимущественно оппортунистическим и спонтанным – методом проб и ошибок. Действительно, наиболее известные примеры перепрофилирования препаратов являются результатом целенаправленного поиска. Так, применение силденафила для лечения эректильной дисфункции основывалось на ретроспективном клиническом опыте, а перепрофилирование талидомида для лечения узловатой эритемы и множественной миеломы произошло случайно.

«Силденафил» изначально применялся для профилактики и лечения стенокардии, затем его стали использовать для коррекции эректильной дисфункции. Он рекомендован для лечения легочной гипертензии и, возможно, лимфангиомы [6, 7].

«Талидомид» – седативное средство, антиконвульсант, был со скандалом снят с производства: тератогенный побочный эффект вызывал дефекты формирования скелета у детей, матери которых принимали

препарат в течение первого триместра беременности. Новая жизнь препарата наступила благодаря способности его изомера лечить такие тяжелые заболевания как проказу, и множественную миелому [8].

«Ацетилсалициловая кислота» изначально применялась только как жаропонижающее и противовоспалительное средство, теперь используется и как кардиопротектор (Аспирин® Кардио), антиагрегант и онкопротектор.

COVID-19: ранее известные препараты ремдесевир и дексаметазон показали терапевтический эффект при лечении госпитализированных с коронавирусной инфекцией пациентов [9].

Список примеров далеко не полный, удачное перепрофилирование ЛС приведено в таблице 1.

Во многих случаях применение ЛС в терапии по новым показаниям происходит в условиях клиники. Врач может использовать препарат за рамками регуляторных предписаний до определенной степени отношения польза/риск. Варьировать могут такие параметры, как медицинское вмешательство, индивидуальные особенности пациента, доза, маршрут (в/в, per os) и время введения препарата.

Особое место занимает проблема использования ЛС вне показаний (off-label). Подобная практика весьма распространена в педиатрии, а также при лечении определенных нозологий заболеваний, чаще всего в онкологии и психиатрии. Применение ЛС off-label для лечения детей чаще всего связано с отсутствием соответствующих указаний в инструкции. Свобода выписывать off-label препарат обычно ограничивается отсутствием обязанности сообщать о последствиях такого предписания. Данная практика не регулируется контролирующими инстанциями и характеризуется менее достоверной статистикой безопасности и эффективности. Назначение лекарств вне показаний считается небезопасным. Например, использование антибиотиков для лечения вирусных инфекций является off-label и может приводить к росту резистентных штаммов бактерий. Другой пример – «Эптагол альфа» (Eptacog alfa), который был одобрен для лечения некоторых форм гемофилии или врожденных аномалий коагулянтных белков, но доля нерегулированных предписаний достигла тревожных размеров – около 98 %. Клиническая польза в большинстве случаев нецелевого применения препаратов весьма сомнительна [10]. В то же время следует признать, что в случае орфанных заболеваний, off-label использованию ЛС трудно предложить разумную продуктивную альтернативу [11].

В настоящее время проводится направленный поиск возможностей перепрофилирования ЛС с применением высокопроизводительного скрининга и так называемых «омиксных» технологий. *Скрининг* – оптимизированная автоматическая процедура, где множество химических соединений проходят проверку на активность или аффинность по отношению к ферментам или рецепторам, т. е. у мишени.

Так, «Иматиниб» селективно ингибирует онкогенную киназу BCR-ABL у больных хроническим миелолейкозом. Впоследствии препарат был перепрофилирован для терапии стромальных опухолей ЖКТ, поскольку подавляет активность и c-kit киназы, онкогена для этой локализации рака [12].

Широкое распространение получил компьютерный дизайн, который также называют перепрофилированием «*in silico*». В этой стратегии переназначения ЛС используется информация о препарате, включая мишени, химические структуры, метаболические пути, побочные эффекты, для построения соответствующих моделей [13]. Ранее компьютерное моделирование в отечественной практике проводилось *in silico* в программе PASS (Prediction of Activity Spectra of Substances). С помощью этой программы можно смоделировать родство ферментами системы цитохрома Р450 с субстратом на базе обучающей выборки из большого колличества субстратов, у которых известен процесс биотрансформации. PASS 2019 – актуальная версия программы, она прогнозирует большую часть фармакологических эффектов (5066 рекомендуемых из 8054), и побочных и токсических эффектов с механизмами действия, влияние на генную экспрессию и т. п. По заверению создателе программы, что и для исходных, и для репозиционированных показаний эксплуатации лекарственных препаратов точность прогноза PASS была близка к идеальной [14]. За высокопроизводительным экспериментальным скринингом обычно следует *in silico* скрининг ЛС из библиотеки препаратов, например виртуальный скрининг, который основан на структуре лиганда, или молекулярный докинг [15]. По сравнению со слепым поиском или неизбирательным скринингом, перепрофилирование препарата на основе знания структуры биомишени (target-based) позволяет проводить скрининг практически всех ЛС с известной химической структурой. Для полноценного виртуального скрининга необходимы высококачественные данные. В последнее произошло резкое увеличение объема общедоступных химических и биологических данных, представленных в ChEMBL, DrugBank, IUPHAR, PharmGKB, TTD и других базах данных, которые включают результаты скрининга [16]. В ChEMBL содержатся сведения о биологической активности соединений в отношении лекарственных мишеней. Биоактивность регистрируется в Ki, Kd, IC_{50} и EC_{50}. Эти данные могут быть отсортированы и проанализированы для использования библиотек скрининга соединений. Теперь у исследователей есть миллионы молекул и видов биологической активности для различных мишеней болезней, а также для свойств абсорбции, распределения, метаболизма, экскреции (АРМЭ) и токсикологии.

Таблица 1. Новое применение «старых» апробированных лекарств

Table 1. New use of «old» approved drugs

Препарат A drug	Применение Application	Новые показания New indications
«Азатиоприн» "Azathioprine"	Ревматоидный артрит Rheumatoid arthritis	Иммунодепрессант после пересадки почки Antirejection after kidney transplant
«Аллопуринол» "Allopurinolum"	Рак Cancer	Подагра Gout
«Амантадин» "Amantadine"	Грипп, паркинсонизм Flu, Parkinson's disease	Черепно-мозговые травмы Traumatic brain injuries
«Амфотерицин В» "Amphotericin B"	Противогрибковый Antifungal	Лейшманиозм Leishmaniasis
«Бексаротен» "Bexarotene"	Рак Cancer	Болезнь Альцгеймера Alzheimer's disease
«Блеомицин» "Bleomycin"	Рак Cancer	Плевральный выпот Pleural effusion
«Бромокриптин» "Bromocriptine"	Болезнь Паркинсона Parkinson's disease	Диабет II типа Type 2 diabetes
«Гемцитабин» "Gemcitabin"	Антивирусное средство Antivirus tool	Противоопухолевое средство Antitumor agent
«Димебон» "Dimebon"	Аллергия Allergy	Болезнь Альцгеймера Alzheimer's disease
«Диметилфумарат» "Dimethyl Fumarate"	Псориаз Psoriasis	Рассеянный склероз Multiple sclerosis
«Дротрекогин альфа» "Drotrecogin alfa"	Антикоагулянт Anticoagulant	Сепсис Sepsis
«Зидовудин» "Zidovudine"	Рак Cancer	ВИЧ HIV
«Кетоконазол» "Ketoconazole"	Противогрибковое средство Antifungal	Опухоли простаты Prostate cancer
«Колхицин» "Colchicine"	Подагра Gout	Средиземноморская лихорадка Mediterranean fever
«Метилурацил» "Methyluracil"	Тиреотоксикоз Thyrotoxicosis	Противовоспалительное средство Anti-inflammatory agent
«Метопролол» "Metoprolol"	Профилактика мигрени Preventive migraine	Антигипертензивное средство Antihypertensive drug
«Метотрексат» "Methotrexate"	Острый лимфолейкоз Acute lymphocytic leukemia	Остеосаркома, рак легких, болезнь Ходжкина Osteosarcoma, lungs' cancer, Hodgkin lymphoma
«Метформин» "Metformin"	Диабет Diabetes	Противоопухолевое средство Antitumor agent
«Миноксидил» "Minoxidil"	Гипертензия Hypertension	Облысение Hair loss
«Пирлиндол» "Pirlindole"	Депрессия Depression	Рассеянный склероз Multiple sclerosis
«Ралоксифен» "Raloxifene"	Рак легких Lungs' cancer	Остеопороз Osteoporosis
«Сиденафил» "Sildenafil"	Эректильная дисфункция Erectile dysfunction	Лимфангиома Lymphangioma
«Топирамат» "Topiramate"	Эпилепсия Epilepsy	Ожирение Obesity
«Финастерид» "Finasteride"	Гиперплазия простаты Prostatic hyperplasia	Облысение Hair loss

Анализ библиографических баз данных показывает, что большая часть публикаций по проблеме перепрофилирования ЛС относится к антибиотикам; препаратам, применяемых в онкологии и психиатрии. Следует отметить, что на фоне впечатляющих успехов в онкологии, поиск новых высокоэффективных препаратов в психиатрии не приносит значимых результатов.

Для опухолей, вне зависимости от локализации, характерен общий механизм – неконтролируемый митоз клеток. Определены мишени, ферментативный спектр: ингибиторы тирозинкиназы, протеазы, фосфатидилинозитол-3-киназы, механистической мишени рапамицина (mTOR); EGFR. Ингибиторы mTOR, например, иринотекан, успешно применяются для лечения метастатического и локализованного желу-

дочно-кишечного тракта. Но в последнее время были проведены исследования, которые доказывают, что повышение уровня экспрессии mTOR наблюдается и при опухолях иного генеза [17]. Перепрофилирование ранее изученных ЛС в противоопухолевые препараты, достаточно широко освещается в научной прессе [18, 19].

В психиатрии преобладает нозологический подход, этиология заболевания носит описательный характер. К примеру, для фармакотерапии шизофрении применяются антипсихотики. Назначение не зависит от причины болезни: генетическая предрасположенность, нарушения развития, травма головы, интоксикации, инфекции или комбинации вышеуказанных факторов. Причинная связь между этиологией заболевания и его лечением не установлена. В связи с этим, врач полагается на метод проб и ошибок, эмпирически выбирая наиболее эффективную и безопасную стратегию лечения.

Перепрофилирование ЛС в психиатрии восходит к истокам психофармакологии. Антигистаминные вещества фенотиазины – послужили источником первого нейролептика хлорпромазина. Противотуберкулезный препарат ипрониазид стал первым антидепрессантом из группы ингибиторов моноаминоксидазы в истории. Для последней генерации антипсихотиков общепринятой практикой являлась видоизменение структуры фармакологических лекарственных средств для создания аналогов уже имеющихся лечебных препаратов («me-too-drugs») с применением биоизостерических замен.

Как показывает практика, немало препаратов для лечения патологий ЦНС перепрофилируются с одного показания на другое внутри группы заболеваний. Наиболее распространенными исходными показаниями являются эпилепсия, депрессия, шизофрения и болезнь Паркинсона, в общей сложности на их долю приходится почти три четверти (74 %) случаев, перепрофилирования ЛС [20]. Примером может служить «Атомоксетин», который первоначально позиционировался как ЛС для лечения депрессии. После доказательства неэффективности атомоксетина при этом расстройстве было отмечено сходство лигандов атомоксетина и дезипрамина, показавшего себя действенным средством для борьбы с синдромом дефицита внимания и гиперактивности – СДВГ. Это привело к клиническим испытаниям и последующему одобрению FDA атомоксетина для лечения СДВГ [21].

Примеры перепрофилирования ЛС для лечения психиатрических заболеваний:

«Мифепристон» – антагонист глюкокортикоидных рецепторов. Старое применение: медикаментозный аборт. На основе данных о роли в патогенезе депрессии гипоталамо-гипофизарной-надпочечниковой оси был определен новый потенциал препарата: использование в качестве антидепрессанта при главной депрессии [22].

«Миноциклин» – полусинтетический антибиотик тетрациклиновой группы обширного круга действия. Среди прочих антибиотиков тетрациклинового ряда «Миноциклин» имеет наивысшую проницаемость (в пять раз больше, чем у доксициклина) через ГЭБ (гемато-энцефалический барьер), а также у него имеется ряд механизмов, обеспечивающих эффективность средства в фармакотерапии шизофрении, о чем свидетельствуют результаты метаанализа [23].

«Целекоксиб» – селективный ингибитор циклооксигеназы-2, он характеризуется хорошей проницаемостью через ГЭБ и способен, по мнению многих авторов, подавлять индуцированную цитокинами активацию и экспрессию ЦОГ-2 в ЦНС пациентов, которые болеют шизофренией [24].

«Пропранолол» – гипотензивный препарат, неселективный адреноблокатор (старое применение). Новые показания: анксиолитик, препарат для лечения мигрени [25].

«Кетамин» – анестетик (старое применение). Новое применение: антидепрессант [26].

«Ралоксифен» – селективный модулятор рецепторов эстрогенов (ЭР), действующий как агонист ЭР (в матке, например) или как антагонист (в молочной железе). Имеются свидетельства эффективного применения в фармакотерапии шизофрении [27].

Заслуживает внимание перспектива использования аторвастатина, как средства улучшения эмоционального состояния и повышения когнитивных способностей при депрессивных состояниях [28].

«Бупропион» – антидепрессант, применяется также для лечения никотиновой зависимости [29].

«Дулоксетин» – антидепрессант, показан также для клинического применения у женщин со стрессовым недержанием мочи [30].

Перспективы

Дальнейший прогресс в перепрофилировании связывают с развитием методов машинного обучения (МО). МО – это растущая область искусственного интеллекта, которая использует различные статистические методы, чтобы позволить компьютерам учиться на различных типах данных без явного программирования. Следовательно, специалистам в области компьютерного лекарственного дизайна представляется возможность работать с данными без написания собственных программ. При МО используются такие алгоритмы как наивный Байесовский классификатор, логистическая регрессия, дерево решений, машина опорных векторов, случайный лес, и некоторые другие. Следующим шагом в этом направлении стали искусственные нейрон-

ные сети (ИНС) – математические модели, которые разработаны по аналогии с биологическими нейронными сетями. Эти сети способны моделировать нелинейные отношения между входными и выходными сигналами. На использовании искусственных нейронных сетей основано глубокое обучение: набор алгоритмов МО, которые моделируют абстракции высокого уровня, позволяющие имитировать работу головного мозга человека [31].

Алгоритмы МО широко используются как в биохимических, фармацевтических, так и в токсикологических исследованиях (таблица 2). Логистическая регрессия использовалась в модели МО PREDICT, в которой проводится кросс-валидация трех показателей подобия: родственная структура, близкая нозология, схожая тканевая специфичность. В результате было предложено использование эсциталопрама для борьбы с алкогольной зависимостью [32]. SPACE, другой метод МО также использовал логистическую регрессию для предсказания терапевтического химического класса препарата путем объединения множества источников данных [33]. Предсказан терапевтический класс препарата на основании подобия молекулярной цели, химической структуры и экспрессии генов; при этом эти три параметра объединены в одну матрицу подобия препаратов, используемую в качестве ядра для классификации данных методом опорных векторов [34].

Разработана прогностическая модель, основанная на ИНС для реагирования линий раковых клеток на лечение препаратами, параметризованными по IC_{50} [35]. В данной модели геномные (статус микросателлитов и мутаций для 77 онкогенов) и химические (структурный отпечаток) характеристики линий раковых клеток проанализированы для построения персептрона нейронной сети и регрессии случайного леса.

Глубокое обучение по сравнению с поверхностным обучением способно обнаруживать латентные и комплексные структуры в больших наборах данных и, используя алгоритмы обратной связи, позволяет корректировать соединяющие веса, позволяя вычислить представление каждого слоя на основании предыдущего [36]. С использованием глубокого обучения проанализированы данные профиля экспрессии генов для предсказания терапевтических категорий препаратов и обнаружили, что ГНС превзошли машину опорных векторов, что свидетельствует о полезности использования глубокого изучения для разработки препаратов [37]. Кроме того, глубокое обучение превосходит традиционные алгоритмы в предсказании токсичности препаратов [38, 39]. Тема МО в приложении к перепрофилированию бурно развивается, соответствующий обзор рекомендуется к ознакомлению [40].

Таблица 2. Примеры успешного приложения МО для решения конкретных задач медицинской химии, биофармации и производства ЛС [41]

Table 2. Examples of successful applications of Machine learning (ML) to solve specific problems of medicinal chemistry, biopharmaceutics and drug production [41]

Терапевтические мишени Therapeutic target
Молекулярный синтез Molecular Synthesis
Физико-химические свойства малых молекул Physical and chemical properties of small molecules
Растворимость Solubility
Медикаментозное поражение печени Drug-induced liver injury
Параметры АРМЭ ADME parameters
Проникновение через гематоэнцефалический барьер Penetration through the blood-brain barrier
Проницаемость кожи Skin Permeability
Транспортеры Transporters
Мутагенность Mutagenicity
Фармакокинетика *in vivo* *In vivo* pharmacokinetic
Репродуктивная токсикология Reproductive Toxicology
Состав лекарственной формы The composition of the dosage form
Воздействие на окружающую среду Environmental impact
Фармакоэкономика / анализ экономической эффективности / политические решения Pharmacoeconomics / benefit-cost analysis / political decisions
Клинические испытания: рекрутинг, дизайн, оптимизация, успех и неудача Clinical trials: recruiting, design, optimization, success and failure
Производство Manufacturing
Обнаружение поддельных лекарств Detection of counterfeit drugs
Прогнозирование нежелательных явлений в постмаркетинговый период Prediction of adverse events in the post-marketing period
Электронные медицинские карты Electronic Health Records

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первых немногочисленных публикаций по перепрофилированию лекарственных средств в базе данных PubMed было мало, и они датируются концом прошлого столетия. Поиск по ключевой фразе «drug repurposing» в настоящее время только за последний год обнаружил 2422 статьи, и они посвящены проблеме нового использования уже существующих лекарственных средств. Появились специализированные интернет-ресурсы, которые посвящены перепрофилированию лекарственных препаратов, например,

Drug Repurposing Hub[1]. Он содержит не только документально подтвержденную информацию о 4707 ЛС, но в репозитории хранятся сами вещества с аналитической чистотой [43]. Внимание к этой теме проявилось в учреждении специализированного журнала «Drug repurposing, rescue and repositioning»[2]. Однако журнал почил в бозе: вышел всего один номер за 2015 год. Интерес к данной тематике заметно вырос за последние 15 лет, что несет за собой актуальность и важность исследований в данном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sonaye H. V., Sheikh R. Y., Doifode C. A. Drug repurposing: Iron in the fire for older drugs. *Biomed Pharmacother*. 2021;141:111638. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111638.
2. Waring M. J., Arrowsmith J., Leach A. R., Leeson P. D., Mandrell S., Owen R. M., Pairaudeau G., Pennie W. D., Pickett S. D., Wang J., Wallace O., Weir A. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14(7):475–486. DOI: 10.1038/nrd4609.
3. Huang L., Luo H., Li S., Wu F. X., Wang J. Drug-drug similarity measure and its applications. *Brief Bioinform*. 2021;22(4):265. DOI: 10.1093/bib/bbaa265.
4. Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature*. 2016;534(7607):314–316.
5. Mittal N., Mittal R. Repurposing old molecules for new indications: Defining pillars of success from lessons in the past. *European Journal of Pharmacology*. 2021;912:174569. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.1745694.
6. Bhogal S., Khraisha O., Al Madani M., Treece J., Baumrucker S. J., Paul T. K. Sildenafil for Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Therapeutics*. 2019;26(4):520–526. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000766.
7. Iratni R., Ayoub M. A. Sildenafil in Combination Therapy against Cancer: A Literature Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2021;28(11):2248–2259. DOI: 10.2174/0929867327666200730165338.
8. Vargesson N., Stephens T. Thalidomide: history, withdrawal, renaissance, and safety concerns. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2021;20(12):1455–1457. DOI: 10.1080/14740338.2021.1991307.
9. Zhou Y., Hou Y., Shen J., Huang Y., Martin W., Cheng F. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discovery*. 2020;6(1):14. DOI: 10.1038/s41421-020-0153-3.
10. Alexander W. A., Jensen I., Hathway J., Srivastava K., Cyr P., Sidonio R. F. Jr, Batt K. Bleeding in patients with hemophilia who have inhibitors: Modeling US medical system utilization and cost avoidance between recombinant factor VIIa products with different clinical dosing requirements. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*. 2022;28(5):518–527. DOI: 10.18553/jmcp.2022.21197.
11. Roessler H. I., Knoers N. V. A. M., van Haelst M. M., van Haaften G. Drug repurposing for rare diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2021;42(4):255–267. DOI: 10.1016/j.tips.2021.01.003.
12. Bildik G., Acılan C., Sahin G. N., Karahuseyinoglu S., Oktem O. C-Abl is not actıvated in DNA damage-induced and Tap63-mediated oocyte apoptosıs in human ovary. *Cell Death & Disease*. 2018;9(10):943. DOI: 10.1038/s41419-018-1026-7.
13. Chavda V. P., Ertas Y. N., Walhekar V., Modh D., Doshi A., Shah N., Anand K., Chhabria M. Advanced Computational Methodologies Used in the Discovery of New Natural Anticancer Compounds. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:702611. DOI: 10.3389/fphar.2021.702611.
14. Поройков В. В. Компьютерное конструирование лекарств: от поиска новых фармакологических веществ до системной фармакологии. *Биомедицинская химия*. 2020;66(1):30–41. DOI: 10.18097/PBMC20206601030.
15. Méndez-Álvarez D., Herrera-Mayorga V., Juárez-Saldivar A., Paz-González A. D., Ortiz-Pérez E., Bandyopadhyay D., Pérez-Sánchez H., Rivera G. Ligand-based virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics of eugenol analogs as potential acetylcholinesterase inhibitors with biological activity against Spodoptera frugiperda. *Molecular Diversity*. 2022;26(4):2025–2037. DOI: 10.1007/s11030-021-10312-5.
16. Füzi B., Gurinova J., Hermjakob H., Ecker G. F., Sheriff R. Path4drug: data science workflow for identification of tissue-specific biological pathways modulated by toxic drugs. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:708296. DOI: 10.3389/fphar.2021.708296.
17. Bailly C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacological Research*. 2019;148:104398. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104398.
18. Савинкова А. В., Жидкова Е. М., Тилова Л Р., Лаврова М. Д., Лылова Е. С., Кузин К. А., Портянникова А. Ю., Максимова В. П., Холодова А. В., Власова О. А., Фетисов Т. И., Кирсанов К. И., Белицкий Г. А., Якубовская М. Г., Лесовая Е. А. Варианты и перспективы перепрофилирования лекарственных препаратов для использования в терапии онкологических заболеваний. *Сибирский онкологический журнал*. 2018;17(3):77–87. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-3-77-87.
19. Carlos-Escalante J. A., de Jesús-Sánchez M., Rivas-Castro A., Pichardo-Rojas P. S., Arce C., Wegman-Ostrosky T. The use of antihypertensive drugs as coadjuvant therapy in cancer. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:660943. DOI: 10.3389/fonc.2021.660943.
20. Caban A., Pisarczyk K., Kopacz K., Kapuśniak A., Toumi M., Rémuzat C., Kornfeld A. Filling the gap in CNS drug development: evaluation of the role of drug repurposing. *J Mark Access Health Policy*. 2017;5(1):1299833. DOI: 10.1080/20016689.2017.1299833.
21. Posner J. The role of precision medicine in child psychiatry: what can we expect and when? *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2018;57(11):813–817. DOI: 10.1016/j.jaac.2018.07.874.
22. Dwyer J. B., Aftab A., Radhakrishnan R., Widge A., Rodriguez C. I., Carpenter L. L., Nemeroff C. B., McDonald W. M., Kalin N. H. Hormonal treatments for major depressive disorder: state of the art. *American Journal of Psychiatry*. 2020;177(8):686–705. DOI: 10.1176/appi.ajp.2020.19080848.
23. Çakici N., van Beveren N. J. M., Judge-Hundal G., Koola M. M., Sommer I. E. C. An update on the efficacy of anti-inflammatory agents for patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Psychological Medicine*. 2019;49(14):2307–2319. DOI: 10.1017/S0033291719001995.
24. Алходри А., Суслина С. Н. Разработка гранул целекоксиба для получения капсул и таблеток пролонгированного высвобождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):68–73. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-68-73.
25. Rosenberg L., Rosenberg M., Sharp S., Thomas C. R., Humphries H. F., Holzer C. E., Herndon D. N., Meyer W. J. Does acute propranolol treatment prevent posttraumatic stress disorder, anxiety, and depression in children with burns? *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2018;(2):117–123. DOI: 10.1089/cap.2017.0073.
26. Carboni E., Carta A. R., Carboni E., Novelli A. Repurposing ketamine in depression and related disorders: can this enigmatic drug achieve success? *Frontiers in Neuroscience*. 2021:30(15):657714. DOI: 10.3389/fnins.2021.657714.
27. Bumb J. M., Enning F., Leweke F. M. Drug repurposing and emerging adjunctive treatments for schizophrenia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2015;16(7):1049–1067. DOI: 10.1517/14656566.2015.1032248.
28. De Giorgi R., Martens M., Rizzo Pesci N., Cowen P. J., Harmer C. J. The effects of atorvastatin on emotional processing, reward learning, verbal memory and inflammation in healthy volunteers: An experimental medicine study. *Journal of Psychopharmacology*. 2021;35(12):1479–1487. DOI: 10.1177/02698811211060307.
29. Yan T., Goldman R. D. Bupropion for smoking cessation in adolescents. *Canadian Family Physician*. 2021;67(10):743–745. DOI: 10.46747/cfp.6710743.
30. Ankarfeldt M. Z., Petersen J., Andersen J. T., Fernandes M. F. S., Li H., Motsko S. P., Fast T., Jimenez-Solem E. Duloxetine Exposure During Pregnancy and the Risk of Spontaneous and Elective Abortion: A Danish Nationwide Observational Study. *Drugs – Real World Outcomes*. 2021;8(3):289–299. DOI: 10.1007/s40801-021-00252-9.

[1] The Drug Repurposing Hub. Available at: http://www.broadinstitute.org/repurposing. Accessed: 06.06.2022.

[2] Drug Repurposing, Rescue, and Repositioning. Available at: https://www.liebertpub.com/loi/drrr. Accessed: 06.06.2022.

31. Terziyan V., Kaikova O. Neural Networks with Disabilities: An introduction to complementary artificial intelligence. *Neural Computation*. 2021;34(1):255–290. DOI: 10.1162/neco_a_01449.
32. Gottlieb A., Stein G. Y., Ruppin E., Sharan R. PREDICT: A method for inferring novel drug indications with application to personalized medicine. *Molecular Systems Biology*. 2011;7(1):496. DOI: 10.1038/msb.2011.26.
33. Liu Z., Fang H., Reagan K., Xu X., Mendrick D. L., Slikker W. Jr., Tong W. In silico drug repositioning: What we need to know. *Drug Discovery Today*. 2013;18(3–4):110–115. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.08.005.
34. Napolitano F., Zhao Y., Moreira V. M., Tagliaferri R., Kere J., D'Amato M., Greco D. Drug repositioning: a machine-learning approach through data integration. *Journal of Cheminformatics*. 2013;5(1):30. DOI: 10.1186/1758-2946-5-30.
35. Menden M. P., Iorio F., Garnett M., McDermott U., Benes C. H., Ballester P. J., Saez-Rodriguez J. Machine learning prediction of cancer cell sensitivity to drugs based on genomic and chemical properties. *PLOS One*. 2013;8(4):61318. DOI: 10.1371/journal.pone.0061318.
36. LeCun Y., Bengio Y., Hinton G. Deep learning. *Nature*. 2015;521(7553):436–444. DOI: 10.1038/nature14539.
37. Aliper A., Plis S., Artemov A., Ulloa A., Mamoshina P., Zhavoronkov A. Deep learning applications for predicting pharmacological properties of drugs and drug repurposing using transcriptomic data. *Molecular Pharmaceutics*. 2016;13(7):2524–2530. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00248.
38. Azuaje F. Drug interaction networks: an introduction to translational and clinical applications. *Cardiovascular Research*. 2013;97(4):631–641. DOI: 10.1093/cvr/cvs289.
39. Mayr A., Klambauer G., Unterthiner T., Hochreiter S. DeepTox: Toxicity prediction using deep learning. *Frontiers in Environmental Science*. 2016;3:80. DOI: 10.3389/fenvs.2015.00080.
40. Gupta R., Srivastava D., Sahu M., Tiwari S., Ambasta R. K., Kumar P. Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery. *Molecular Diversity*. 2021;25(3):1315–1360. DOI: 10.1007/s11030-021-10217-3.
41. Ekins S., Puhl A. C., Zorn K. M., Lane T. R., Russo D. P., Klein J. J., Hickey A. J., Clark A. M. Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development. *Nature Materials*. 2019;18(5):435–441. DOI: 10.1038/s41563-019-0338-z.
42. Corsello S. M., Bittker J. A., Liu Z., Gould J., McCarren P., Hirschman J. E., Johnston S. E., Vrcic A., Wong B., Khan M., Asiedu J., Narayan R., Mader C. C., Subramanian A., Golub T. R. The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource. *Nature Medicine*. 2017;23(4):405–408. DOI: 10.1038/nm.4306.

REFERENCES

1. Sonaye H. V., Sheikh R. Y., Doifode C. A. Drug repurposing: Iron in the fire for older drugs. *Biomed Pharmacother*. 2021;141:111638. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111638.
2. Waring M. J., Arrowsmith J., Leach A. R., Leeson P. D., Mandrell S., Owen R. M., Pairaudeau G., Pennie W. D., Pickett S. D., Wang J., Wallace O., Weir A. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14(7):475–486. DOI: 10.1038/nrd4609.
3. Huang L., Luo H., Li S., Wu F. X., Wang J. Drug-drug similarity measure and its applications. *Brief Bioinform*. 2021;22(4):265. DOI: 10.1093/bib/bbaa265.
4. Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature*. 2016;534(7607):314–316.
5. Mittal N., Mittal R. Repurposing old molecules for new indications: Defining pillars of success from lessons in the past. *European Journal of Pharmacology*. 2021;912:174569. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.1745694.
6. Bhogal S., Khraisha O., Al Madani M., Treece J., Baumrucker S. J., Paul T. K. Sildenafil for Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Therapeutics*. 2019;26(4):520–526. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000766.
7. Iratni R., Ayoub M. A. Sildenafil in Combination Therapy against Cancer: A Literature Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2021;28(11):2248–2259. DOI: 10.2174/0929867327666200730165338.
8. Vargesson N., Stephens T. Thalidomide: history, withdrawal, renaissance, and safety concerns. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2021;20(12):1455–1457. DOI: 10.1080/14740338.2021.1991307.
9. Zhou Y., Hou Y., Shen J., Huang Y., Martin W., Cheng F. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discovery*. 2020;6(1):14. DOI: 10.1038/s41421-020-0153-3.
10. Alexander W. A., Jensen I., Hathway J., Srivastava K., Cyr P., Sidonio R. F. Jr, Batt K. Bleeding in patients with hemophilia who have inhibitors: Modeling US medical system utilization and cost avoidance between recombinant factor VIIa products with different clinical dosing requirements. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*. 2022;28(5):518–527. DOI: 10.18553/jmcp.2022.21197.
11. Roessler H. I., Knoers N. V. A. M., van Haelst M. M., van Haaften G. Drug repurposing for rare diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2021;42(4):255–267. DOI: 10.1016/j.tips.2021.01.003.
12. Bildik G., Acılan C., Sahin G. N., Karahuseyinoglu S., Oktem O. C-Abl is not actıvated in DNA damage-induced and Tap63-mediated oocyte apoptosıs in human ovary. *Cell Death & Disease*. 2018;9(10):943. DOI: 10.1038/s41419-018-1026-7.
13. Chavda V. P., Ertas Y. N., Walhekar V., Modh D., Doshi A., Shah N., Anand K., Chhabria M. Advanced Computational Methodologies Used in the Discovery of New Natural Anticancer Compounds. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:702611. DOI: 10.3389/fphar.2021.702611.
14. Porojkov V. V. Computer-aided drug design: from discovery of novel pharmaceutical agents to systems pharmacology. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2020;66(1):30–41. (In Russ.) DOI: 10.18097/PBMC20206601030.
15. Méndez-Álvarez D., Herrera-Mayorga V., Juárez-Saldivar A., Paz-González A. D., Ortiz-Pérez E., Bandyopadhyay D., Pérez-Sánchez H., Rivera G. Ligand-based virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics of eugenol analogs as potential acetylcholinesterase inhibitors with biological activity against Spodoptera frugiperda. *Molecular Diversity*. 2022;26(4):2025–2037. DOI: 10.1007/s11030-021-10312-5.
16. Füzi B., Gurinova J., Hermjakob H., Ecker G. F., Sheriff R. Path4drug: data science workflow for identification of tissue-specific biological pathways modulated by toxic drugs. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:708296. DOI: 10.3389/fphar.2021.708296.
17. Bailly C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacological Research*. 2019;148:104398. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104398.
18. Savinkova A. V., Zhidkova E. M., Tilova L. R., Lavrova M. D., Lylova E. S., Kuzin K. A., Portjannikova A. Ju., Maksimova V. P., Holodova A. V., Vlasova O. A., Fetisov T. I., Kirsanov K. I., Belickij G. A., Jakubovskaja M. G., Lesovaja E. A. Variants and perspectives of drug repurposing for cancer treatment. *Siberian journal of oncology*. 2018;17(3):77–87. (In Russ.) DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-3-77-87.
19. Carlos-Escalante J. A., de Jesús-Sánchez M., Rivas-Castro A., Pichardo-Rojas P. S., Arce C., Wegman-Ostrosky T. The use of antihypertensive drugs as coadjuvant therapy in cancer. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:660943. DOI: 10.3389/fonc.2021.660943.
20. Caban A., Pisarczyk K., Kopacz K., Kapuśniak A., Toumi M., Rémuzat C., Kornfeld A. Filling the gap in CNS drug development: evaluation of the role of drug repurposing. *J Mark Access Health Policy*. 2017;5(1):1299833. DOI: 10.1080/20016689.2017.1299833.
21. Posner J. The role of precision medicine in child psychiatry: what can we expect and when? *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2018;57(11):813–817. DOI: 10.1016/j.jaac.2018.07.874.
22. Dwyer J. B., Aftab A., Radhakrishnan R., Widge A., Rodriguez C. I., Carpenter L. L., Nemeroff C. B., McDonald W. M., Kalin N. H. Hormonal treatments for major depressive disorder: state of the art. *American Journal of Psychiatry*. 2020;177(8):686–705. DOI: 10.1176/appi.ajp.2020.19080848.
23. Çakici N., van Beveren N. J. M., Judge-Hundal G., Koola M. M., Sommer I. E. C. An update on the efficacy of anti-inflammatory agents for patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Psychological Medicine*. 2019;49(14):2307–2319. DOI: 10.1017/S0033291719001995.
24. Alkhodri A., Suslina S. N. Development of Celecoxib Granules for Manufacturing of Prolonged Release Celecoxib Capsules and Tablets. *Drug development & registration*. 2022;11(1):68–73. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-68-73.

25. Rosenberg L., Rosenberg M., Sharp S., Thomas C. R., Humphries H. F., Holzer C. E., Herndon D. N., Meyer W. J. Does acute propranolol treatment prevent posttraumatic stress disorder, anxiety, and depression in children with burns? *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2018;(2):117–123. DOI: 10.1089/cap.2017.0073.
26. Carboni E., Carta A. R., Carboni E., Novelli A. Repurposing ketamine in depression and related disorders: can this enigmatic drug achieve success? *Frontiers in Neuroscience*. 2021:30(15):657714. DOI: 10.3389/fnins.2021.657714.
27. Bumb J. M., Enning F., Leweke F. M. Drug repurposing and emerging adjunctive treatments for schizophrenia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2015;16(7):1049–1067. DOI: 10.1517/14656566.2015.1032248.
28. De Giorgi R., Martens M., Rizzo Pesci N., Cowen P. J., Harmer C. J. The effects of atorvastatin on emotional processing, reward learning, verbal memory and inflammation in healthy volunteers: An experimental medicine study. *Journal of Psychopharmacology*. 2021;35(12):1479–1487. DOI: 10.1177/02698811211060307.
29. Yan T., Goldman R. D. Bupropion for smoking cessation in adolescents. *Canadian Family Physician*. 2021;67(10):743–745. DOI: 10.46747/cfp.6710743.
30. Ankarfeldt M. Z., Petersen J., Andersen J. T., Fernandes M. F. S., Li H., Motsko S. P., Fast T., Jimenez-Solem E. Duloxetine Exposure During Pregnancy and the Risk of Spontaneous and Elective Abortion: A Danish Nationwide Observational Study. *Drugs – Real World Outcomes*. 2021;8(3):289–299. DOI: 10.1007/s40801-021-00252-9.
31. Terziyan V., Kaikova O. Neural Networks with Disabilities: An introduction to complementary artificial intelligence. *Neural Computation*. 2021;34(1):255–290. DOI: 10.1162/neco_a_01449.
32. Gottlieb A., Stein G. Y., Ruppin E., Sharan R. PREDICT: A method for inferring novel drug indications with application to personalized medicine. *Molecular Systems Biology*. 2011;7(1):496. DOI: 10.1038/msb.2011.26.
33. Liu Z., Fang H., Reagan K., Xu X., Mendrick D. L., Slikker W. Jr., Tong W. In silico drug repositioning: What we need to know. *Drug Discovery Today*. 2013;18(3–4):110–115. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.08.005.
34. Napolitano F., Zhao Y., Moreira V. M., Tagliaferri R., Kere J., D'Amato M., Greco D. Drug repositioning: a machine-learning approach through data integration. *Journal of Cheminformatics*. 2013;5(1):30. DOI: 10.1186/1758-2946-5-30.
35. Menden M. P., Iorio F., Garnett M., McDermott U., Benes C. H., Ballester P. J., Saez-Rodriguez J. Machine learning prediction of cancer cell sensitivity to drugs based on genomic and chemical properties. *PLOS One*. 2013;8(4):61318. DOI: 10.1371/journal.pone.0061318.
36. LeCun Y., Bengio Y., Hinton G. Deep learning. *Nature*. 2015;521(7553):436–444. DOI: 10.1038/nature14539.
37. Aliper A., Plis S., Artemov A., Ulloa A., Mamoshina P., Zhavoronkov A. Deep learning applications for predicting pharmacological properties of drugs and drug repurposing using transcriptomic data. *Molecular Pharmaceutics*. 2016;13(7):2524–2530. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00248.
38. Azuaje F. Drug interaction networks: an introduction to translational and clinical applications. *Cardiovascular Research*. 2013;97(4):631–641. DOI: 10.1093/cvr/cvs289.
39. Mayr A., Klambauer G., Unterthiner T., Hochreiter S. DeepTox: Toxicity prediction using deep learning. *Frontiers in Environmental Science*. 2016;3:80. DOI: 10.3389/fenvs.2015.00080.
40. Gupta R., Srivastava D., Sahu M., Tiwari S., Ambasta R. K., Kumar P. Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery. *Molecular Diversity*. 2021;25(3):1315–1360. DOI: 10.1007/s11030-021-10217-3.
41. Ekins S., Puhl A. C., Zorn K. M., Lane T. R., Russo D. P., Klein J. J., Hickey A. J., Clark A. M. Exploiting machine learning for end-to-end drug discovery and development. *Nature Materials*. 2019;18(5):435–441. DOI: 10.1038/s41563-019-0338-z.
42. Corsello S. M., Bittker J. A., Liu Z., Gould J., McCarren P., Hirschman J. E., Johnston S. E., Vrcic A., Wong B., Khan M., Asiedu J., Narayan R., Mader C. C., Subramanian A., Golub T. R. The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource. *Nature Medicine*. 2017;23(4):405–408. DOI: 10.1038/nm.4306.

XIII Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием
«МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО»
на протяжении долгого времени является местом встречи студентов, аспирантов, молодых учёных и специалистов, работающих в области фармации.

В ходе дискуссии участникам предстоит рассмотреть широкий круг актуальных профессиональных проблем, обменяться накопленным опытом и передовыми практиками.

Пленарное заседание пройдет в рамках проведения **Международной выставки и форума по фармацевтике и биотехнологиям IPhEB Russia**

ФОРМАТЫ УЧАСТИЯ

- публикация тезисов, без участия в работе секций (без доклада), без участия в конкурсной программе научных работ;
- участие в конкурсной программе научных работ, публикация тезисов, доклад на кафедральной и тематической секциях.

Тезисы публикуются в сборнике «Материалы XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО» с индексацией в РИНЦ.

Официальные языки конференции: русский, английский.

Официальный сайт конференции:
https://spcpu.ru/youngph/

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-192-198
UDC 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Research article

Development and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Analysis of Riluzole in Human Plasma and Its Application on a Bioequivalence Study

Sevda Mohammadzadeh[1], Faranak Salmannejad[2] ✉, Mehdi Mohammadzadeh[1, 3], Tayebeh Ghari[1], Sima Sadrai[4], Jalal Zaringhalam[5]

[1] Pharmacoeconomy & Medical-Pharma Management Research Center, Tehran, Iran
[2] Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[3] Department of Pharmacoeconomy & Administrative Pharmacy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Division of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

✉ **Corresponding author:** Faranak Salmannejad. **E-mail:** salmannejad.f@gmail.com

ORCID: Sevda Mohammadzadeh – https://orcid.org/0000-0003-2723-5056; Faranak Salmannejad – https://orcid.org/0000-0002-4914-2734; Mehdi Mohammadzadeh – https://orcid.org/0000-0002-0587-7229; Tayebeh Ghari – https://orcid.org/0000-0002-7274-7977; Sima Sadrai – https://orcid.org/0000-0003-0481-9702; Jalal Zaringhalam – https://orcid.org/0000-0003-4637-1686.

Received: 14.09.2022 **Revised:** 08.02.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. As the first approved drug for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) treatment, riluzole is known as a glutamatergic neurotransmission inhibitor administrated in 50 mg tablets twice daily. For this reason, a generic product of riluzole has been developed at a lower price by Hogar-Daroo, Iran, which would benefit patients.

Aim. The objective of this study is to develop and validate a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of riluzole in human plasma samples and its application in the bioequivalence study of riluzole tablet.

Materials and methods. The chromatography was performed by using a C18 column (100 mm, 4.6 mm, 5 mm), 0.1 % formic acid and acetonitrile (60 : 40, v/v) as the mobile phase, at a flow rate of 0.90 ml/min in the gradient program. Carbamazepine was used as an internal standard (IS). The method employed only 100 µL of human plasma for quantification by a liquid-liquid extraction technique. The multiple reaction monitoring modes (MRM) was used for quantification of ion transitions m/z 235.0/165.9 and m/z 137.6/110.0 for riluzole and the m/z 236.9/194.0 for the IS. Dwell time was set at 200 ms.

Results and discussion. The calibration curve was linear over the concentration range 0.5–300 ng/mL. The lower limit of quantitation (LLOQ) was obtained at 0.5 ng/mL. The intra-day and inter-day accuracy ranged from 93.21 % to 101.34 % and 91.77 % to 104.88 % respectively. The intra-day and inter-day precision values ranged from 2.19 % to 5.69 % and 1.67 % to 5.31 % respectively, all within the FDA acceptable ±15 %.

Conclusion. The validated method was applied in Iranian healthy subjects under fasting condition with a 50 mg riluzole tablet successfully.

Keywords: riluzole, amyotrophic lateral sclerosis, bioequivalence, LC-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. Sevda Mohammadzadeh – writing the article. Tayebeh Ghari, Sima Sadrai – methodology and investigation. Tayebeh Ghari – software and statistical analysis. Faranak Salmannejad – review and editing. Mehdi Mohammadzadeh, Jalal Zaringhalam – supervisors.

Acknowledgment. The authors wish to thank Hezareh Sevom Futuristic Pharmacists and Hogar-Daroo companies for their financial support.

Compliance with the principles of ethics. The Iranian Registry of Clinical Trials approved the study protocol of the fasting condition with the IRCT ID of IRCT20200625047913N1.
No animals were used in this study. All the human experiments were conducted as per the guidelines of Helsinki declaration.

For citation: Mohammadzadeh S., Salmannejad F., Mohammadzadeh M., Ghari T., Sadrai S., Zaringhalam J. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of riluzole in human plasma and its application on a bioequivalence study. *Drug development & registration*. 2023;12(1):192–198. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-192-198

INTRODUCTION

As an orphan and destructive disease of the nervous system, ALS can affect the brain and spinal cord nerve cells and ultimately lead to many problems, including muscle weakness and premature death [1, 2]. Unfortunately, most ALS patients do not survive more than 2 to 5 years due to the disease's progressive nature [3, 4]. Riluzole increases the average survival of patients by 3 to 6 months [5]. Usually, the dosage for riluzole tablets is 50 mg twice a day for the treatment of ALS. This report compares the pharmacokinetic parameters of riluzole 50 mg tablet manufactured by Hogar-Daroo versus Rilutek® 50 mg tablet manufactured by Sanofi Aventis Pharma to reveal the bioequivalence between the generic riluzole and the reference product.

© Mohammadzadeh S., Salmannejad F., Mohammadzadeh M., Ghari T., Sadrai S., Zaringhalam J., 2023

To measure riluzole in plasma samples, we needed a valid method. When we reviewed the literature, we found that Narapusetti et al. developed an LC-MS/MS employing a protein precipitation method for sample preparation [6]. Vikram et al. used a solid phase extraction technique to develop an LC-MS/MS method for the analysis of riluzole, which required 500 µL of human plasma, and the LLOQ of the method was 5 ng/mL [7]. Finally, we found that Chando et al. developed a method for analyzing riluzole that used LC-MS/MS. The method required a minimum of 200 µL of human plasma, and the LLOQ of the method was 0.5 ng/mL [8]. Although the last method seemed suitable, it was not the answer to our work. Therefore, we developed another method for determining riluzole in human plasma using an LC- MS/MS device. Also, since riluzole has a high protein binding and causes a high matrix effect in LC-MS/MS analysis, we used a liquid-liquid extraction method to separate riluzole and internal standard from plasma, and the required volume of plasma for the process was low (100 microliters). The sensitivity of the method was 0.5 ng/ml as well.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

Riluzole and carbamazepine USP reference standard were purchased commercially. HPLC-grade acetonitrile and methanol, analytical grade of formic acid, TBME (tertiary-butyl methyl ether) and NaOH were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All solutions were prepared with sterile deionized water (Millipore Company, USA). Human (K2 EDTA) plasma was obtained from Blood Transfusion Organization of Iran (Tehran, Iran).

The test product, Amyoger® 50 mg tablet (Batch No.: 005, Exp. Date: 10/2021), was manufactured by Hogar-Daroo. Co., Iran. The reference product, Rilutek® 50 mg tablet (Batch No.: 9L46E, Exp. Date: 02/2022), was manufactured by Sanofi Aventis Pharma Limited, UK.

Design of Study

The design of the study was as follows: open-label, single-dose, randomized, two sequences and two-period crossover. The generic riluzole 50 mg tablet of Hogar-Daroo Co., Iran, and the reference product, Rilutek® 50 mg tablet of Sanofi Aventis, UK, in normal, healthy males and females and adult subjects, were studied under fasting conditions[1]. The washout period was ten days between treatments[2]. This study was conducted at the bioequivalence study center, Hezareh Sevom laboratory (Tehran, Iran), in accordance with International Conference on Harmonization, E6 Good Clinical Practice (ICH, E6 GCP) guidelines[3], and local laws and regulations. The Iranian Registry of Clinical Trials approved the study protocol of the fasting condition with the IRCT ID of IRCT20200625047913N1.

The order of acquiring each subject's test and reference products during both study periods was determined according to a randomization plan rendered with SAS® software.

Subject Design

Twenty-four healthy Iranian adult volunteers for fasting conditions were randomized to participate in this study. The number of subjects was determined based on literature review and considering indicators such as power ≥80, significance level 5 %, and bioequivalence limits = 80.00–125.00 %. People aged 18 to 55 years with a body mass index (BMI) between 18–25 kg/m^2 were included in the study. Routine laboratory tests (blood and urine) were taken from all people. Also, people were subjected to physical examination and ECG tests to ensure their full health. All aspects (good and bad) of participating in the study were explained to the subjects and they read and signed an informed consent document before starting the study. All participants were insured during the survey[4, 5].

Blood Sampling and Storage

All participants took a single dose of riluzole orally with 200 mL of water. 3 ml blood samples were drawn before administering the drug to the volunteers and 1, 2, 3, 4, 4.5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11, 12, 24, and 48 hours post-dose and collected in K2 EDTA collection

[1] Guidance on riluzole: US Food and Drug Administration. 2008. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Riluzole_tab_20599_RC11-04.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[2] Rilutek® (riluzole) tablets: US Food and Drug Administration. 2008. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020599s011s012lbl.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[3] Guidance for industry: E6 good clinical practice integrated addendum to ich e6(r1) Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2018 Available at: https://www.fda.gov/media/93884/download. Accessed: 01.12.2022.

[4] Guidance for industry: Food–effect bioavailability and fed bioequivalence studies Rockville, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2002. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Food-Effect-Bioavailability-and-Fed-Bioequivalence-Studies.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[5] Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products–general considerations Rockville, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2002. Available at: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/ucm154838.pdf. Accessed: 01.12.2022.

tubes. A centrifuge at 4000 rpm for 15 minutes at 4 °C was used to separate the plasma. The collected plasma was kept at –80 °C until use[1, 2].

Plasma Sample Preparation

Before starting the analysis, the frozen plasma was thawed and brought to room temperature. Then the samples were vortexed for ten seconds. Then, 100 microliters of human plasma containing carbamazepine (IS) with a concentration of 500 ng/ml were added to the samples and mixed. To these samples, 100 µL of 1 N NaOH was added and briefly vortexed, followed by adding 1.25 mL of TBME and, after capping, vortexed for 10 min. After centrifuging samples at 4,000 rpm and ambient temperature for about 15 min, The supernatant was transferred into tubes and dried under nitrogen at 40 °C. The dried residue was diluted with formic acid (0.1 %)/acetonitrile (60:40 v/v) and vortexed until wholly dissolved. The dissolved residue was transferred to an autosampler vial and injected (20 µl) into the chromatography system[3, 4].

Bioanalytical Method Development

The Agilent 1200 Series Gradient HPLC system fitted with a binary pump, an autosampler, and a solvent degasser is used in this study. As mobile phase, acetonitrile and methanol were tested in different ratios with buffers like ammonium acetate and ammonium formate and acid additives like formic acid and acetic acid in differing strengths. In addition, flow rates from 0.50 to 1 mL/min were also investigated to achieve good peak shape and shorter run time. An Agilent 6460 mass spectrometer fitted with an MS-MS detector was applied in positive ion mode to detect riluzole and the IS. The voltage of the ion spray was put at 5000 V. The compound parameters viz. the fragmentor potential and collision energy were 90/41 V and 81/27 V for riluzole and the IS, respectively.The multiple reaction monitoring modes (MRM) were utilized to quantify ion transitions m/z 235.0/165.9 and m/z 137.6/110 for riluzole and m/z 236.9/194 for the IS. Dwell time was selected at 200 ms. Processing of obtained data was done by Masshunter Quant software[5, 6] [9].

Preparation of Stock and Working Solutions of Riluzole and IS

Two methanolic standard stock solutions of riluzole were prepared separately (1 mg/mL). One of the stock solutions was used to prepare working standard solutions by diluting a mixture of methanol and water (50:50, V/V; diluent). The quality control (Q.C.) samples were prepared to determine accuracy and precision using the second stock solution. A methanolic stock solution of carbamazepine (1 mg/mL) was prepared and used for working standard preparation of carbamazepine (500 ng/mL)[7, 8] [9].

For the preparation of calibration samples, 900 µL of human plasma was mixed with the 100 µL working standard solution of the analyte to obtain riluzole concentration levels of 0.5, 2.5, 5, 10, 50, 150, 200, 300 ng/mL. Similarly, the quality control samples were prepared by using the standard drug at concentrations of 0.5 (lower limit of quantitation quality control, LLOQ

[1] Guidance for industry: Food–effect bioavailability and fed bioequivalence studies Rockville, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2002. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Food-Effect-Bioavailability-and-Fed-Bioequivalence-Studies.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[2] Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products–general considerations Rockville, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2002. Available at: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/ucm154838.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[3] Guidance for industry: Food–effect bioavailability and fed bioequivalence studies Rockville, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2002. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Food-Effect-Bioavailability-and-Fed-Bioequivalence-Studies.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[4] Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products–general considerations Rockville, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2002. Available at: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/ucm154838.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[5] Guidance for industry: Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2015. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[6] Guidance for industry: Bioanalytical method validation Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2018. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[7] Guidance for industry: Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2015. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[8] Guidance for industry: Bioanalytical method validation Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2018. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf. Accessed: 01.12.2022.

QC), 7.5 (low-quality control, LQC), 25 (medium-quality control, MQC1), 125 (MQC2) and 250 ng/mL (high-quality control, HQC[1, 2] [9].

Method Validation

The developed bioanalytical method was fully validated based on US-FDA guidelines on bioanalytical method validation. The calibration curve, linearity, accuracy, precision, matrix effect, extraction recovery, carry-over effect, and stability were assessed and then applied in the bioequivalence study of riluzole tablets[3, 4] [9–11].

Pharmacokinetics Data

Calculation of Pharmacokinetic Parameters

Pharmacokinetic parameters (C_{max}, T_{max}, AUC_{0-t}, $AUC_{0-\infty}$, k_e, $t_{1/2}$) of human samples were calculated by pk pharmacokinetic software. The sampling duration was 3 to 5 times the drug's half-life. According to the FDA guidelines, the acceptable range for AUC ratio was considered higher than 80 %[5].

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) and 90 % confidence intervals (90 % CIs) of the ratios test/reference was used to determine bioavailability parameters. The products were considered bioequivalent when the ratio of averages of log-transformed data fell within 80–125 % for AUC_{0-t}, $AUC_{0-\infty}$, C_{max}, and T_{max}[6].

RESULT AND DISCUSSION

Method Development

In this study, the effect of various variables on the response of the LC-MS/MS technique was tested and investigated, and finally, an optimal method was developed for measuring riluzole in human plasma. A combination of 0.1 % formic acid and acetonitrile with different volume ratios was used as the mobile phase composition. Finally, when the ratio (60 : 40, V/V) was applied gradually at a flow rate of 0.9 mL/min, it showed the optimum separation, elution, and peak shape (Table 1).

Table 1. **Gradient HPLC method**

Time (min)	Mobile phase: A (Formic acid 0.1 %)	Mobile phase: B (Acetonitrile)	Flow rate (mL/min)
0	60	40	0.9
3.5	60	40	0.9
3.6	30	70	0.9
5.5	30	70	0.9
6	60	40	0.9

In this method, a C18 column (10 cm × 4.6 mm I.D., 5.0 µm particle) was used, and riluzole and IS were separated and eluted from each other in 2.054 min and 1.48 min, respectively (Figure 1). The volume of injection into the column was 20 microliters.

Positive ionization was generated on the analyte and IS utilizing an electrospray ionizer. Therefore, the precursor ion in the Q1 spectrum was the protonated form of the analyte and the IS, [M + H] + ion, which was used to obtain the Q3 product ion spectra. The most sensitive mass transfer ion spectra were from m/z 235.0 to 137.6 and from m/z 236.9 to 194.0 for riluzole and IS, respectively.

Method Validation

Linearity

Calibration curves were obtained by plotting the riluzole peak area / IS peak area against concentration. The analyte showed good linearity in the 0.5–300 ng/mL concentration range. The weighting factor (1/x and $1/x^2$) were fitted to obtain the most suitable concentration-signal relationship, and the $1/x^2$ model showed a better relationship. All curves showed an average correlation coefficient of 0.9981.

[1] Guidance for industry: Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2015. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[2] Guidance for industry: Bioanalytical method validation Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2018. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[3] Guidance for industry: Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2015. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[4] Guidance for industry: Bioanalytical method validation Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2018. Available at: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[5] Guidance for industry: Statistical approaches to establishing bioequivalence Rockville MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2001. Available at: https://www.fda.gov/media/70958/download. Accessed: 01.12.2022.

[6] Guidance for industry: Statistical approaches to establishing bioequivalence Rockville MD: US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2001. Available at: https://www.fda.gov/media/70958/download. Accessed: 01.12.2022.

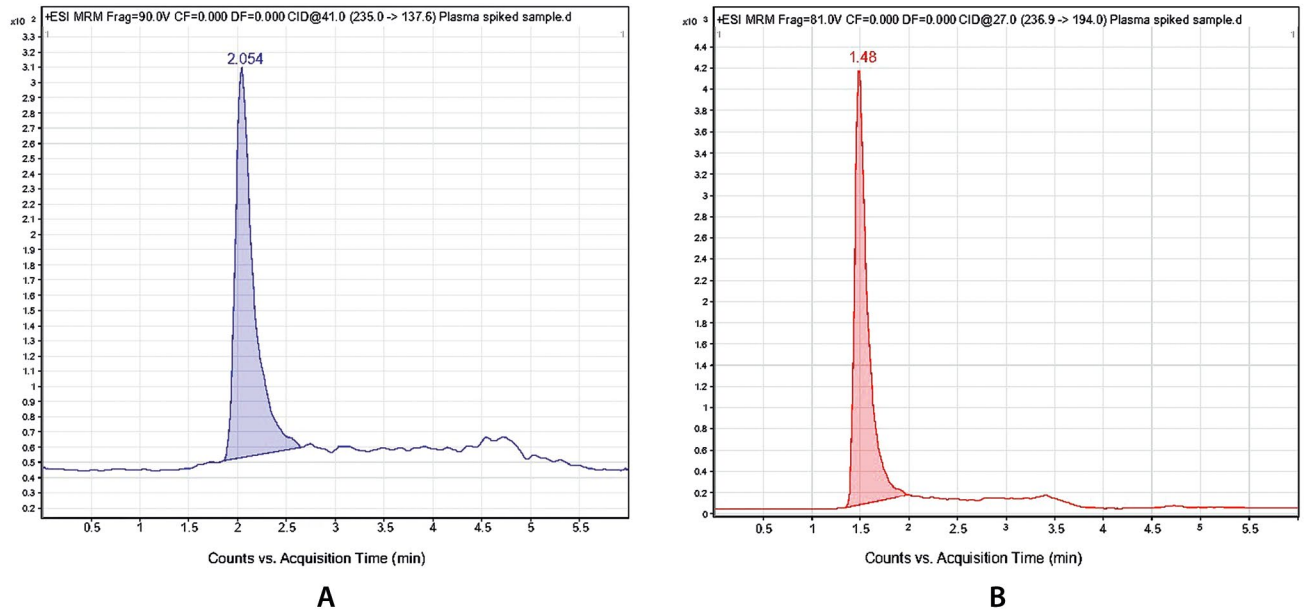


Figure 1. **Typical MRM chromatograms of riluzole (A) and the IS (B)**

Accuracy and Precision

Intra and inter-day accuracy and precision (%CV) of the current method were determined at four QC concentrations and LLOQ (Table 2). Intra-day accuracy was within 93.21 to 101.34 %, and inter-day accuracy was within 91.77 to 104.88 %. Intra-day precision ranged from 2.19 to 5.69 % and interday precision ranged from 1.67 to 5.31 %, all were in FDA acceptable range (±15 %). The current method has adequate accuracy, precision, and reproducibility for measuring riluzole in the plasma samples.

Table 2. **Intra and inter-day accuracy and precision (%CV) for riluzole**

Concentration (ng/mL)	Precision (% CV)	Accuracy (%)
Intra-day data (n = 6)		
0.5	5.69	96.31
7.5	4.23	98.75
25	2.19	101.34
125	3.56	100.62
250	2.98	93.21
Inter-day data (n = 30)		
0.5	5.31	98.89
7.5	3.21	102.55
25	1.67	91.77
125	4.56	100.31
250	3.66	104.88

Matrix Effect and Extraction Recovery

Since the plasma matrix may increase or decrease the ion signal, it should be considered to evaluate the ion signal strength [12, 13]. In this study, the rate of matrix effect was from 100.08 to 100.99, It shows that the plasma matrix had no pronounced effect on the ionization of the analyte (Table 3, Figure 2).

Table 3. **Matrix effect and recovery values for riluzole**

Concentration (ng/mL)	Matrix effect (%)	Recovery (%)
7.5	100.23	78
25	100.56	81
125	100.99	83
250	100.08	82

Since riluzole has high protein binding and binds to lipoproteins [14, 15], it is not easy to recover it from plasma. In the present method, we recovered up to 83 % (Table 3). Although this amount of recovery from plasma is considered relatively modest, given that the developed liquid-liquid extraction method is highly consistent (low CV values), we were able to use it to analyze samples confidently.

Carry over Effect

In order to check the effect of carryover on the current method, the highest concentration of analyte with is was injected into the device and after the injection of the blank sample, no effect of the previous injection was observed, which indicates the lack of influence of the analyzed sample and the internal standard on subsequent injections.

Stability

The stability results are depicted in Table 4. Riluzole was found stable in plasma at 25 ± 2 °C for 4 hours and three cycles of freeze-thaw. The stability of processed sample after 24 hours in the autosampler (25 ± 2 °C) was acceptable. The long-term stability of riluzole

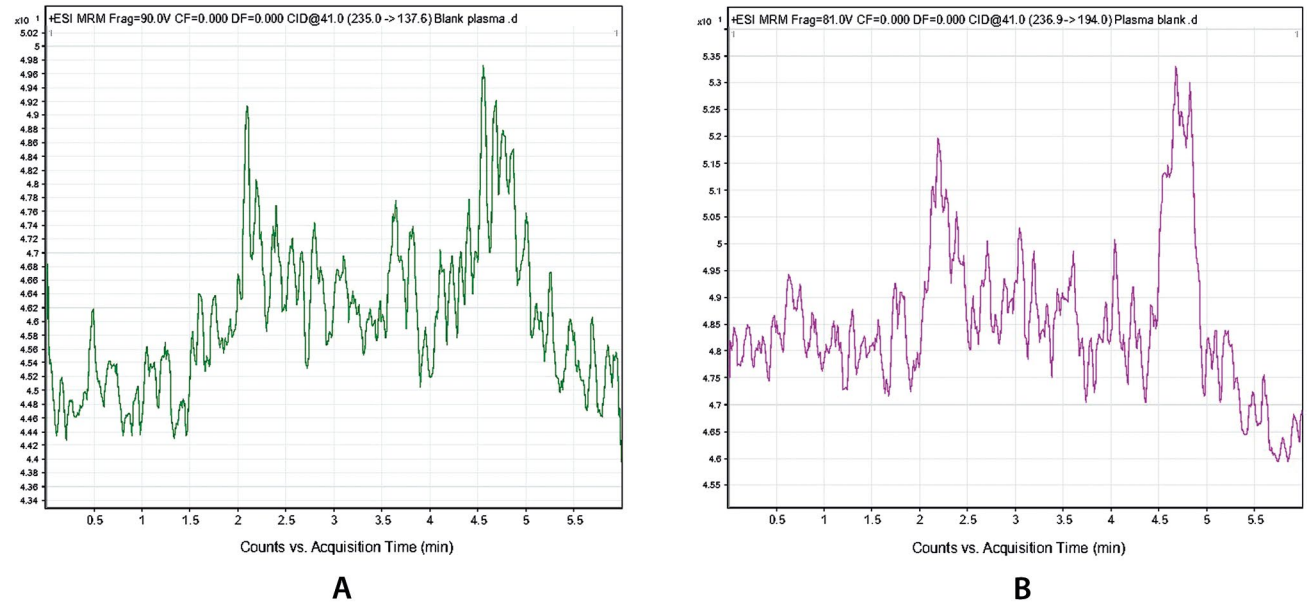


Figure 2. **Blank plasma spectra of riluzole (A) and carbamazepine (B)**

Table 4. **Stability testing of riluzole in plasma (n=6)**

Stability condition	Temperature	Concentration (ng/mL)					
		7.5		125		250	
		Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
Bench-top (4 hr.)	Room temperature	94.12	5.93	93.81	3.71	98.34	2.35
Processed sample (24 hr.)	Room temperature	101.54	6.01	98.05	2.99	99.11	1.99
Freeze-Thaw (3 cycles)	–80 to room temperature	102.33	5.48	105.03	3.15	101.77	2.36
Long term (1 month)	–80	97.60	6.12	99.76	1.56	95.34	3.87

plasma samples showed its stability for one month at –80 °C. These results revealed that riluzole was stable for application in the routine analysis.

Calculation of Pharmacokinetic Parameters

The current method successfully quantified riluzole (50 mg) in blood samples of 24 healthy volunteers under fasting conditions. Figure 3 exhibits the mean plasma concentration versus time profile of riluzole. Table 5 shows mean pharmacokinetic parameters of riluzole from test and reference products. The test/reference ratio of the pharmacokinetic parameter is shown in Table 6.

Table 6. **The ratio of test/reference of pharmacokinetic parameters**

	Pharmacokinetic parameters (Ratio test/reference)					
	C_{max}	T_{max}	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$	K_e
Mean	0.945	1.000	0.994	0.994	1.006	0.998
SD	0.038	0.000	0.044	0.041	0.065	0.069
CV (%)	4.012	0.000	4.451	4.142	6.469	6.911

Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) and the 90 % confidence intervals (90 % CI) for the ratio of C_{max}, T_{max}, AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ for the test and reference products are shown in Table 7.

Table 5. **Pharmacokinetic study results of riluzole (*n* = 24)**

Product		Pharmacokinetic parameters					
		C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	AUC_{0-t} (ng.hr/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.hr/mL)	$t_{1/2}$ (hr)	K_e (hr^{-1})
Test	Mean	157	0.9	692.0	766.4	13.8	0.051
	SD	19	0.3	33.0	25.6	1.5	0.007
	CV (%)	12	35.8	4.8	3.3	11.1	12.88
Reference	Mean	166	0.9	696.7	771.9	13.8	0.051
	SD	18	0.3	29.8	21.4	1.6	0.007
	CV (%)	11	35.8	4.3	2.8	11.6	12.88

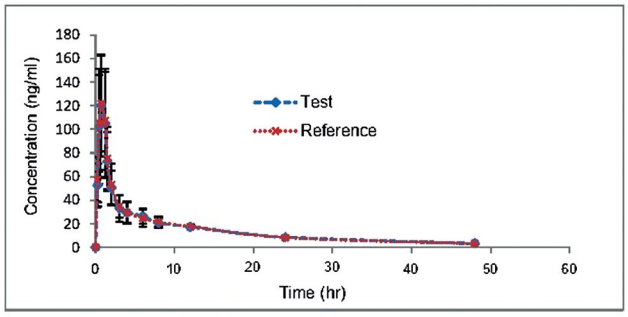


Figure 3. Linear plot of mean (±SD) plasma concentration of riluzole (one 50 mg tablet) versus time curves after oral administration of test product and reference product in healthy volunteers under fasting condition (*n* = 24)

Table 7. Analysis of variance (ANOVA) and the 90 % confidence intervals (90 % CI) for the ratio of Cmax, Tmax, AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$

Pharmacokinetic parameters	ANOVA (P-value)	90% confidence intervals for the ratio
C_{max}	0.09	0.93–0.96
T_{max}	1	1
AUC_{0-t}	0.61	0.98–1.01
$AUC_{0-\infty}$	0.42	0.98–1.01

For all pharmacokinetic parameters, the ratio of test/reference with 90 % confidence intervals (90 CIs) was within the acceptable range (80–125 %). P values for all parameters are >0.05 [16, 17]. Therefore, it can be supposed that test and brand riluzole tablets are biologically equivalent and can be used interchangeably.

CONCLUSION

This study developed a new analytical method for determining riluzole in plasma by LC-MS/MS. The amount of plasma used for liquid-liquid extraction was 100 microliters. Acceptable precision, accuracy, and sensitivity for estimating riluzole in human plasma samples were achieved by this method. The minimum detectable amount of riluzole with this method was 0.5 ng/ml, and this method was successfully used to study the bioequivalence of 50 mg riluzole tablets in Iranian volunteers under fasting conditions.

REFERENCES

1. Qiu Y., Chen Y., Zhang G., Yu L., Mantri R. V., editors. Developing solid oral dosage forms. 2 edition. Boston: Academic Press; 2017. P. 1127–1160.
2. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*. 1996;47(6–4):S233–S241. DOI: 10.1212/wnl.47.6_suppl_4.233s.
3. Longinetti E., Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: An update of recent literature. *Curr Opin Neurol*. 2019;32(5):771–776. DOI: 10.1097/wco.0000000000000730.
4. Masrori P., Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: A clinical review. *Eur J Neurol*. 2020;27(10):1918–1929. DOI: 10.1111/ene.14393.
5. Oskarsson B., Gendron T. F., Staff N. P. Amyotrophic lateral sclerosis: An update for 2018. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(11):1617–1628. DOI: 10.1016/j.mayocp.2018.04.007.
6. Narapusetti A., Bethanabhatla S. S., Sockalingam A., Pilli N. R., Repakab N., Allaf T. Bioanalysis of riluzole in human plasma by a sensitive lc-ms/ms method and its application to a pharmacokinetic study in south indian subjects. *Analytical Methods*. 2014;6(13):4823–4830. DOI: 10.1039/C4AY00583J.
7. Vikram P., Shanmugasundaram P. Determination of riluzole in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (uplc-ms/ms) and its application to a pharmacokinetic study. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2017;10(1):193–199. DOI: 10.5958/0974-360X.2017.00042.7.
8. Chandu B. R., Nama S., Kanala K., Challa B. R., Shaik R. P., Khagga M. Quantitative estimation of riluzole in human plasma by LC-ESI-MS/MS and its application to a bioequivalence study. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398(3):1367–1374. DOI: 10.1007/s00216-010-4034-8.
9. Zimmer D. New us fda draft guidance on bioanalytical method validation versus current fda and ema guidelines: Chromatographic methods and isr. *Bioanalysis*. 2014;6(1):13–19. DOI: 10.4155/bio.13.298.
10. 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 and registration*. 2022;11(2):187–196. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-187-196.
11. Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*. 2003;75(13):3019–3030. DOI: 10.1021/ac020361s.
12. Caban M., Migowska N., Stepnowski P., Kwiatkowski M., Kumirska J. Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of β-blockers and β-agonists in environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 2012;1258:117–127. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.08.029.
13. Chow D. S., Teng Y., Toups E. G., Aarabi B., Harrop J. S., Shaffrey C. I., Johnson M. M., Boakye M., Frankowski R. F., Fehlings M. G., Grossman R. G. Pharmacology of riluzole in acute spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2012;17(1):129–140. DOI: 10.3171/2012.5.Aospine12112.
14. Nagoshi N., Nakashima H., Fehlings M. G. Riluzole as a neuroprotective drug for spinal cord injury: From bench to bedside. *Molecules*. 2015;20(5):7775–7789. DOI: 10.3390/molecules20057775.
15. Wagner M. L., Landis B. E. Riluzole: A new agent for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Pharmacother*. 1997;31(6):738–744. DOI: 10.1177/106002809703100614.
16. Chow S. C. Bioavailability and bioequivalence in drug development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 2014;6(4):304–312. DOI: 10.1002/wics.1310.
17. Mathew T. Bioequivalence studies in drug development: Methods and applications by dieter hauschke, volker steinijans, iris pigeot. *International Statistical Review*. 2007;75(2):272–273. DOI: 10.1111/j.1751-5823.2007.00015_24.x.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-206
УДК 615.322 + 616-009

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Нейробиологические эффекты химических соединений видов рода *Astragalus* L. и перспективы их применения в медицине (обзор)

М. А. Березуцкий✉, Н. А. Дурнова, У. А. Матвиенко

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ имени В. И. Разумовского» Минздрава России), 410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

✉ **Контактное лицо:** Березуцкий Михаил Александрович. **E-mail:** berezutsky61@mail.ru

ORCID: М. А. Березуцкий – https://orcid.org/0000-0003-0433-8247; Н. А. Дурнова – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519; У. А. Матвиенко – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165.

Статья поступила: 24.10.2022 **Статья принята в печать:** 09.02.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Род *Astragalus* L. – астрагал – один из крупнейших родов цветковых растений и насчитывает в своем составе не менее 3270 видов. Отдельные виды этого рода давно используются в традиционной и научной медицине. В последние годы виды рода *Astragalus* L. привлекают внимание из-за выявления у его представителей широкого спектра нейробиологических эффектов. В обзоре представлен анализ литературных данных об экспериментальных и отчасти клинических исследованиях разнообразных нейробиологических эффектов экстрактов и химических соединений видов данного рода и перспективах их применения в медицине.

Текст. Установлено разнообразное нейропротективное действие данных соединений. Отмечено, что во многих случаях в качестве механизма нейропротекции выступает ингибирование окислительного стресса, который играет важную роль в развитии ряда нейродегенеративных заболеваний. Химические соединения, содержащиеся в представителях данного рода, защищают нейроны головного мозга от ишемического повреждения, воздействия нейротоксинов и глутамата, отложения бета-амилоида. Было выявлено, что данные вещества ингибируют повышенную активность ацетилхолинэстеразы и процессы димиелинизации. Данные соединения также улучшают когнитивные функции, включая память и обучение. Установлено их противосудорожное действие. Особый интерес представляют данные, свидетельствующие о возможности применения некоторых химических соединений, содержащихся в представителях рода *Astragalus* L., в терапии психических заболеваний, в частности шизофрении.

Заключение. Анализ экспериментальных работ за последние десять лет показывает, что экстракты и химические соединения видов рода *Astragalus* L. обладают весьма разнородным спектром нейробиологического действия и, вероятно, могут найти применение в будущем в качестве средств терапии в неврологической и психиатрической практике. К сожалению, в отличие от большого числа доклинических экспериментов, клинические испытания этих соединений являются единичными. Обращает на себя внимание также, что к настоящему времени в отношении нейробиологической активности исследовано менее одного процента видов этого рода. Таким образом, необходимы более обширные исследования, клинические испытания, исследования по стандартизации и установлению терапевтических доз для человека экстрактов и химических соединений видов рода *Astragalus* L.

Ключевые слова: *Astragalus* L., нейропротективный эффект, влияние на когнитивные функции, противосудорожное действие

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

Вклад авторов. М. А. Березуцкий проводил обзор литературных данных по нейропротективному эффекту экстрактов и химических соединений видов рода *Astragalus* L. Н. А. Дурнова проводила обзор литературных данных по влиянию данных соединений на когнитивные функции. У. А. Матвиенко проводила обзор литературных данных по нейропсихиатрическому и противосудорожному эффектам. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и в написании текста статьи.

Для цитирования: Березуцкий М. А., Дурнова Н. А., Матвиенко У. А. Нейробиологические эффекты химических соединений видов рода *Astragalus* L. и перспективы их применения в медицине. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):199–206. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-206

Neurobiological Effects of Chemical Compounds of Species of the Genus *Astragalus* L. and Prospects for Their Use in Medicine (Review)

Mikhail A. Berezutsky✉, Natalya A. Durnova, Uliana A. Matvienko

Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky (Razumovsky University), 112, Bolshaya Kazachya str., Saratov, 410012, Russia

✉ **Corresponding author:** Mikhail A. Berezutsky. **E-mail:** berezutsky61@mail.ru

ORCID: Mikhail A. Berezutsky – https://orcid.org/0000-0003-0433-8247; Natalya A. Durnova – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519; Uliana. A. Matvienko – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165.

Received: 24.10.2022 **Revised:** 09.02.2023 **Published:** 24.02.2023

© Березуцкий М. А., Дурнова Н. А., Матвиенко У. А., 2023
© Berezutsky M. A., Durnova N. A., Matvienko U. A., 2023

Abstract
Introduction. The genus *Astragalus* L. is one of the largest genera of flowering plants and includes at least 3,270 species. Individual species of this genus have long been used in traditional and scientific medicine. In recent years, species of the genus *Astragalus* L. have attracted attention because of the detection of a wide range of neurobiological effects in its representatives. The review presents an analysis of the literature data on experimental and partly clinical studies of various neurobiological effects of extracts and chemical compounds of species of this genus and the prospects for their use in medicine.
Text. A variety of neuroprotective effects of these compounds has been established. In many cases, inhibition of oxidative stress, which plays an important role in the development of a number of neurodegenerative diseases, has been noted as a neuroprotective mechanism. Chemical compounds contained in representatives of this genus protect brain neurons from ischemic damage, the effects of neurotoxins and glutamate, and beta-amyloid deposition. These substances have been found to inhibit increased acetylcholinesterase activity and dimyelination processes. These compounds also improve cognitive functions, including memory and learning. Their anticonvulsant effect has been established. Of particular interest is the data indicating the possibility of using some chemical compounds contained in representatives of the genus *Astragalus* L. in therapy of mental diseases, particularly schizophrenia.
Conclusion. The analysis of experimental works for the last ten years shows that extracts and chemical compounds of species of the genus *Astragalus* L. have a very heterogeneous spectrum of neurobiological action and, probably, may find application in the future as therapeutic agents in neurological and psychiatric practice. Unfortunately, in contrast to a large number of preclinical experiments, clinical trials of these compounds are sporadic. It is also noteworthy that less than one percent of the species of this genus have been investigated to date with respect to neurobiological activity. Thus, more extensive research, clinical trials, studies to standardize and establish therapeutic doses for humans of extracts and chemical compounds of species of the genus *Astragalus* L. are needed.

Keywords: *Astragalus* L., neuroprotective effect, effect on cognitive functions, anticonvulsant 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. Mikhail A. Berezutsky reviewed the literature data on the neuroprotective effect of extracts and chemical compounds of the genus *Astragalus* L. Natalya A. Durnova reviewed the literature data on the effect of these compounds on cognitive functions. Uliana A. Matvienko conducted a review of literature data on neuropsychiatric and anticonvulsant effects. All authors participated in the discussion of the results and in writing the text of the article.

For citation: Berezutsky M. A., Durnova N. A., Matvienko U. A. Neurobiological effects of chemical compounds of species of the genus *Astragalus* L. and prospects for their use in medicine. *Drug development & registration*. 2023;12(1):199–206. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-206

ВВЕДЕНИЕ

Род *Astragalus* L. – астрагал – относится к числу крупнейших родов цветковых растений и насчитывает в своем составе не менее 3270 видов [1]. Представители рода встречаются на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды и произрастают на самых разнообразных местообитаниях. Отдельные виды этого рода давно используются в традиционной и научной медицине. В настоящее время в медицине наиболее известен *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge, который используется в Китае более двух тысячелетий [2]. Сейчас он нашел применение в научной медицине как эффективное средство, которое усиливает работу иммунной и сердечно-сосудистой систем [3], показывает противораковую активность [4], а также обладает целой серией антивозрастных эффектов, включая эффект удлинения теломер. На основе этого растения создано несколько препаратов – «TA-65», «Astragaloside IV», «PG2», «TAT2», «Astragalus» и др. [5]. В нашей стране широко известен *A. dasyanthus* Pall., который ранее был включен в Государственную фармакопею РФ.

Однако химический состав и биологическая активность подавляющей части видов этого огромного рода к настоящему времени оставались неизученными. В последние годы процесс исследования фармакологических свойств видов рода *Astragalus* L. идет очень активно как в нашей стране, так и за рубежом [6]. Появляется большое количество экспериментальных работ, среди которых, на наш взгляд, особый интерес представляют публикации по нейробиологическим эффектам экстрактов и химических соединений видов *Astragalus* L. Это связано с тем, что в отношении многих нейродегенеративных заболеваний отсутствует эффективная терапия. Существующие препараты могут только облегчить симптомы временно, а не остановить или замедлить прогрессирование этих заболеваний [7]. Все это говорит о необходимости расширения круга поиска в этой области фармацевтики и создания новых эффективных препаратов.

Цель данного обзора – обобщить и проанализировать экспериментальные данные по выявлению нейробиологических эффектов у представителей рода *Astragalus* L. и определить виды этого рода, наиболее перспективные для дальнейшего детального изучения и разработки на их основе лекарственных средств.

Нейропротективное действие

В ряде экспериментов, в которых были использованы различные повреждающие факторы, получены доказательства нейропротективного действия экст-

ракта и отдельных химических соединений нескольких видов *Astragalus* L. Установлено, что механизмы, участвующие в реализации данного эффекта разнообразны. Значительный интерес представляет тот факт, что во многих случаях в качестве механизма нейропротекции выступает ингибирование окислительного стресса, который играет важную роль в развитии ряда нейродегенеративных заболеваний. Это особенно актуально в связи с тем, что на сегодняшний день в неврологической практике отсутствуют антиоксидантные препараты с клинически доказанным нейропротективным эффектом [8].

Несмотря на то, что этиология болезни Паркинсона до сих пор во многом не ясна, установлено, что патогенез данного заболевания связан с гибелью дофаминергических нейронов в *pars compacta* черной субстанции мозга, снижением содержания дофамина в стриатуме и хроническим воспалением микроглии [9]. Сапонин астрагалозид IV, выделенный из корней *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge (произрастает в Китае, Монголии, Восточной Сибири), показал способность защищать дофаминергические нейроны при экспериментальной модели болезни Паркинсона. Модель была создана при помощи обработки первичной культуры дофаминергических нейронов нейротоксином 6-гидроксидофамином. Это привело к массовой гибели и дегенерации нейронов. Предварительная обработка клеток астрагалозидом IV в концентрациях 100 и 200 мкМ привела к тому, что большинство дофаминергических нейронов оставались неповрежденными. Наблюдалось также значительное и дозозависимомое восстановление тирозингидроксилаза-иммунопозитивных клеток, фермент которых принимает непосредственное участие в синтезе дофамина. При концентрации 100 мкМ увеличивались также уровни иммунореактивности тирозингидроксилазы и синтазы оксида азота [10]. Астрагалозид IV оказал также протекторное воздействие на клетки нейробластомы SH-SY5Y (используются во многих современных исследованиях паркинсонизма), которые также подвергались обработке 6-гидроксидофамином (6-OHDA). Это привело к гибели 50 % клеток. Предварительная (за 2 часа) обработка данных клеток астрагалозидом IV в концентрациях 25, 50 и 100 мкМ значительно ($p < 0,01$) повышала их выживаемость. Однако при концентрации 150 мкМ выживаемость клеток начала снижаться, что говорит о том, что данная концентрация обладает определенными токсическими и побочными эффектами на SH-SY5Y клетки. Астрагалозид IV повысил также экспрессию маркера дендритов нейронов MAP2 и восстановил морфологические повреждения клеток SH-SY5Y [11].

Амилоидная гипотеза возникновения болезни Альцгеймера остается одной из доминирующих в объяснении механизмов возникновения этой патологии. Согласно этой гипотезе, отложения бета-амилоида (Aβ), образующегося из белка APP, является базовой причиной данного заболевания [12]. Характерным признаком болезни Альцгеймера является деградация и потеря синапсов [13]. Основную роль при этом предположительно играют именно отложения бета-амилоида, которые локализуясь снаружи или внутри синапсов, приводят к их дисфункции. При этом уровень синаптических белков, которые играют критическую роль в регуляции силы синаптической активности, напрямую зависит от содержания бета-амилоида [14].

В эксперименте для создания модели болезни Альцгеймера мышам при помощи интрацеребровентрикулярной инъекции вводили бета-амилоид Aβ(25-35), что привело к когнитивным дисфункциям (тест с водным лабиринтом Морриса), гибели нейронов, атрофии аксонов и потере синапсов в головном мозге. Через 7 дней после этого в течение 15 дней перорально вводили водный экстракт (1 г на кг живого веса в день) A. *mongholicus* Bunge (произрастает в Монголии, Китае). Это привело к значительным ($p < 0,05$) регенерации аксонов, восстановлению синапсов нейронов, предотвращению гибели нейронов и улучшению показателей памяти по сравнению с группой мышей, которая вместо экстракта получала чистую воду. При этом, активность экстракта не коррелировала с содержанием основных известных биологически активных компонентов этого растения – Астрагалозидов I, II и IV [15]. Водный экстракт из плодов *A. hamosus* L. (произрастает в Южной Европе, Северной Африке и Передней Азии) перорально вводимый крысам в дозе 100 мг/кг/день также снижал апоптоз нейронов, который был индуцирован введением в ткани гиппокампа бета-амилоида. Кроме того, экстракт снижал соотношение Bax/Bcl2 на 47 % и расщепление каспазы-3 на 49 % [16].

Как отмечалось выше, одним из отличительных признаков болезни Альцгеймера является именно деградация и потеря синапсов, которые являются структурной основой нервной связи и когнитивной функции. В серии экспериментов на синаптосомах мозга крыс, которые обрабатывали нейротоксином 6-гидроксидофамином, установлено, что различные группы химических соединений из разных видов данного рода обладают в отношении синаптосом протективным эффектом. В частности, было показано, что данным действием обладают сапонины, выделенные из надземной части *A. glycyphylloides* DC. (произрастает в Южной Европе, Западной и Центральной Азии). Изолированные синаптосомы мозга крыс обрабатывали 6-гидроксидофамином, что привело к гибели 49 % синаптосом по сравнению с контролем. Параллельная обработка синаптосом сапонинами данного вида в концентрации 60 мкг/мл значительно ($p \leq 0,01$) повысила их выживаемость. По мнению авторов, механизм данного эффекта может быть связан возмож-

ной активностью сапонинов в качестве поглотителей реактивных форм кислорода (ROS) [17]. Аналогичные данные были получены в отношении сапонинов близкого вида – *A. glycyphyllos* L. (произрастает в Европе, Малой Азии и Западной Сибири) [18]. Сильный защитный эффект ($p < 0.001$) по отношению к синаптосомам был зафиксирован у флавоалкалоидов и флавоноидов, полученных из надземной части *A. monspessulanus* L. (произрастает в Южной и Восточной Европе и Северной Африке). Механизм действия был основан на подавлении окислительного стресса [19]. Флавоноид баймасид из *A. spruneri* Boiss. (произрастает в Юго-Восточной Европе и Турции) оказал нейропротекторное воздействие на синаптосомы, сходное с действием силибина [20]. Статистически значимое защитное действие на синаптосомы оказал также фловоноловый гликозид рамноцитрин 4-β-D-галактопиранозид, выделенный из надземной части *A. hamosus* L. В данном случае защитный эффект также был связан с антиоксидантной активностью [21].

Ишемический инсульт представляет собой серьезную угрозу здоровью человека, а реперфузия может играть важную роль при ишемическом повреждении головного мозга. Исследования показали, что экстракт корня *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge может защищать нейроны от повреждения, возникающего в результате данного синдрома. Мышам была проведена окклюзия сонной артерии с последующей реперфузией, что привело к снижению выживаемости нейроцитов и повышению уровня их апоптоза в области CA1 гиппокампа. Экстракт в дозе 100 мг/кг значительно ($p < 0,01$) снизил уровень апоптоза в экспериментальной группе по сравнению с модельной. При этом экстракт также снизил экспрессию p-JNK1/2, цитохрома C, каспазы-9 и каспазы-3 [22].

Известно, что избыток внеклеточного глутамата – основного возбуждающего нейротрансмиттера центральной нервной системы – способен повреждать нейроны. В частности, считается, что этот процесс является составной частью механизма гибели нейронов при многих нейродегенеративных заболеваниях. В работах на клетках линии PC12 показано, что несколько химических соединений, содержащихся в корнях двух близких видов *Astragalus* L. эффективно снижают повреждения клеток, вызванных избытком глутамата; при этом удалось прояснить некоторые механизмы, лежащие в основе этого процесса. Известно, что в высокодифференцированных клетках линии PC12 глутамат в высокой концентрации ингибирует поглощение цистина и истощает внутриклеточный глутатион, что приводит к накоплению реактивных форм кислорода (ROS) и в конечном итоге вызывает гибель клеток [23]. Было установлено, что изофлавоноиды формононетин, ононин и каликозин из корней *A. mongholicus* Bunge ингибируют вызванное глутаматом повреждение клеток с оценкой 50%-й эффективной концентрации (EC_{50}) 0,027 мкг/мл, 0,047 мкг/мл и 0,031 мкг/мл, соответственно. Предварительная обработка этими соединениями повышала активность антиоксидантных ферментов, включая супероксиддисмутазу (SOD) и глутатионпероксидазу (GSH-Px), и предотвращала высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) в поврежденных глутаматом клетках PC12 [24]. Сапонин астрагалозид IV из корней *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge в широком диапазоне концентраций (от 10 до 100 мкМ) также показал способность дозозависимо смягчать ($p < 0,01$) нейротоксичность, вызванную глутаматом. В данном случае в нейропротективный эффект был вовлечен сигнальный путь Raf-MEK-ERK [25].

Ингибирование активности ацетилхолинэстеразы

Холинергическая гипотеза патогенеза болезни Альцгеймера предполагает, что дефицит нейротрансмиттера ацетилхолина способствует появлению симптомов этого заболевания [26]. В связи с этим, в качестве потенциальной мишени в терапии данного синдрома рассматривается ингибирование активности ацетилхолинэстеразы, которая катализирует гидролиз ацетилхолина. У нескольких видов *Astragalus* L. удалось установить наличие данного эффекта. В эксперименте с *A. gombiformis* Pomel (произрастает в Тунисе) активность измерялась колориметрическим методом Эллмана с использованием человеческой плазмы в качестве источника фермента. При инкубации в течение 15 минут различные экстракты из этого растения показали различные уровни активности. Среди них наиболее активным оказался этилацетатный экстракт надземной части, IC_{50} которого составил 110 мкг/мл [27]. У *A. neurocarpus* Bioss. (произрастает в Турции и Сирии) водный и этанольный экстракты корня и надземной части также были исследованы в этом отношении колориметрическим методом Эллмана в эксперименте *in vitro* на ацетилхолинэстеразе электрического угря. Наиболее активным (68,2 % ингибирования) оказался этанольный экстракт надземных частей [28]. У экстракта *A. kahiricus* DC. (произрастает в Египте) ингибирующее действие ($P < 0.01$) на активность ацетилхолинэстеразы было выявлено колориметрическим методом в эксперименте *in vivo* на мышах. При этом экстракт (дозы 25 и 50 мг/кг) вводился внутрибрюшинно [29].

Ингибирование процессов демиелинизации

Демиелинизирующие заболевания ЦНС – это группа синдромов различной этиологии, характеризующихся воспалительными поражениями, связанными с потерей миелина и в конечном итоге повреждением аксонов. Такими заболеваниями как рассеянный скле-

роз, нейромиелит зрительного нерва и острый диссеминированный энцефаломиелит страдают миллионы людей во всем мире [30]. К настоящему времени эффективная терапия некоторых из этих заболеваний отсутствует, поэтому разработка эффективных методов лечения демиелинизации ЦНС является неотложной задачей [31]. Гликопротеины из *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge могут рассматриваться в качестве кандидатов для решения этой задачи. В исследовании мышам создали экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, который является моделью рассеянного склероза. Гликопротеины вводили внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг/день в течение 15 дней. Гистологический анализ показал, что лечение привело к значительному ($p < 0{,}001$) уменьшению площади демиелинизации по сравнению с модельной группой. Увеличилась экспрессия ассоциированного с микротрубочками белка 2 (MAP-2), являющегося маркером стабилизации аксонов, и нейронального ядерного антигена (NeuN), который является маркером дифференцировки нервных клеток. Кроме того, наблюдалось уменьшение воспаления нервной системы. Ингибирование гликопротеинами экспрессии хемокинов CCL2, CCL5 и CCR5 привело уменьшению инфильтрации воспалительных клеток в ЦНС. Повысился уровень противовоспалительного цитокина IL-10; напротив, снизился уровень медиаторов воспаления интерлейкинов IL-1β, IL-6 [32].

Влияние на когнитивные функции

В пожилом и старческом возрасте для огромного числа людей характерно прогрессирующее нарушение когнитивных функций и развитие такого нейропсихиатрического синдрома, как деменция. В современном мире более 50 миллионов человек живут с деменцией, причем болезнь Альцгеймера составляет 60–70 % случаев [33]. Наиболее характерными клиническими проявлениями данного синдрома являются снижение когнитивных функций и поведенческие нарушения [34]. Когнитивные дисфункции могут возникать также под влиянием других заболеваний, продолжительных стрессов, в качестве периоперационных расстройств и т. д. [35]. Исследования показали, что химические соединения, содержащиеся в *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge, способны ослаблять когнитивные нарушения.

В эксперименте модель болезни Альцгеймера была создана введением крысам бета-амилоида Aβ(1-42), что привело в модельной группе к когнитивным дисфункциям (тесты с Y-лабиринтом и водным лабиринтом Морриса). Многократное (ежедневно в течение 5 дней) введение сапанина астрагалозида IV, выделенного из *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge, в дозах 40 мг/кг в день и 60 мг/кг в день в экспериментальных группах значительно ($p < 0{,}01$) снизило нарушение когнитивных функций. В нейронах гиппокампа крыс при этом наблюдалась повышенная экспрессия антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xl [36]. Данный сапонин оказал также протекторное влияние на когнитивные способности мышей, которые подвергались нейротоксическому воздействию свинца. Причем, эффект достигался, по мнению авторов исследования [37], через Nrf2-зависимые антиоксидантные механизмы.

В отдельных исследованиях было также показано [38], что с прогрессированием деменции у пациентов с болезнью Альцгеймера коррелирует уровень глюкокортикоидов при стрессе. В исследовании модельной группе мышей в течение 20 дней внутрижелудочно вводили глюкокортикостероид дексаметазон. Это привело к нарушению процессов обучения и запоминания у мышей (тест с водным лабиринтом Морриса) по сравнению с контрольной группой. Экспериментальная группа вместе с дексаметазоном получала лечение (40 мг/кг) экстрактом *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge. В этой группе когнитивные нарушения были значительно ($p < 0{,}05$) ослаблены по сравнению с модельной. Кроме того, лечение экстрактом улучшило патоморфологические изменения нейронов гиппокампа и неокортекса, которые появились под воздействием дексаметазона. При этом наблюдалось значительное снижение уровеня мРНК каспазы-3, экспрессии цитохрома с и каспазы-3 в области CA1, CA3 гиппокампа и неокортекса, а также уменьшение активности каспазы-3 и каспазы-9. По мнению авторов исследования [39], именно эти механизмы могли играть важную роль в защите нейронов гиппокампа и неокортекса от повреждения, индуцированного дексаметазоном.

В настоящее время все больше данных свидетельствует о том, что сахарный диабет вызывает когнитивные нарушения и потерю памяти [40, 41]. Хотя точный механизм развития когнитивных дисфункций при диабете до конца неясен, считается, что он связан с нарушениями синаптической пластичности и, в частности, с функционированием NMDA-рецепторов, протеинкиназы CaMK II и транскрипционного фактора CREB в области CA1 гиппокампа [42]. Установлено, что полисахариды *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge могут являться биологически активным средством, перспективным для лечения данного вида заболеваний. У крыс линии Sprague-Dawley была создана модель диабета при помощи введения стрептозотоцина. Это привело к нарушению когнитивных функций (тестировались при помощи водного лабиринта Морриса) по сравнению с контрольной группой. Гистологические исследования показали, что это также привело к повреждению нейронов в области CA1 гиппокампа – уменьшилось их количество, наблюдался ядерный пикноз, агрегация хроматина и уменьшение количества цитоплазмы. Экспериментальная группа, кроме стрептозотоцина, в течение 10 недель подряд

внутрижелудочно получала полисахариды *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge (20 мг/кг). Это привело к значительному ($p < 0,01$) улучшению показателей обучения и памяти по сравнению с группой, не получавшей лечения. Введение полисахаридов также обратило вспять дегенеративные изменения нейронов в гиппокампе. Кроме того, после введения полисахаридов значительно ($p < 0,01$) увеличилась экспрессия NMDA, CaMK II и CREB в области CA1 гиппокампа [43].

Особый интерес представляет двойное слепое, рандомизированное клиническое исследования на пациентах с постинсультной усталостью, которая также влияет на когнитивные функции. Шестьдесят четыре пациента были распределены на контрольную группу (33 пациента, которые получали плацебо) и группу лечения (31 пациент, которые перорально получали экстракт *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge по 2,8 г три раза в день). Показателями были изменения в баллах опросника качества жизни (EORTC QLQ-C30). Разница в баллах когнитивного функционирования между визитом 2 и визитом 1 составила в контрольной группе – 3,6, а в группе лечения – 14,4 ($p = 0,02$) [44].

Имеются данные, что защитное воздействие на когнитивные функции способен оказывать *A. kahiricus* DC. В эксперименте трем группам самцов мышей создавалась модель ретроградной амнезии при помощи внутрибрюшинного введения этанола. До этого двум экспериментальным группам вводили этанольный экстракт корней этого растения в дозах 25 или 50 мг/кг. Все мыши проходили испытания в водном лабиринте Морриса в течение семи дней подряд. В группе, получавшей только этанол, наблюдались сильные ухудшения показателей памяти по сравнению с контрольной группой (не получала ни этанола, ни экстракта). В тоже время, группа мышей, получавшая лечение экстрактом в дозе 50 мг/кг, демонстрировала показатели, близкие к контрольной группе [29].

Влияние на нейропсихиатрические нарушения

Особый интерес представляют данные, свидетельствующие о возможности применения некоторых химических соединений, содержащихся в представителях рода *Astragalus* L., в терапии психических заболеваний. В эксперименте молодым самцам крыс была создана модель шизофрении при помощи ежедневного перорального введения бисфенола на протяжении ста дней. Это привело к появлению тревожно- и депрессивно-подобного поведения, а также к нарушениям в социальном поведении. В группе, которая вместе с бисфенолом получала сапонины (100 мг/кг/день), выделенные из *A. spinosus* (Forssk.) Musch (произрастает в Израиле, Египте), данные нарушения поведения были устранены. Кроме того, сапонины улучшили показатели памяти, восстановили уровни дофамина, серотонина. моноаминоксидазы и нормализовали экспрессию mRNA гена Tph2, который является одним из ключевых в серотонинергической нейромедиации, до контрольных значений [45]. Водный экстракт из плодов *A. hamosus* L. перорально вводимый крысам в дозе 100 мг/кг/день также показал способность снижать тревожно-подобное поведение, которое было индуцировано введением в ткани гиппокампа бета-амилоида [16].

Противосудорожное действие

Противосудорожное действие было выявлено у этанольного экстракта корней и надземных частей *A. mongholicus* Bunge. Эксперименты проводились на мышах линии BALB/c, которым судороги индуцировали при помощи введения пентилэнететразола. Экстракт, вводимый перорально в дозах 150 и 300 мг/кг за 60 мин до введения пентилэнететразола, значительно ($p < 0,05$) увеличивал латентный период конвульсий и уменьшал их продолжительность. Было установлено также, что противосудорожные эффекты экстракта связаны с защитным действием против окислительного повреждения и устранением митохондриальной дисфункции в клетках головного мозга. В частности, это проявлялось в защите мембранного потенциала и комплекса ферментов митохондрий [46].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных за последние десять лет показывает, что экстракты и химические соединения видов рода *Astragalus* L. обладают весьма разнородным спектром нейробиологического действия, которые подтверждаются с позиций доказательной медицины экспериментальными исследованиями *in vivo*, и, вероятно, могут найти применение в будущем в качестве средств терапии в неврологической и психиатрической практике. Они могут рассматриваться в качестве кандидатов для разработки лекарственных средств комплексной терапии таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, рассеянный склероз, эпилепсия, шизофрения и др. К сожалению, в отличие от большого числа доклинических экспериментов, клинические испытания этих соединений являются единичными. Возможно, это связано с отсутствием достаточного количества данных по их безопасности. Кроме того, к настоящему времени в отношении нейробиологической активности исследовано менее одного процента видов этого рода. Таким образом, необходимы более обширные исследования, клинические испытания, исследования по стандартизации и установлению терапевтических доз для человека экстрактов и химических соединений видов рода *Astragalus* L. Среди исследованных представителей этого рода наи-

более перспективными для дальнейшего детального изучения и разработки на их основе лекарственных средств являются виды, для которых установлено сразу несколько нейробиологических эффектов – *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge, A. *mongholicus* Bunge, *A. kahiricus* DC. и *A. hamosus* L.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rundel P. W., Huggins T. R., Prigge B. A., Sharifi M. R. Rarity in Astragalus: a California Perspective. *Aliso*. 2015;33(2):111–120.
2. Li X. T., Zhang Y. K., Kuang H. X., Jin F. X., Liu D. W., Gao M. B., Liu Z., Xin X. J. Mitochondrial Protection and Anti-aging Activity of Astragalus Polysaccharides and Their Potential Mechanism. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):1747–1761. DOI: 10.3390/ijms13021747.
3. Ikbal A. M. A., Rajkhowa A., Debnath B., Singh W. S., Manna K., Bhattacharjee B., Das T., Goswami S. Pharmacological Review on *Astragalus membranaceus*: Chinese Traditional Herb. *Pharmacognosy Reviews*. 2022;16(32):690–94. DOI: 10.5530/phrev.2022.16.13.
4. Berezutsky M. A., Matvienko U. A., Karetnikova A. Y., Durnova N. A. Anti-Cancer Activity Of Astragalus Membranaceus-A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;13(3):206–215. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.03.003.
5. Berezutsky M. A. Durnova N. A., Vlasova I. A. Experimental and clinical studies of mechanisms of the antiaging effects of chemical compounds in *Astragalus membranaceus*. *Adv Gerontol*. 2020;10(2):142–149. DOI: 10.1134/S2079057020020046.
6. Berezutskii M. A., Yakubova L. R., Durnova N. A., Romanteeva Y. V., Belonogova Y. V., Komarova E. E., Sheremet'eva A. S. Pharmacological properties of preparations based on Astragalus extract. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(4):372–376. DOI: 10.1007/s11094-020-02206-x.
7. Bachurin S. O., Bovina E. V., Ustyugov A. A. Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: the major trends. *Med Res Rev*. 2017;37(5):1186–1225. DOI: 10.1002/med.21434.
8. Majid A. Neuroprotection in stroke: past, present, and future. *ISRN Neurol*. 2014;2014:515716. DOI: 10.1155/2014/515716.
9. Fan Z., Liang Z., Yang H., Pan Y., Zheng Y., Wang X. Tenuigenin protects dopaminergic neurons from inflammation via suppressing NLRP3 inflammasome activation in microglia. *Journal of Neuroinflammation* . 2017;14(1):256. DOI: 10.1186/s12974-017-1036-x.
10. Chan W. S., Durairajan S. S. K., Lu J. H., Wang Y., Xie L. X., Kum W. F., Koo J., Yung K. K. L., Li M. Neuroprotective effects of Astragaloside IV in 6-hydroxydopamine-treated primary nigral cell culture. *Neurochem Int*. 2009;55(6):414–422. DOI: 10.1016/j.neuint.2009.04.012.
11. Xu Z., Yang D., Huang X., Huang H. Astragaloside IV protects 6-hydroxydopamine-induced SH-SY5Y cell model of Parkinson's disease via activating the JAK2/STAT3 pathway. *Front Neurosci*. 2021;15:631501. DOI: 10.3389/fnins.2021.631501.
12. Long J. M., Holtzman D. M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019;179(2):312–339. DOI: 10.1016/j.cell.2019.09.001.
13. Gao M. L., Zhang Y. D., Li N., Qiao J., Yu M. Bone marrow mesenchymal stem cells transplanted into a rat model of Alzheimer's disease: improvement in the learning and memory ability. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20:2059–2065.
14. Sultana R., Banks W. A., Butterfield D. A. Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of BCl2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnestic mild cognitive impairment: Insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of Abeta, and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2010;88(3):469–477. DOI: 10.1002/jnr.22227.
15. Tohda C., Tamura T., Matsuyama S., Komatsu K. Promotion of axonal maturation and prevention of memory loss in mice by extracts of *Astragalus mongholicus*. *Br J Pharmacol*. 2006;149(5):532–41. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706865.
16. Bahaeddin Z., Yans A., Khodagholi F., Sahranavard S. Neuroprotection and anxiety like behavior reduction of *Allium hirtifolium* and *Astragalus hamosus* in the Aβ-injected rat. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2016;3(4):39–49.
17. Kondeva-Burdina M., Krasteva I., Popov G., Manov V. Neuroprotective and antioxidant activities of saponins' mixture from *Astragalus glycyphylloides* in a model of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress on isolated rat brain synaptosomes. *Pharmacia*. 2019(4):233–237. DOI: 10.3897/pharmacia.66.e37997.
18. Shkondrov A., Krasteva I., Bucar F., Kunert O., Kondeva-Burdina M., Ionkova I. A new tetracyclic saponin from *Astragalus glycyphyllos* L. and its neuroprotective and hMAO-B inhibiting activity. *Nat Prod Res*. 2020;34(4):511–517. DOI: 10.1080/14786419.2018.1491040.
19. Kondeva-Burdina M., Doytchinova I., Krasteva I., Ionkova I., Manov V. Hepato-, neuroprotective effects and QSAR studies on flavoalkaloids and flavonoids from *Astragalus monspessulanus*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2019;33(1):1434–1443. DOI: 10.1080/13102818.2019.1673209.
20. Shkondrov A., Krasteva I., Bucar F., Kunert O., Kondeva-Burdina M., Ionkova I. Flavonoids and saponins from two Bulgarian Astragalus species and their neuroprotective activity. *Phytochemistry Letters*. 2018;26:44–49. DOI: 10.1016/j.phytol.2018.05.015.
21. Kondeva-Burdina M., Krasteva I., Mitcheva M. (2014) Effects of rhamnocitrin 4-β-D-galactopyranoside, isolated from *Astragalus hamosus* on toxicity models in vitro. *Pharmacognosy Magazine*. 2014;10(39):487–493. DOI: 10.4103/0973-1296.139778.
22. Huang X. P., Tan H., Chen B. Y., Deng C. Q. Astragalus extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(4):449–454. DOI: 10.1248/bpb.35.449.
23. Robert S. M., Ogunrinu-Babarinde T., Holt K. T., Sontheimer H. Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. *Neurochem Int*. 2014;73:181–191. DOI: 10.1016/j.neuint.2014.01.001.
24. Yu D., Duan Y., Bao Y., Wei C., An L. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *J Ethnopharmacol*. 2005;98(1-2):89–94. DOI: 10.1016/j.jep.2004.12.027.
25. Yue R., Li X., Chen B., Zhao J., He W., Yuan H., Yuan X., Gao N., Wu G., Jin H., Shan L., Zhang W. Astragaloside IV attenuates glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells through Raf-MEK-ERK pathway. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126603. DOI: 10.1371/journal.pone.0126603.
26. Francis P. T., Palmer A. M., Snape M., Wilcock G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;66(2):137–47. DOI: 10.1136/jnnp.66.2.137.
27. Teyeb H., Mabrouk H., Neffati M., Douki W., Najjar M. F. Anticholinesterase activity of *Astragalus gombiformis* extracts. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 2011;1(5–6):344–348. DOI: 10.1080/22311866.2011.10719103.
28. Sekeroglu N., Gezici S. *Astragalus neurocarpus* Bioss. as a potential source of natural enzyme inhibitor associated with Alzheimer's and Parkinson diseases along with its rich polyphenolic content and antioxidant activities. *Ann Phytomed*. 2019;8(1):82–87. DOI: 10.21276/ap.2019.8.1.9.
29. Abdelaziz B. M., Helmy M. W., Katary M. A., Abd-Alhaseeb M. M., Ghoneim A. I. Protective effects of *Astragalus kahiricus* root extract on ethanol-induced retrograde memory impairments in mice. *J HerbMed Pharmacology*. 2019;8(4):295–301. DOI: 10.15171/jhp.2019.43.
30. Matas S. L., Glehn F., Fernandes G. B., Soares C. A. Cerebrospinal fluid analysis in the context of CNS demyelinating diseases. *Arq Neuropsiquiatr*. 2013;71(9B):685–688. DOI: 10.1590/0004-282X20130151.
31. Shu Y., Luo T., Wang M., Zhang Y., Zhang L., Xiao Z., Wang Q., Zhang Q., Zou J., Yu C., Xu S., Yu T., Zhou L., Yu S. Gastrodin promotes CNS myelination via a lncRNA Gm7237/miR-142a/MRF pathway. *RNA Biol*. 2021;18(9):1279–1290. DOI: 10.1080/15476286.2020.1841976.

32. Xing Y., Liu B., Zhao Y., Zhang L., Thome R., Xue H., Zhang P., Ma C. Immunomodulatory and neuroprotective mechanisms of Huangqi glycoprotein treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Folia Neuropathol*. 2019;57(2):117–128. DOI: 10.5114/fn.2019.85843.
33. Molinuevo J. L., Ayton S., Batrla R., Bednar M. M., Bittner T., Cummings J., Blenno K. Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathol*. 2018;136(6):821–853. DOI: 10.1007/s00401-018-1932-x.
34. Scheltens P., Blennow K., Breteler M. M., de Strooper B., Frisoni G. B, Salloway S., Van der Flier W. M. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016;388:505–517. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1.
35. Zhang Z., Ma P., Xu Y., Zhan M., Zhang Y., Yao S., Zhang S. Preventive effect of gastrodin on cognitive decline after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a double-blind, randomized controlled study. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2011;31(1):120–127. DOI: 10.1007/s11596-011-0162-4.
36. Yin Y., Yan L., Huang L. Q., Huang S. Q., Zhuang J. H., Chen X. Y., Zhang L., Wu H., Shao F., Zhao Z. X. Anti-apoptosis effect of astragaloside IV on Alzheimer's disease rat model via enhancing the expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Scand J Lab Anim Sci*. 2010;37(2):75–82.
37. Yu C., Zhang J., Li X., Liu J., Niu Y. Astragaloside IV-induced Nrf2 nuclear translocation ameliorates lead-related cognitive impairments in mice. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res*. 2021;1868(1):118853. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118853.
38. Csernansky J. G., Dong H. X., Fagan A. M., Wang L., Xiong C. J., Holtzman D. M., Morris J. C. Plasma cortisol and progression of dementia in subjects with Alzheimer-type dementia. *Am J Psychiatry*. 2006;163:2164–2169. DOI: 10.1176/ajp.2006.163.12.2164.
39. Li W. Z., Li W. P., Zhang W., Yin Y. Y., Sun X. X., Zhou S. S., Xu X. Q., Tao C. R. Protective effect of extract of Astragalus on learning and memory impairments and neurons' apoptosis induced by glucocorticoids in 12-month-old male mice. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011;294(6):1003–1014. DOI: 10.1002/ar.21386.
40. Reagan L. P., Magarinos A. M., McEwen B. S. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann NY Acad Sci*. 1999;893:126–137. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07822.x.
41. Reagan L. P., Magariños A. M., Lucas L. R., van Bueren A., McCall A. L., McEwen B. S. Regulation of GLUT-3 glucose transporter in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Am J Physiol*. 1999;276(5):E879–E886. DOI: 10.1152/ajpendo.1999.276.5.E879.
42. Navakkode S., Chew K., Tay S. J. N., Lin Q., Behnisch T., Soong T. W. Bidirectional modulation of hippocampal synaptic plasticity by Dopaminergic D4-receptors in the CA1 area of hippocampus. *Sci Rep*. 2017;7(1):15571.
43. Zhang G., Fang H., Li Y., Xu J., Zhang D., Sun Y., Zhou Z., Zhang H. Neuroprotective effect of Astragalus polysacharin on streptozotocin (STZ)-Induced diabetic rats. *Med Sci Monit*. 2019;25:135–141. DOI: 10.12659/MSM.912213.
44. Liu C. H., Tsai C. H., Li T. C., Yang Y. W., Huan W. S., Lu M. K., Tseng C. H., Huang H. C., Chen K. F., Hsu T. S., Hsu Y. T., Tsai C. H., Hsieh C. L. Effects of the traditional Chinese herb *Astragalus membranaceus* in patients with poststroke fatigue: A double-blind, randomized, controlled preliminary study. *J Ethnopharmacol*. 2016;194:954–962. DOI: 10.1016/j.jep.2016.10.058.
45. Abd Elkader H. T. A. E., Abdou H. M., Khamiss O. A., Essawy A. E. Anti-anxiety and antidepressant-like effects of astragaloside IV and saponins extracted from *Astragalus spinosus* against the bisphenol A-induced motor and cognitive impairments in a postnatal rat model of schizophrenia. *Environ Sci Pollut Res*. 2021;28(26):35171–35187. DOI: 10.1007/s11356-021-12927-5.
46. Aldarmaa J., Liu Z., Long J., Mo X., Ma J., Liu J. Anti-convulsant effect and mechanism of *Astragalus mongholicus* extract in vitro and in vivo: protection against oxidative damage and mitochondrial dysfunction. *Neurochem Res*. 2010;35(1):33–41. DOI: 10.1007/s11064-009-0027-4.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-207-214
УДК 615.454; 615.276

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Оценка эффективности мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита: влияние на уровень провоспалительных цитокинов

У. В. Ногаева[1]✉, В. Е. Кованских[1], Д. Ю. Ивкин[1], Е. В. Флисюк[1], К. Д. Якимов[1], Е. И. Елецкая[1], Е. Д. Семивеличенко[1], В. Г. Антонов[2]

[1] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А
[2] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (СПбГПМУ), 194100, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

✉ **Контактное лицо:** Ногаева Ульяна Валерьевна. **E-mail:** uljana.nogaeva@pharminnotech.com

ORCID: У. В. Ногаева – https://orcid.org/0000-0002-8214-7553; В. Е. Кованских – https://orcid.org/0000-0001-5783-8339;
Д. Ю. Ивкин – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864; Е. В. Флисюк – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462;
К. Д. Якимов – https://orcid.org/0000-0001-5591-2558; Е. И. Елецкая – https://orcid.org/0000-0002-9423-7249;
Е. Д. Семивеличенко – https://orcid.org/0000-0002-8464-7711; В. Г. Антонов – https:/orcid.org/0000-0001-9910-5395.

Статья поступила: 30.12.2022 **Статья принята в печать:** 10.02.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. В настоящее время остеоартрит считается медленно протекающим воспалительным заболеванием, полностью поражающим сустав. Немаловажную роль в развитии данной патологии играет воспаление синовиальной оболочки и связок (синовит), дополненное постоянными механическими нагрузками. В норме в хряще наблюдается баланс противовоспалительных и провоспалительных медиаторов, однако при воздействии факторов риска это равновесие сдвигается в сторону последних.

Цель. Оценка влияния ранее разработанной мягкой лекарственной формы, содержащей мелоксикам, производное пурина и иммуномодулятор М на уровень провоспалительных цитокинов: ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α при остеоартрите.

Материалы и методы. В эксперимент было включено 25 животных, которых методом простой рандомизации разделили на 5 групп: 1 – испытуемая (гель 0,5 %), 2 – испытуемая (гель 1 %), 3 – референтная (Амелотекс®, гель 1 %), 4 – контроль (гелевая основа); 5 – интакт. Доклиническое моделирование патологии было проведено путем сочетанного введения в полость скакательного (заплюсневого) сустава крыс самцов линии Brown Norvay Catholic Rats по 0,1 мл смеси полного адъюванта Фрейнда с 10 % суспензией талька в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1 : 10. Иммуноферментный анализ сыворотки крови животных на 28 день эксперимента проводили с помощью стандартных планшетных наборов ELISA (Cloud-Clone Corp., США). Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., США), различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Разработанные составы способствовали снижению уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-6 и ФНО-α) по сравнению с гелевой основной и референтным препаратом. При этом выявлены различия между эффектом, наблюдаемым от применения испытуемых средств (геля 0,5 %, геля 1 %) и референтного препарата по влиянию на уровень ИЛ-1α и ФНО-α, что свидетельствует о большей эффективности подобранной комбинации действующих веществ, ведь, в отличие от однокомпонентного геля Амелотекс®, разработанные нами составы дополнительно включали производное пурина и иммуномодулятор М. Полученные данные важны с точки зрения понимания механизма действия мягкой лекарственной формы.

Заключение. По результатам предыдущих и настоящих исследований предполагается, что наибольший интерес для клинической практики представляет комбинированный состав мягкой лекарственной формы с половинной (0,5 %) концентрацией мелоксикама, поскольку его применение при высоком уровне эффективности дополнительно позволяет снизить вероятность возникновения нежелательных реакций со стороны нестероидного противовоспалительного средства, что важно в случае длительной терапии остеоартрита.

Ключевые слова: остеоартрит, мелоксикам, доклинические исследования, воспаление, цитокины, иммуноферментный анализ, мягкие лекарственные формы

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

Вклад авторов. У. В. Ногаева и К. Д. Якимов под руководством Е. В. Флисюк разработали составы и изготовили мягкие лекарственные формы. В. Е. Кованских, У. В. Ногаева, Д. Ю. Ивкин, Е. Д. Семивеличенко провели доклинические исследования сравнительной эффективности полученных составов. Е. И. Елецкая провела иммуноферментный анализ крови животных. Д. Ю. Ивкин, У. В. Ногаева, В. Е. Кованских, В. Г. Антонов участвовали в обработке данных и в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

Для цитирования: Ногаева У. В., Кованских В. Е., Ивкин Д. Ю., Флисюк Е. В., Якимов К. Д., Елецкая Е. И., Семивеличенко Е. Д., Антонов В. Г. Оценка эффективности мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита: влияние на уровень провоспалительных цитокинов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):207–214. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-207-214

© Ногаева У. В., Кованских В. Е., Ивкин Д. Ю., Флисюк Е. В., Якимов К. Д., Елецкая Е. И., Семивеличенко Е. Д., Антонов В. Г., 2023
© Nogaeva U. V., Kovanskov V. E., Ivkin D. Yu., Flisyuk E. V., Yakimov K. D., Yeletskaya E. I., Semivelichenko E. D., Antonov V. G., 2023

Evaluation of the Efficiency of a Soft Dosage Form for the Treatment of Osteoarthritis: Influence on the Level of Pro-inflammatory Cytokines

Ulyana V. Nogaeva[1]✉, Vladislav E. Kovanskov[1], Dmitry Yu. Ivkin[1], Elena V. Flisyuk[1], Kirill D. Yakimov[1], Elizaveta I. Yeletskaya[1], Evgeniy D. Semivelichenko[1], Victor G. Antonov[2]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2, Litovskaya str., Saint-Petersburg, 194100, Russia

✉ **Corresponding author:** Ulyana V. Nogaeva. **E-mail:** uljana.nogaeva@pharminnotech.com

ORCID: Ulyana V. Nogaeva – https://orcid.org/0000-0002-8214-7553; Vladislav E. Kovanskov – https://orcid.org/0000-0001-5783-8339; Dmitry Yu. Ivkin – https://orcid.org/0000-0001-9273-6864; Elena V. Flisyuk – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462; Kirill D. Yakimov – https://orcid.org/0000-0001-5591-2558; Elizaveta I. Yeletskaya – https://orcid.org/0000-0002-9423-7249; Evgeniy D. Semivelichenko – https://orcid.org/0000-0002-8464-7711; Victor G. Antonov – https:/orcid.org/0000-0001-9910-5395.

Received: 30.12.2022 **Revised:** 10.02.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Osteoarthritis is now considered to be a slowly progressive inflammatory disease that completely affects the joint. An important role in the development of this pathology is played by inflammation of the synovial membrane and ligaments (synovitis), supplemented by constant mechanical stress. Normally, a balance of anti-inflammatory and pro-inflammatory mediators is observed in cartilage, however, under the influence of risk factors, this balance shifts towards the latter.

Aim. Evaluation of the effect of a previously developed soft dosage form containing meloxicam, a purine derivative and an immunomodulator M on the level of pro-inflammatory cytokines: IL-1α, IL-1β, IL-6 and TNF-α in osteoarthritis.

Materials and methods. The experiment included 25 animals, which were divided into 5 groups by simple randomization: 1 – test (gel 0.5 %), 2 –test (gel 1 %), 3 – reference (Amelotex®, gel 1 %), 4 – control (gel base); 5 – intact. Preclinical modeling of the pathology was carried out by combined injection of 0.1 ml of a mixture of complete Freund's adjuvant with a 10 % suspension of talc in isotonic sodium chloride solution in a ratio of 1 : 10 into the cavity of the hock (tarsal) joint of Brown Norvay Catholic Rats male rats. Enzyme immunoassay of animal blood serum on the 28th day of the experiment was performed using standard ELISA plate kits (Cloud-Clone Corp., USA). Statistical data processing was performed using GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software Inc., USA), differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion. The developed compositions contributed to a decrease in the level of pro-inflammatory cytokines (IL-1α, IL-6 and TNF-α) compared with the main and reference gel preparation. At the same time, differences were found between the effect observed from the use of the test agents (gel 0.5 %, gel 1 %) and the reference drug in terms of the effect on the level of IL-1α and TNF-α, which indicates a greater effectiveness of the selected combination of active substances, because, unlike the single-component gel Amelotex®, the compositions developed by us additionally included a purine derivative and an immunomodulator M. The data obtained are important from the point of view of understanding the mechanism of action of a soft dosage form.

Conclusion. Based on the results of previous and present studies, it is assumed that the combined composition of the soft dosage form with a half (0.5 %) concentration of meloxicam is of greatest interest for clinical practice, since its use at a high level of effectiveness additionally reduces the likelihood of adverse reactions from the non-steroidal anti-inflammatory drug, which is important in the case of long-term therapy of osteoarthritis.

Keywords: osteoarthritis, meloxicam, preclinical studies, inflammation, cytokines, enzyme immunoassay, soft dosage forms

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. Ulyana V. Nogaeva and Kirill D. Yakimov under the direction of Elena V. Flisyuk developed formulations and produced soft dosage forms. Vladislav E. Kovanskov, Ulyana V. Nogaeva, Dmitry Yu. Ivkin, Evgeniy D. Semivelichenko conducted preclinical studies of the comparative effectiveness of the obtained formulations. Elizaveta I. Yeletskaya conducted an enzyme immunoassay on the animals' blood. Dmitry Yu. Ivkin, Ulyana V. Nogaeva, Vladislav E. Kovanskov and Victor G. Antonov participated in data processing and in writing the text of the article. All authors participated in the 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: Nogaeva U. V., Kovanskov V. E., Ivkin D. Yu., Flisyuk E. V., Yakimov K. D., Yeletskaya E. I., Semivelichenko E. D., Antonov V. G. Evaluation of the efficiency of a soft dosage form for the treatment of osteoarthritis: influence on the level of pro-inflammatory cytokines. *Drug development & registration*. 2023;12(1):207–214. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-207-214

ВВЕДЕНИЕ

Остеоартрит (ОА) длительное время рассматривали как заболевание, связанное со старением и деградацией хрящевой ткани. Однако, благодаря последним исследованиям, представления о патогенезе ОА, а, следовательно, и о подходах к терапии существенно изменились – особое место стало занимать иммунное воспаление [1].

Сегодня известно, что в развитии патологии принимает участие ряд факторов, взаимодействующих между собой на биохимическом и механическом

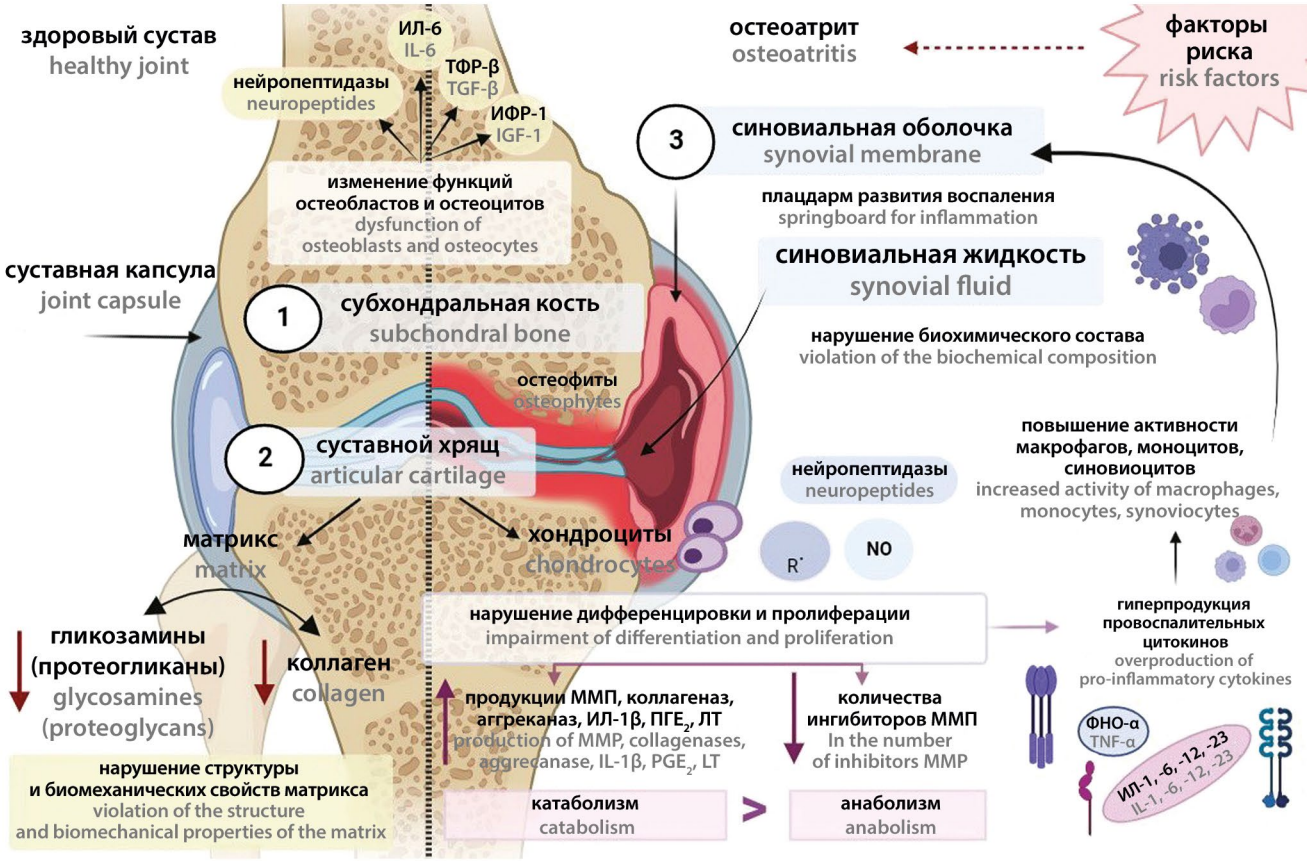


Рисунок 1. Патогенез остеоатрита (создано с помощью BioRender.com).

Примечания: ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста; ММП – матриксные металлопротеиназы; $ПГЕ_2$ – простагландин E_2; ТФР-β – трансформирующий фактор роста; ЛТ – лейкотриены

Figure 1. Osteoarthritis pathogenesis (created with BioRender.com).

Notes: IGF-1 – insulin-like growth factor; MMP – matrix metalloproteinases; PGE_2 – prostaglandin E_2; TGR-β – transforming growth factor; LT – leukotrienes

уровнях. На рисунке 1 представлен патогенез ОА[1], из которого следует, что клиническая картина развивается на уровне субхондральной кости, суставного хряща и синовиальной оболочки [2, 3].

В субхондральной кости изменяются функции остеобластов и остеоцитов, на первых этапах повреждения повышается резорбция и в дальнейшем увеличивается костеобразование, формируются остеофиты, что нарушает плотность костной ткани, приводит к повреждению субхондральных сосудов, формируя костный венозный стаз. Одновременно остеобласты начинают избыточно продуцировать факторы роста и провоспалительные цитокины, повреждающие хрящ [4].

Основная функция хряща в суставе – амортизация механических нагрузок, что обеспечивают такие структурные элементы, как матрикс и хондроциты. Матрикс содержит две главные макромолекулы: гликозамины (протеогликаны) и коллаген. Коллагеновая сеть матрикса удерживает протеогликаны в хряще, выполняя функцию каркаса. При патологии происходит снижение содержания коллагена и протеогликанов, в результате чего нарушается структура и биомеханические свойства матрикса [5].

Основные патологические процессы, проводящие к разрушению хряща, происходят в хондроцитах, которые содержат ферменты, в частности металлопротеиназы: сериновая протеиназа, коллагеназа, простромелизин. В норме эти ферменты находятся под контролем ингибиторов и не оказывают неблагоприятного воздействия, однако при патологии катаболические процессы превышают анаболические, и хондроцит получает гиперпролиферативный статус. Происходит гиперпродукция цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-23, ФНО-α, липидных медиаторов (простагландин E_2, лейкотриены), фактора роста (ТФР-β), свободных радикалов, оксида азота, ги-

[1] Spence S. Osteoarthritis: Pathogenesis and clinical findings. The Calgary Guide to Understanding Disease. (Electronic resource). Available at: https://calgaryguide.ucalgary.ca/osteoarthritis-oa-clinical-findings-2/ Accessed: 14.12.2022.

перэкспресиия ЦОГ-2, в итоге наблюдается активация ферментов синовиальной жидкости, деградация протеогликанов и коллагена, развиваются процессы ремоделирования, поддерживается иммунное воспаление [6].

Клиническая картина при этом включает боль, нарушение функции пораженного сустава, уменьшение объема движения, утреннюю скованность.

Основная цель лечения и вторичной профилактики ОА – снизить выраженность проявлений заболевания и замедлить разрушение хряща и субхондральной кости, что позволяет уменьшить боль, улучшить функцию сустава, повысить мобильность пациента.

Ранее нами была разработана и изучена комбинированная мягкая лекарственная форма (МЛФ), обладающая противовоспалительной активностью, подтвержденной комплексными доклиническими исследованиями [7, 8]. Однако при всей надежности изучения размера поврежденного сустава, работоспособности животных и гистологической картины, проведенная оценка эффективности является весьма грубой, поэтому данная работа посвящена анализу влияния испытуемого средства на патогенез воспаления при ОА, а именно – на уровень ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО-α, определенный с помощью ИФА.

Цель исследования: провести сравнительную оценку влияния испытуемой МЛФ для терапии ОА на уровень провоспалительных цитокинов.

Задачи исследования:

1. Смоделировать остеоартрит у крыс самцов Brown Norvay Catholic Rats.
2. Провести сравнительную оценку противовоспалительной активности, разработанной МЛФ, изучив влияние на уровень маркеров: ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования стали:

1. Комбинированная МЛФ, содержащая мелоксикам 0,5, производное пурина 3,0, иммуномодулятор М 5,0, гелевую основу до 100,0 (далее – гель 0,5 %).
2. Комбинированная МЛФ, включающая мелоксикам 1,0, производное пурина 3,0, иммуномодулятор М 5,0, гелевую основу до 100,0 (далее – гель 1 %).

Испытуемые составы были получены в GMP тренинг-центре СПХФУ, основа гелей представляла собой комбинацию альгината натрия 2,0, пропиленгликоля 10,0, кремофора RH-40 2,0, твин-80 2,0 и воды очищенной до 100,0.

В качестве референтного препарата был выбран Амелотекс® гель 1 % (серия 661120, годен до 10.2023).

Методы

Моделирование остеоартрита

Для моделирования патологии в полость скакательного сустава крыс самцов линии Brown Norvay Catholic Rats вводили по 0,1 мл смеси полного адъюванта Фрейнда с 10%-й суспензией талька в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1 : 10 (рисунок 2).

Всего в эксперимент было включено 25 животных, которые методом простой рандомизации были распределены в одну из пяти групп. Первым четырем группам в течение 28 дней после моделирования патологии на участок воспаления ежедневно наносили по 0,1 мл определенной МЛФ (гель 0,5 %, гель 1 %, Амелотекс® гель 1 %, гелевая основа), дозирование осуществляли с помощью шприца. Пятая группа была интактной. Протокол исследования RATS-OA-01-2022 от 07.02.2022 соответствовал этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований.



Рисунок 2. Доклиническое моделирование остеоартрита:

1 – внутрисуставное введение суспензии талька и адъюванта Фрейда; 2 – внешний вид сустава через 24 часа после моделирования патологии; 3 – измерение размера повреждённого сустава с использованием штангенциркуля

Figure 2. Preclinical modeling of osteoarthritis:

1 – intra-articular introduction of a suspension of talc and Freud's adjuvant; 2 – appearance of the joint 24 hours after modeling the pathology; 3 – measurement of the size of the damaged joint using a caliper.

Для оценки адекватности модели были использованы следующие методы:

1. Еженедельное измерение размера сустава с помощью цифрового штангенциркуля.
2. Двигательная активность животных с использование беговой дорожки Tredmill (Германия).
3. Гистологическая оценка состояния суставов в конце эксперимента после эвтаназии животных в CO2-боксе (BIOSCAPE (EHRET), Германия).

Иммуноферментный анализ

Критерием сравнительной эффективности испытуемых средств был выбран уровень провоспалительных цитокинов, а именно ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α. На 28 день исследования у экспериментальных крыс брали кровь и получали путем центрифугирования в режиме – 1000 об/мин 20 минут.

Для иммуноферментного анализа использовали стандартные планшетные наборы ELISA, каталожные номера: SEA071Ra, SEA563Ra, SEA079Ra, SEA133Ra, производитель Cloud-Clone Corp. (США). Результаты считывали с помощью фотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) и программного обеспечение SkanIt™ Software (Thermo Fisher Scientific, США) на базе НОЦ МКТ СПХФУ.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистический анализ результатов был осуществлен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., США). Нормальность распределения показателей была проверена посредством теста Шапиро – Уилка, в дальнейшем использовался однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты приведены в формате среднего арифметического ± стандартное отклонение среднего (SD). Множественные сравнения были проведены с учетом поправки (тест Тьюки).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

С патогенетической точки зрения остеоартрит является многофакторным заболеванием. Исследования последних лет говорят о значимом вкладе в формирование клинической картины ОА как дегенеративных, так и воспалительных изменений [9]. Если первые мы можем оценить посредством гистологии, снятия рентгеновских снимков, то для изучения вторых актуально обратиться к цитокинам – маркерам степени выраженности воспалительного процесса.

Различают противовоспалительные и провоспалительные цитокины, в представляемой работе основное внимание было уделено последним, а именно ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α.

Из данных литературы есть сведения о том, что ИЛ-1α способствуют развитию остеолитического процесса, повышает резорбцию кости и хряща, а также усиливает процесс образования супероксид-радикалов, оксида азота (II), простагландинов E2 [6]. В связи с чем, уменьшение концентрации ИЛ-1α имеет значение для замедления патологического процесса на уровне метаболизма хондроцитов и оказания хондропозитивного эффекта. Подобную картину мы наблюдаем в случае 28-дневного нанесения геля 0,5 %, геля 1 %, а также референтного препарата Амелотекс® гель 1 %. В этих группах уровень ИЛ-1α был в диапазоне от 58,09 ± 18,70 до 233,5 пг/мл. У животных, получавших гелевую основу (контроль), концентрация ИЛ-1α составила около 369,48 ± 36,52 пг/мл.

ИЛ-1β индуцирует воспалительные реакции и является одним из важнейших цитокинов в патогенезе остеоартрита. Было показано, что ИЛ-1β ингибирует продукцию компонентов внеклеточного матрикса хряща (коллаген и аггрекан), активирует металлопротеиназы, разлагающие матрикс, индуцирует свою собственную экспрессию, а также производство других провоспалительных медиаторов, таких как ИЛ-6, ФНО-α, ИЛ-8 [9,10]. Основываясь на этом, некоторые исследователи изучают уровень ИЛ-1β в качестве маркера выраженности воспаления, а также рассматривают его с точки зрения оценки противовоспалительной активности испытуемых средств. В исследовании, проведенном нами, у животных, которым наносили гелевую основу после моделирования патологии средний уровень ИЛ-1β 31,47 ± 0,66 пг/мл, в то время как у интактных он был около 12,69 ± 0,72 пг/мл, что свидетельствуют о сохранении воспаления на 28 день эксперимента. Статистически значимых различий между уровнями ИЛ-1β в группах, получающих терапию разными МЛФ, не выявлено. Такие результаты можно предположительно связать тем, что воспалительный процесс при ОА начинается с гиперпродукции ИЛ-1β, после чего запускается синтез других медиаторов воспаления и, в течение времени, концентрация ИЛ-1β снижается. Однако для подтверждения этой гипотезы необходимо провести исследование в динамике, включив несколько временных точек взятия крови и проведения ИФА.

ФНО-α – цитокин, значение которого в патогенезе остеоартрита привлекает многих авторов [11,12]. При патологии повышенные уровни ФНО-α присутствуют в синовиальной ткани и жидкости, а также в хрящах. Механизмы, посредством которых ФНО-α имитирует прогрессирование ОА, и сигнальные пути, на которые он влияет, остаются предметом исследований [12]. Было установлено, что ФНО-α способствует высвобождению матриксных металлопротеиназ из синовиальных фибробластов, что приводит к разрушению хряща, и ингибирует хондрогенез, подавляя выработку фактора транскрипции (SOX9) [10]. Обзор исследований *in vitro* показывает, что ингибирование ФНО-α в доклинических моделях способствовало восстановлению хряща и, в целом, улучшало жизнеспособность костно-хрящевой ткани, наблюдалась хондропротекция [5].

ИЛ-6 является важным медиатором воспаления, который участвует в процессах пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток. В тканях пораженного сустава выработка ИЛ-6 запускается в ответ на повышенные концентрации ИЛ-1β и ФНО-α [10]. При ОА уровень ИЛ-6 возрастает в синовиальной жидкости и сыворотке крови, что коррелирует с рядом функциональных показателей тяжести ОА. Подобно IL-1 и ФНО-α, IL-6 снижает выработку компонентов хрящевого матрикса и приводит к увеличению продукции матриксных металлопротеиназ [9].

С использованием ИФА нам удалось измерить концентрации провоспалительных цитокинов и установить, что применение лекарственных препаратов: геля 0,5 %, геля 1 % и геля Амелотекс® 1 % способствовало снижению концентрации ИЛ-1α, ИЛ-6 и ФНО-α в отличии от контрольной группы, которой после моделирования патологии наносили гелевую основу (рисунок 3). Наблюдаемые результаты могут быть обусловлены наличием в опытных составах нестероидного противовоспалительного средства (НПВС) – мелоксикама, который помимо ингибирования ЦОГ-2, обладая анаболическим действием, активно вмешивается в развитие патологического процесса при остеоартрите [13].

Выявленные отличия между испытуемыми средствами (гелем 0,5 %, гелем 1 %) и референтным препаратом по влиянию на уровень ИЛ-1α и ФНО-α свидетельствуют о большей эффективности подобранной комбинации действующих веществ, ведь, в отличие от однокомпонентного геля Амелотекс®, разработанные составы дополнительно включали производное пурина и иммуномодулятор М. На рисунке 3 представлены результаты иммуноферментного анализа, отражающие концентрации ИЛ-1α, ИЛ-6 и ФНО-α в крови крыс на 28 день эксперимента в испытуемых, контрольной и интактной группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели адъювант-индуцированного остеоартрита проведена сравнительная оценка влияния нескольких мягких лекарственных форм на уровень провоспалительных цитокинов. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности испытуемых 0,5 % и 1 % гелей снижать уровень таких медиаторов воспаления, как ИЛ-1α, ИЛ-6 и ФНО-α. При этом уменьшение концентрации ИЛ-6 сопоставимо с эффектом, оказываемым референтным препаратом – гелем Амелотекс® 1 %, а в случае с ИЛ-1α и ФНО-α разработанные МЛФ показали лучшую динамику, что может быть связано с их более комплексным действием за счет введения в состав производного пурина и иммуномодулятора М.

Конечно, данные, полученные на доклинической модели, нельзя полностью экстраполировать на человека. Однако по результатам предыдущих и настоящих исследований предполагается, что наибольший интерес для клинической практики представляет комбинированный состав МЛФ с половинной (0,5 %) концентрацией мелоксикама, поскольку его применение при высоком уровне эффективности дополнительно позволяет снизить вероятность возникновения нежелательных реакций со стороны НПВС, что важно в случае длительной терапии остеоартрита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang H., Cai D., Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2020;28(5):555–561. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.007.
2. Zhang P., Li K., Kamali A., Ziadlou R., Ahmad P., Wang X., Richards R. G., Alini M., Basoli V., Li Z., Grad S. Small molecules of herbal origin for osteoarthritis treatment: in vitro and in vivo evidence. *Arthritis Res Ther.* 2022:24(105). DOI: 10.1186/s13075-022-02785-y.
3. Ширинский В. С., Казыгашева Е. В., Ширинский И. В. Воспаление и иммунитет: роль в патогенезе остеоартрита. *Медицинская иммунология.* 2019;21(1):39–48. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48.
4. Aspden R. M. Subchondral bone – a welcome distraction in OA treatment. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022;30(7):911–912. DOI: 10.1016/j.joca.2022.02.617.
5. Chisari E., Yaghmour K. M., Khan W. S. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2020;28(5):708–718. DOI: 10.1016/j.joca.2019.09.008.
6. Khella C. M., Horvath J. M., Asgarian R., Rolauffs B., Hart M. L. Anti-Inflammatory therapeutic approaches to prevent or delay post-traumatic osteoarthritis (PTOA) of the knee joint with a focus on sustained delivery approaches. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(15):8005. DOI: 10.3390/ijms22158005.
7. Ногаева У. В., Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Титович И. А., Наркевич И. А., Антонов В. Г. Разработка состава и технологии комбинированного геля для терапии остеоартроза с фармакологическим обоснованием содержания компонентов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(4–1):69–78. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-69-78.
8. Ногаева У. В., Наумова А. А., Новиньков А. Г., Флисюк Е. В., Буракова М. А., Шиков А. Н., Абросимова О. Н. Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):121–129. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129.
9. Van den Bosch M. H. J., van Lent P. L. E. M., van der Kraan P. M. Identifying effector molecules, cells, and cytokines of innate immunity in OA. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2020;28(5):532–543. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.016.
10. Раймуев К. В., Ищенко А. М., Малышев М. Е. Провоспалительные и противовоспалительные цитокины в патогенезе остеоартрита. *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова*. 2018;10(3):19–27. DOI: 10.17816/mechnikov201810319-27.
11. Li H., Xie S., Qi Yu., Li H., Zhang R., Lian Y. TNFα increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetateinduced osteoarthritis. *Experimental and therapeutic medicine.* 2018;16:4737-4744. DOI: 10.3892/etm.2018.6770.
12. Yu F.-Y., Xie C.-Q., Jiang C.-L., Sun J.-T., Huang X.-Wu. TNFα increases inflammatory factor expression in synovial fibroblasts through the tolllike receptor3mediated ERK/AKT signaling pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Molecular medicine reports.* 2018;17(6):8475–8483. DOI: 10.3892/mmr.2018.8897.
13. Бадокин В. В. Сложности выбор оптимального нестероидного противовоспалительного препарата: в фокусе мелоксикам. *Русский медицинский журнал.* 2016;26:1772–1776.

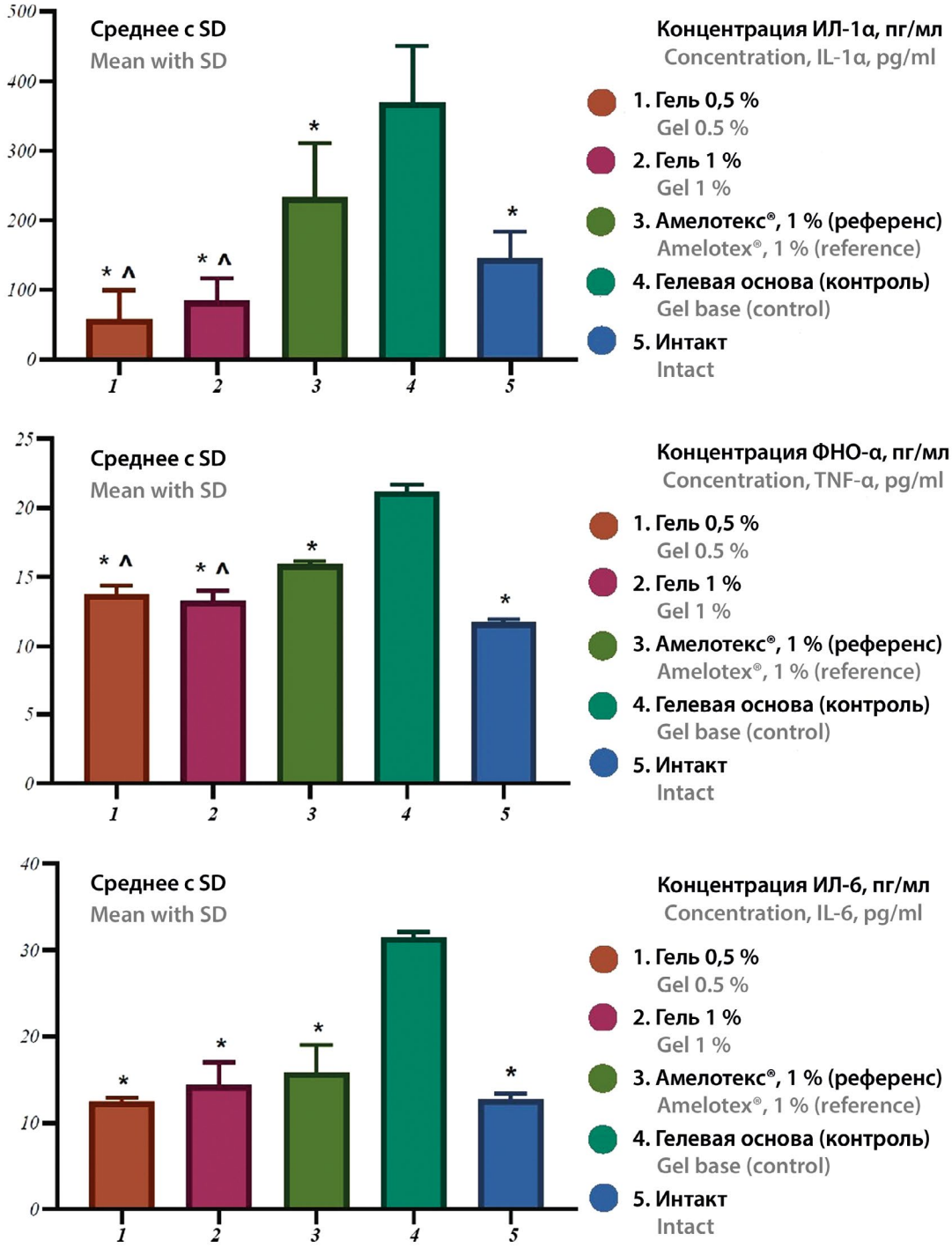


Рисунок 3. **Результаты иммуноферментного анализа концентрации ИЛ-1α, ИЛ-6 и ФНО-α в крови крыс на 28 день эксперимента**

Figure 3. **The results of enzyme immunoassay of the concentration of IL-1 α, IL-6 and TNF in the blood of rats on the 28th day of the experiment**

REFERENCES

1. Zhang H., Cai D., Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2020;28(5):555–561. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.007.
2. Zhang P., Li K., Kamali A., Ziadlou R., Ahmad P., Wang X., Richards R. G., Alini M., Basoli V., Li Z., Grad S. Small molecules of herbal origin for osteoarthritis treatment: in vitro and in vivo evidence. *Arthritis Res Ther.* 2022:24(105). DOI: 10.1186/s13075-022-02785-y.
3. Shirinsky V. S., Kazygasheva E. V., Shirinsky I. V. Inflammation and immunity: a role of pathogenesis of osteoarthritis. *Medical Immunology.* 2019;21(1):39–48. (In Russ.) DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48.
4. Aspden R. M. Subchondral bone – a welcome distraction in OA treatment. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2022;30(7):911–912. DOI: 10.1016/j.joca.2022.02.617.
5. Chisari E., Yaghmour K. M., Khan W. S. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2020;28(5):708–718. DOI: 10.1016/j.joca.2019.09.008.
6. Khella C. M., Horvath J. M., Asgarian R., Rolauffs B., Hart M. L. Anti-Inflammatory therapeutic approaches to prevent or delay post-traumatic osteoarthritis (PTOA) of the knee joint with a focus on sustained delivery approaches. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(15):8005. DOI: 10.3390/ijms22158005.
7. Nogaeva U. V., Kotsur Ju. M., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Semivelichenko E. D., Titivich I. A., Narkevich I. A., Antonov V. G. Development of the composition and technology of a combined gel for the treatment of osteoarthritis with a pharmacological rationale for the content of components. *Drug development & registration.* 2021; 10(4–1):69–78. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-69-78.
8. Nogaeva U. V., Naumova A. A., Novinkov A. G., Flisyuk E. V., Burakova M. A., Shikov A. N., Abrosimova O. N. Comparative study of rheological properties of gels and creams on different carrier bases. *Drug development & registration.* 2022;11(3):121–129. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129.
9. Van den Bosch M. H. J., van Lent P. L. E. M., van der Kraan P. M. Identifying effector molecules, cells, and cytokines of innate immunity in OA. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2020;28(5):532–543. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.016.
10. Raymuev K. V., Ishenko A. M., Malyshev M. E. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Herald of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov.* 2018;10(3):19–27. (In Russ.) DOI: 10.17816/mechnikov201810319-27.
11. Li H., Xie S., Qi Yu., Li H., Zhang R., Lian Y. TNFα increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetateinduced osteoarthritis. *Experimental and therapeutic medicine.* 2018;16:4737-4744. DOI: 10.3892/etm.2018.6770.
12. Yu F.-Y., Xie C.-Q., Jiang C.-L., Sun J.-T., Huang X.-Wu. TNFα increases inflammatory factor expression in synovial fibroblasts through the tolllike receptor3mediated ERK/AKT signaling pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Molecular medicine reports.* 2018;17(6):8475–8483. DOI: 10.3892/mmr.2018.8897.
13. Badokin V. V. Difficulties in choosing the optimal non-steroidal anti-inflammatory drug: focus on meloxicam. *Russian Medical Journal.* 2016;26:1772–1776. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β-D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров[1], П. К. Карнакова[1]✉, О. А. Арчакова[1], Д. С. Щелгачева[1], Н. С. Багаева[1], И. Е. Шохин[1], К. Я. Заславская[2], П. А. Белый[2]

[1] ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
[2] ООО «ПРОМОМЕД РУС», 129090, Россия, г. Москва, пр-т Мира, д. 13 стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Карнакова Полина К. **E-mail:** p.karnakova@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; П. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Д. С. Щелгачева – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001; Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630; К. Я. Заславская – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; П. А. Белый – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874.

Статья поступила: 30.12.2022 **Статья принята в печать:** 13.02.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Новая коронавирусная инфекция [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)] – острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), которое продолжает представлять серьезную опасность для здоровья. Молнупиравир и фавипиравир – противовирусные препараты с анти-РНК-полимеразной активностью, одобренные Министерством здравоохранения Российской Федерации для лечения COVID-19. Разработка и валидация методики совместного определения метаболита молнупиравира β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека является необходимой процедурой для проведения аналитической части клинического исследования с целью дальнейшего изучения фармакокинетики.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для дальнейшего изучения фармакокинетики молнупиравира и фавипиравира.

Материалы и методы. Определение β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков 0,1 % раствором муравьиной кислоты в ацетонитриле. Внутренний стандарт: прометазин. Подвижная фаза: аммонийно-формиатный буфер 0,01 моль/л (Элюент А), 0,1 % муравьиной кислоты, 10 % воды в ацетонитриле с прибавлением 0,08 % аммиака (Элюент В). Колонка: Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм. Аналитический диапазон методики: 50,00–10000,00 нг/мл для β-D-N4-гидроксицитидина, 250,00–20000,00 нг/мл для фавипиравира в плазме крови. Источник ионизации: электроспрей. Условия детектирования: 260,00 m/z → 82,10 m/z, 260,00 m/z → 111,00 m/z, 260,00 m/z → 127,95 m/z (β-D-N4-гидроксицитидин); 156,15 m/z → 65,95 m/z, 156,15 m/z → 85,00 m/z, 156,15 m/z → 113,10 m/z (фавипиравир); 285,05 m/z → 198,05 m/z (прометазин).

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, пригодность стандартного образца, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,00–10000,00 нг/мл для β-D-N4-гидроксицитидина и 250,00–20000,00 нг/мл для фавипиравира в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований комбинированных препаратов молнупиравира и фавипиравира.

Ключевые слова: β-D-N4-гидроксицитидин, NHC, молнупиравир, фавипиравир, COVID-19, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, фармакокинетика

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, П. К. Карнакова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин, К. Я. Заславская и П. А. Белый отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β-D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):215–226. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226

Simultaneous Determination of Major Molnupiravir Metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) and Favipiravir in Human Plasma by HPLC-MS/MS

Timofey N. Komarov[1], Polina K. Karnakova[1]✉, Olga A. Archakova[1], Dana S. Shchelgacheva[1], Natalia S. Bagaeva[1], Igor E. Shohin[1], Kira Ya. Zaslavskaya[2], Petr A. Bely[2]

© Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А., 2023
© Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., 2023

[1] LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
[2] LLC "PROMOMED RUS", 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ **Corresponding author:** Polina K. Karnakova. **E-mail:** p.karnakova@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Polina K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Dana S. Shchelgacheva – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001; Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630; Kira Ya. Zaslavskaya – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; Petr A. Bely – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874.

Received: 30.12.2022 **Revised:** 13.02.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). COVID-19 is now expected to stay with us for many years as a recurring disease. Molnupiravir and favipiravir are oral antiviral drugs with anti-RNA polymerase activity. The Russian Health Ministry has approved molnupiravir and favipiravir for the treatment of COVID-19. The study describes development and validation of high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir in human blood plasma. The method could be applied in pharmacokinetic study of molnupiravir and favipiravir.

Aim. The aim of this study is to develop and validate a HPLC-MS/MS bioanalytical method for the determination of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir in human plasma.

Materials and methods. The determination of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir in human plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by 0.1 % formic acid in acetonitrile. Internal standard: promethazine. Mobile phase: 0.01 mol/L Ammonium formate buffer solution (Eluent A), 0.1 % formic acid and 0.08 % aqueous ammonia in water/acetonitrile 10 : 90 (Eluent B). Column: Shim-pack GWS C18, 150 × 4.6 mm, 5 µm. Analytical range: 50.00–10000.00 ng/mL for β-D-N4-Hydroxycytidine, 250.00–20000.00 ng/mL for favipiravir in human plasma. Ionization source: electrospray ionization. Detection conditions: 260.00 m/z → 82.10 m/z, 260.00 m/z → 111.00 m/z, 260.00 m/z → 127.95 m/z (β-D-N4-Hydroxycytidine); 156.15 m/z → 65.95 m/z, 156.15 m/z → 85.00 m/z, 156.15 m/z → 113.10 m/z (favipiravir); 285.05 m/z → 198.05 m/z (promethazine).

Results and discussion. This method was validated by selectivity, suitability of reference standard, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, the lower limit of quantification, carry-over effect and stability.

Conclusion. The HPLC-MS/MS method for quantitative determination of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir in human plasma was developed and validated. The analytical range was 50.00–10000.00 ng/mL for β-D-N4-Hydroxycytidine, 250.00–20000.00 ng/mL for favipiravir in human plasma. This method was applied to investigate the pharmacokinetics of molnupiravir and favipiravir.

Keywords: β-D-N4-Hydroxycytidine, NHC, molnupiravir, favipiravir, COVID-19, 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. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Polina K. Karnakova developed and validated the analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out the statistical analysis. Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely conceived the study and were in charge of direction and planning. All authors discussed the results.

For citation: Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A. Simultaneous Determination of major molnupiravir metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) and Favipiravir in Human Plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(1):215–226. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)] – острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), которое продолжает представлять серьезную опасность для здоровья. Известно, что появление новых разновидностей коронавируса SARS-CoV-2 приводит к росту заболеваемости COVID-19 [2]. Одним из самых последних субвариантов омикрон-штамм коронавируса является штамм «Кракен» [2, 3]. Несмотря на то, что патогенность Кракена по сравнению с другими вариантами омикрона изменилась незначительно [2], важно продолжать заниматься разработкой новых лекарственных препарат для лечения COVID-19, чтобы быть готовыми к появлению новых вариантов вируса SARS-CoV-2 с различной патогенностью.

В настоящее время согласно версии № 17 временных методических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции для этиотропной терапии COVID-19 рекомендуется назначать такие противовирусные препараты, как молнупиравир и фавипиравир [1].

Молнупиравир (({(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-Дигидрокси-5-[4-(гидроксиамино)-2-оксопиримидин-1(2H)-ил]оксолан-2-ил}метил)(2-метилпропаноат) – противовирусный препарат с анти-РНК-полимеразной активностью. Молнупиравир является пролекарством, которое в

[1] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (14.12.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ Ссылка активна на 05.02.2023.

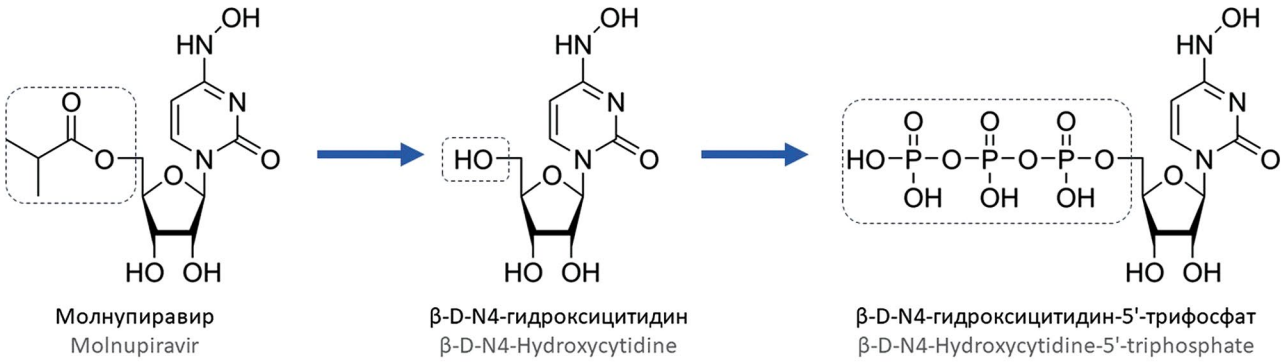


Рисунок 1. Метаболизм молнупиравира

Figure 1. Molnupiravir metabolism

плазме крови под действием эстеразы метабилизируется до аналога рибонуклеозида β-D-N4-гидроксицитидина (NHC [β-D-N4-Hydroxycytidine, NHC]). Затем β-D-N4-гидроксицитидин фосфорилируется под действием киназы с образованием активного рибонуклеозидтрифосфата, который в свою очередь встраивается в РНК вируса, вызывая накопление мутаций и подавление вирусной репликации [4–6]. Схема метаболических превращений молнупиравира представлена на рисунке 1. Препарат обладает пероральной биодоступностью, поэтому может назначаться амбулаторным пациентам на ранних стадиях заболевания COVID-19 [5, 6]. В России молнупиравир рекомендован к применению для лечения COVID-19 с легким или среднетяжелым течением у взрослых, в том числе в случаях повышенного риска прогрессирования COVID-19 до тяжелого течения и не требующих дополнительной оксигенотерапии. Для медикаментозного лечения COVID-19 следует назначать препарат молнупиравир как можно раньше после постановки диагноза[1].

Фавипиравир (5-фтор-2-оксо-1H-пиразин-3-карбоксамид, ФАВ [Favipiravir, FAV]) является синтетическим препаратом с прямым противовирусным действием в отношении вирусной РНК-полимеразы. Механизм действия фавипиравира схож с механизмом действия молнупиравира. Аналогично молнупиравиру, фавипиравир является пролекарством, которое после фосфорилирования переходит в активную форму и ингибирует вирусную РНК-полимеразу [7, 8]. В России зарегистрированы препараты фавипиравира для перорального и парентерального введения[2].

Известно, что совместное применение молнупиравира и фавипиравира является возможным, поскольку оба препарата обладают высокой биодоступностью при пероральном введении [7]. Также отмечается, что при совместном приеме с фавипиравиром возможно применять молнупиравир в более низкой дозе [7, 9].

В настоящее время опубликован целый ряд новых исследований по определению метаболита молнупиравира β-D-N4-гидроксицитидина, а также фавипиравира в биологических жидкостях человека с целью изучения фармакокинетических параметров. Для определения β-D-N4-гидроксицитидина в биологических жидкостях применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], а также метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)]. Для определения фавипиравира применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV)], с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) [high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD)], а также ВЭЖХ-МС/МС и СВЭЖХ-МС/МС.

В методиках определения β-D-N4-гидроксицитидина в качестве пробоподготовки используется способ осаждения белков ацетонитрилом, а также ультрафильтрация; в методиках определения фавипиравира – жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), а также осаждение белков плазмы крови различными органическими растворителями (таблица 1).

До настоящего времени в научной литературе не было опубликовано методик совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в био-

[1] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (14.12.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ Ссылка активна на 05.02.2023.

[2] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/ Ссылка активна на 05.02.2023.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира

Table 1. Bioanalytical methods of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir quantitative determination

Аналитический метод (источник ионизации; ионизация (+/–), если применимо) Analytical method (ionization source; ionization (+/–) if applicable)	**Объект анализа** Object	**Пробоподготовка** Sample preparation	**Аналитический диапазон** Analytical range	**Ссылка** Reference
NHC				
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; +) HPLC-MS/MS (electrospray; +)	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	20,00–10000,00 нг/мл 20.0–10000.0 ng/mL	[10]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; -)	Плазма крови человека, слюна человека Human plasma, salvia	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	2,50–5000,00 нг/мл 2.50–5000.00 ng/mL	[11]
СВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) UPLC-MS/MS (electrospray; +)	Плазма крови человека Human plasma	Ультрафильтрация Ultrafiltration	1,00–5000,00 нг/мл 1.00–5000.00 ng/mL	[12]
ФАВ *FAV*				
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	3,10–60,00 мкг/мл 3.10–60.00 μg/mL	[13]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	0,10–100,00 мкг/мл 0.10–100.00 μg /mL	[14]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков метанолом Protein precipitation by methanol	0,25–200,00 мкг/мл 0.25–200.00 μg /mL	[15]
ВЭЖХ-ФЛД HPLC-FLD	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков изопропанолом Protein precipitation by isopropanol	40,00–240,00 нг/мл 40.00–240.00 ng/mL	[16]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков метанолом Protein precipitation by methanol	100,00–20000,00 нг/мл 100.00–20000.00 ng/mL	[17]
СВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) UPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	0,25–16,00 мкг/мл 0.25–16.00 μg/mL	[18]

логических матрицах человека, поэтому было принято решение разработать и валидировать методику совместного определения данной комбинации веществ самостоятельно. Ранее нами уже была разработана методика определения фавипиравира в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ с целью изучения фармакокинетики фавипиравира при парентеральном введении [15]. В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС при пероральном применении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Для проведения хроматографического разделения и детектирования был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera XR с градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, устройством автоматической подачи образцов в автосамплер, краном переключения линии потока высокого давления и с тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь). Обработка первич-

ных данных была проведена при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91, Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

При проведении исследования были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (класс «HPLC Super Gradient», Macron, Польша); метанол (класс х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия); муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Германия & AppliChem, Испания); водный раствор аммиака 30 % («for analysis, ACS», PanReac, Германия & AppliChem, Испания); аммоний формиат «eluent additive for LC-MS, LiChropur™, >99.0 %», Sigma-Aldrich, США); вода деминерализованная (I класс чистоты).

Для приготовления исходных стандартных растворов (ИСР) и рабочих стандартных растворов (РСР) были использованы стандартные образцы (СО) β-D-N4-гидроксицитидина (АО «Биохимик», Россия, количественное содержание 93,00 %), фавипиравира (АО «Биохимик», Россия, количественное содержание 100,40 %), а также прометазина гидрохлорида (USP reference standard, Франция, количественное содержание 99,90 %). ИСР β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира, а также ИСР внутреннего стандарта [ВС (internal standard, IS)] прометазина [ПРОМ (Promethazine, PROM)]. готовили путем растворения точных навесок субстанций в метаноле. Концентрация ИСР β-D-N4-гидроксицитидина составила 200 000,00 нг/мл, фавипиравира – 400 000,00 нг/мл, прометазина – 100 000,00 нг/мл.

Смешанные РСР β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира были приготовлены путем разведения ИСР β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира метанолом до получения в плазме концентраций калибровочных уровней № 1–8 и уровней контроля качества (КК): нижнему пределу количественного определения (НПКО) [Lower limit of quantification (LLOQ)], низкому [L (low)], среднему [M1 и M2 (middle 1, middle 2)] и высокому уровням [H (high)] (таблица 2). РСР ВС прометазина был приготовлен путем разведения ИСР прометазина метанолом до получения в плазме концентраций 256,10 нг/мл.

Образцы интактной плазмы крови, а также ИСР и РСР хранились в морозильной камере при температуре –42,5 ± 7,5 °C.

Пробоподготовка

В центрифужную микропробирку типа «Эппендорф» переносили аликвоту образца, прибавляли РСР ВС прометазина, затем проводили осаждение белков плазмы крови 0,1 % раствором муравьиной кислоты в ацетонитриле. После этого образец перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд, проводили центрифугирование в течение 15 мин с ускорением 15 000 g, переносили супернатант в хроматографические виалы, помещали виалы в автосамплер хроматографа. На рисунке 2 представлена схема пробоподготовки.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ в калибровочных образцах и образцах КК

Table 2. β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir concentrations at calibration levels and quality control samples

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analyte concentration, ng/ml		Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml
	NHC	ФАВ FAV	ПРОМ PROM
1	50,00	250,00	256,10
2	250,00	500,00	256,10
3	500,00	1000,00	256,10
4	1000,00	3000,00	256,10
5	3000,00	6000,00	256,10
6	6000,00	10000,00	256,10
7	8000,00	15000,00	256,10
8	10000,00	20000,00	256,10
LLOQ	50,00	250,00	256,10
L	150,00	750,00	256,10
M1	2000,00	4000,00	256,10
M2	5000,00	12000,00	256,10
H	7500,00	16000,00	256,10

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges C18, 4 × 3,0 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: Элюент А: аммонийно-формиатный буфер 0,01 моль/л (по объему); Элюент В: 0,1 % муравьиной кислоты, 10 % воды в ацетонитриле с прибавлением 0,08 % аммиака (по объему).
- Градиент по составу подвижной фазы и скорость потока подвижной фазы представлены в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока, мл/мин Flow rate, mL/min
0,00	94,00	6,00	1,70
0,90	94,00	6,00	1,70
0,95	0,00	100,00	1,70
1,00	0,00	100,00	1,00
1,40	0,00	100,00	1,00
1,50	94,00	6,00	1,00
3,10	94,00	6,00	1,00
3,20	94,00	6,00	1,70
4,50	94,00	6,00	1,70

- Объем вводимой пробы: 20 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–4,50 мин.

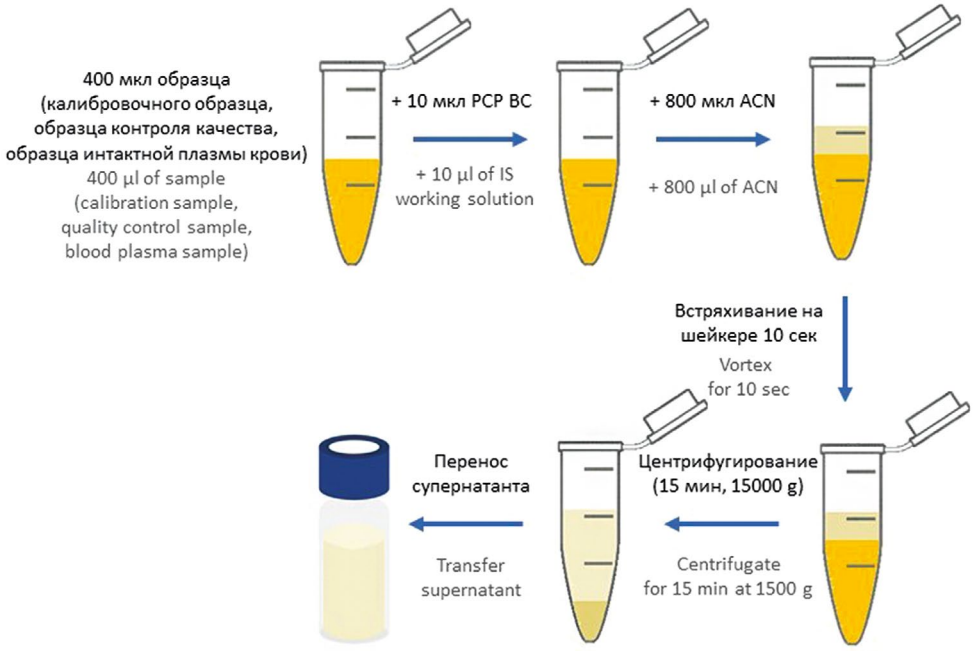


Рисунок 2. **Схема пробоподготовки**

Figure 2. **Sample preparation**

- Источник ионизации: электроспрей.
- Параметры источника ионизации: распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °С, линия десольватации 200 °С.
- Напряжение на капилляре, режим ионизации и условия детектирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. **Параметры источника ионизации и условия детектирования**

Table 4. **Ion-source parameters and detection conditions**

	Режим ионизации, напряжение на капилляре, кВ Ion mode, capillary voltage, kV	**Условия детектирования, m/z** Detection conditions, m/z
NHC	+5,0	260,00 → 82,10 260,00 → 111,00 260,00 → 127,95
ФАВ FAV	–5,0	156,15 → 65,95 156,15 → 85,00 156,15 → 113,10
ПРОМ PROM	+4,5	285,05 → 198,05

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Молнупиравир в плазме крови человека метаболизируется до β-D-N4-гидроксицитидина, который не связывается с белками плазмы крови [4–6]. В связи с этим проводится количественное определение в плазме крови человека основного метаболита β-D-N4-гидроксицитидина.

В качестве ВС для β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира был выбран прометазин ((RS)-N,N,α-триметил-10H-фенотиазин-10-этанамин). Прометазин имеет схожую с аналитическими веществами структуру и физико-химические свойства (таблица 5).

Таблица 5. **Физико-химические свойства анализируемых веществ и внутреннего стандарта**

Table 5. **Chemical and physical characteristics of the analytes and IS**

	pKa	**log P**	**Молекулярная масса** Molecular weight
NHC[1] NHC[1]	12.55	–2,70	259,218
ФАВ[2] FAV[2]	9,39	0,49	157,104
ПРОМ[3] PROM[3]	9,05	4,29	284,419

Примечание. [1] N4-Hydroxycytidine. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB15660. Ссылка активна на 05.02.2023.

[2] Favipiravir. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB12466. Ссылка активна на 05.02.2023.

[3] Promethazine. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB01069. Ссылка активна на 05.02.2023.

Note. [1] N4-Hydroxycytidine. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB15660. Accessed: 05.02.2023.

[2] Favipiravir. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB12466. Accessed: 05.02.2023.

[3] Promethazine. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB01069. Accessed: 05.02.2023.

Для проведения анализа были использованы условия масс-спектрометрического детектирования, позволяющие получить пики β-D-N4-гидроксицитиди-

на, фавипиравира и прометазина с наибольшей интенсивностью. Для этого во время разработки методики были проанализированы фрагменты, получаемые при разных энергиях соударения.

Для хроматографического разделения данной комбинации веществ, исходя из их физико-химических свойств, была выбрана колонка Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм.

В качестве пробоподготовки рассматривались варианты осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом, подкисленным раствором ацетонитрила, метанолом и трифторуксусной кислотой. В итоге, в качестве осадителя был выбран 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, т. к. только при его использовании происходило наиболее полное осаждение белков плазмы крови и обеспечивалась оптимальная форма хроматографических пиков.

Валидация методики

Валидация разработанной биоаналитической методики была проведена в соответствии с правилами проведения исследований биоэквивалентности в рамках Евразийского экономического союза[1] на основе правил руководств EMA[2] и FDA[3]. Методика прошла полную валидацию по следующим параметрам: селективность, пригодность СО, калибровочная кривая, точность и прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения (НПКО), перенос пробы, стабильность (стабильность ИСР и РСР; краткосрочная стабильность аналита в матрице («настольная» и «постпрепаративная»), долгосрочная стабильность аналита в матрице; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке). Основные валидационные характеристики с критериями приемлемости представлены в таблице 6.

Селективность

Использовались по шесть различных образцов интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы крови и гиперлипидемической интактной плазмы крови, в которых было доказано отсутствие содержания анализируемых веществ, а также образцы с прибавлением РСР до концентраций на уровне НПКО (см. таблица 2). Хроматограмма образца интактной плазмы крови человека представлена на рисунке 3.

Таблица 6. Основные валидационные характеристики

Table 6. Validation characteristics

Валидационная характеристика Validation characteristics	**Критерий приемлемости** Acceptance criteria
Селективность Selectivity	Образец интактной плазмы крови: сигнал аналита ≤20 % от сигнала НПКО, сигнал ВС ≤5 % от сигнала ВС Blank samples: the analyte ≤20 % LLOQ, the IS response ≤5 %
Пригодность стандартного образца Suitability of reference standard	Нулевой образец: сигнал аналита ≤20 % от сигнала НПКО, калибровочный образец 8 уровня без ВС: сигнал ВС ≤5 % от сигнала ВС Zero calibrators: the analyte ≤20 % LLOQ, calibration level 8 no IS ≤5 % IS
Калибровочная кривая Calibration curve	$R \geq 0{,}99$; $-20\ \% \leq E, \% \leq 20\ \%$ – для концентрации на уровне НПКО, $-15\ \% \leq E, \% \leq 15\ \%$ – для концентраций остальных точек $R \geq 0{,}99$; $-15\ \% \leq E \leq 15\ \%$, except $-20\ \% \leq E \leq 20\ \%$ at LLOQ
Точность (внутри циклов, между циклами) Accuracy (inter-day, intra-day)	$-20\ \% \leq E, \% \leq 20\ \%$ – для концентрации на уровне НПКО, $-15\ \% \leq E, \% \leq 15\ \%$ – для концентраций остальных точек $-15\ \% \leq E \leq 15\ \%$, except $-20\ \% \leq E \leq 20\ \%$ at LLOQ
Прецизионность (внутри циклов, между циклами) Precision (inter-day, intra-day)	RSD ≤ 20 % – для концентрации на уровне НПКО, RSD ≤ 15 % – для концентраций остальных точек RSD ≤ 15 %, except RSD ≤ 20 % at LLOQ
НПКО LLOQ	RSD ≤ 20 %, $-20\ \% \leq E, \% \leq 20\ \%$
Степень извлечения Spike recovery	RSD ≤ 15 %
Эффект матрицы Matrix effect	Фактор матрицы анализируемых ве-ществ, нормализованного по фактору матрицы ВС: RSD ≤ 15 % IS-normalized matrix factors of the analytes: RSD ≤ 15 %;
Стабильность Stability	$-15\ \% \leq E, \% \leq 15\ \%$
Перенос пробы Carry-over effect	Образец интактной плазмы крови: сигнал аналита ≤20 % от сигнала НПКО, сигнал ВС ≤5 % от сигнала ВС Blank samples: the analyte ≤20 % LLOQ, the IS response ≤5 %

Примечание. RSD, % – относительное стандартное отклонение, E, % – относительная погрешность.

Note. RSD, % – relative standard deviation, E, % – relative error.

Пригодность стандартного образца

Проводили анализ нулевого образца, приготовленного с добавлением раствора ВС (ПРОМ 256,10 нг/мл), образца, приготовленного из интактной плазмы крови с добавлением смешанного РСР (NHC 10 000,00 нг/мл, ФАВ 20 000,00 нг/мл) и без добавления ВС, образца контроля качества на уровне НПКО (NHC 50,00 нг/мл, ФАВ 250,00 нг/мл). Хроматограмма образца для оценки пригодности СО представлена на рисунке 4.

[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 05.02.2023.

[2] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/ Accessed: 05.02.2023.

[3] Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/ Accessed: 05.02.2023.

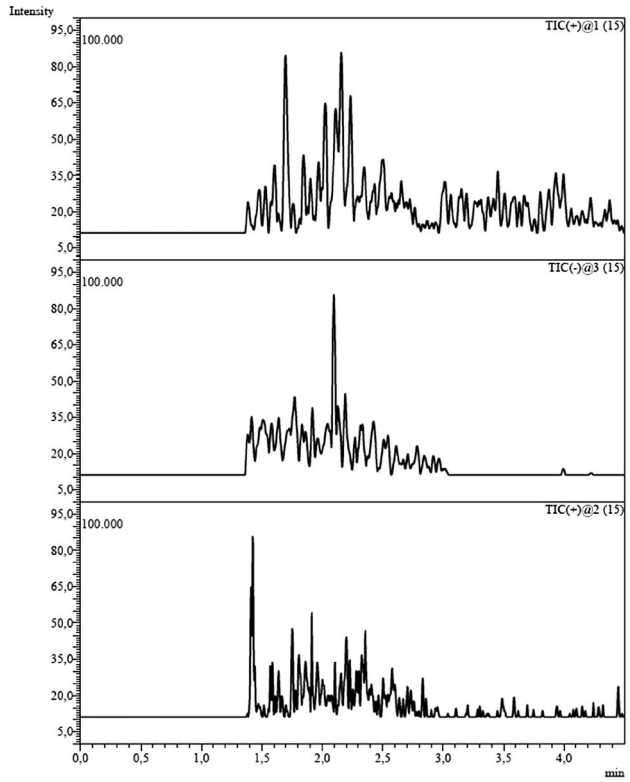


Рисунок 3. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови**

Figure 3. **Chromatogram of blank human plasma sample**

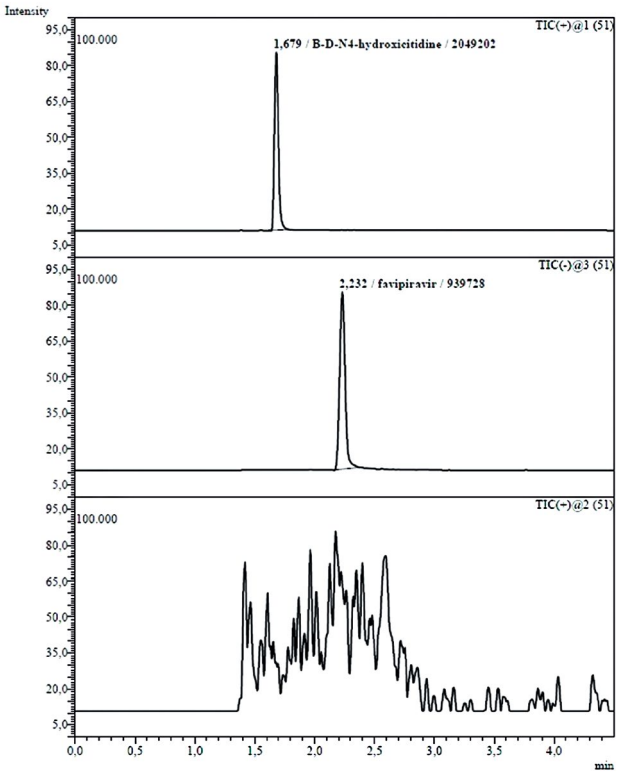


Рисунок 4. **Хроматограмма образца без внутреннего стандарта (NHC 10 000,00 нг/мл, ФАВ 20 000,00 нг/мл)**

Figure 4. **Chromatogram of sample without IS (NHC 10 000.00 ng/mL, FAV 20 000.00 ng/mL)**

Калибровочная кривая

Для оценки данного параметра был проведен анализ восьми образцов интактной плазмы крови с прибавлением РСР ВС прометзина до концентрации 256,10 нг/мл и смешанных РСР β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира до концентраций β-D-N4-гидроксицитидина в диапазоне 50,00–10 000,00 нг/мл и фавипиравира в диапазоне 250,00–20 000,00 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови.

Калибровочные графики имели линейный вид. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции (R) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–4 приведены в таблице 7. Полученные значения коэффициентов корреляции составляют более 0,99.

Точность и прецизионность

Были проанализированы калибровочные образцы плазмы крови, соответствующие уровням контроля качества LLOQ, L, M1, M2 и H (см. таблица 2). Анализ проводили в рамках 4 последовательностей по 5 вводов образца для каждого уровня концентрации β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира. Исследование проводили в течение 1–4 последовательностей (внутри циклов и между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и

Таблица 7. **Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции**

Table 7. **Calibration equation and correlation coefficients**

№	NHC		ФАВ FAV	
	Уравнение Calibration equation	R	Уравнение Calibration equation	R
1	0,0357194 · *x* + 0,00290660	0,9987935	0,00746999 · *x* + 0,000430450	0,9992086
2	0,0438155 · *x* + 0,00249078	0,9996536	0,00819751 · *x* + 0,000837929	0,9985260
3	0,0390813 · *x* + 0,00274801	0,9980786	0,00721237 · *x* – 3,78162e – 007	0,9987659
4	0,0310063 · *x* + 0,00444778	0,9977221	0,00300419 · *x* + 0,000701577	0,9965709

относительной погрешности (E, %); на уровне между циклами использовались данные, полученные в течение 1–3 последовательностей (между циклами, $n = 15$), а также в течение 1–4 последовательностей (между циклами, $n = 20$). Данные точности и прецизионности методики определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира между 1–4 последовательностями ($n = 20$) представлены в таблице 8.

Таблица 8. Точность и прецизионность методики определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира ($n = 20$)

Table 8. Accuracy and precision of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir determination ($n = 20$)

Введено (мкг/мл) Injected (μg/mL)	ННС		ФАВ FAV	
	RSD, %	E, %	RSD, %	E, %
LLOQ	10,95	–0,58	9,82	–0,01
L	5,17	0,76	8,44	–5,23
M1	2,66	0,32	5,13	–6,34
M2	4,83	–4,52	5,26	–6,46
H	4,19	–6,39	4,70	–5,32

Нижний предел количественного определения

За НПКО методики была принята минимальная концентрация β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение со значениями RSD и E не более 20 %: 50,00 нг/мл для β-D-N4-гидроксицитидина и 250,00 нг/мл для фавипиравира. Хроматограмма плазмы крови с содержанием аналитических веществ на уровне НПКО представлена на рисунке 5.

Степень извлечения

Были проанализированы по три образца, приготовленные из интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы и гиперлипидемической интактной плазмы без влияния степени извлечения на уровнях L, M1, M2 и H (см. таблица 2), а также образцы КК, приготовленные на различных видах биологической интактной матрицы для оценки степени извлечения. Среднее значение степени извлечения β-D-N4-гидроксицитидина из различных видов интактных биологических матриц составляет 91,37 % (RSD = 10,20 %), фавипиравира – 91,96 % (RSD = 12,75 %). Данные представлены в таблице 9.

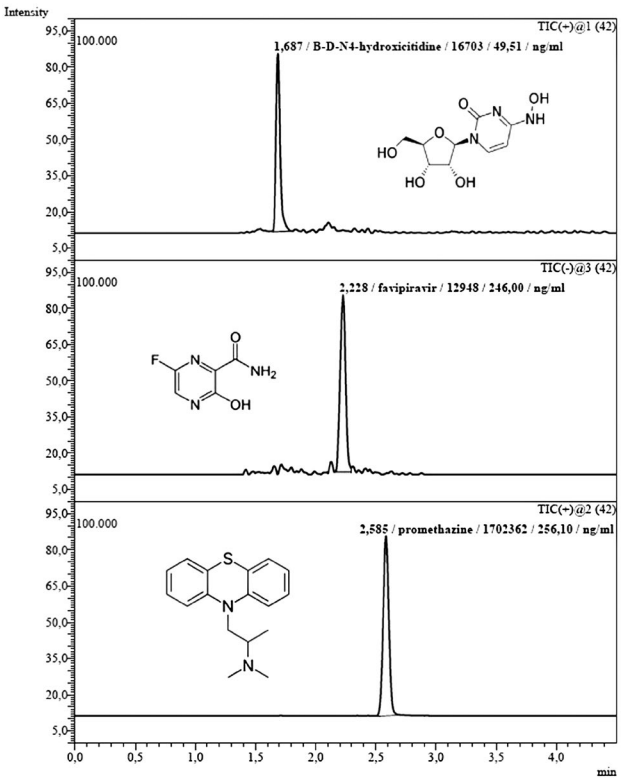


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови (ННС 50,00 нг/мл, ФАВ 250,00 нг/мл)

Figure 5. Chromatogram of plasma sample (NHC 50.00 ng/mL, FAV 250.00 ng/mL)

Таблица 9. Оценка степени извлечения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира на уровнях L, M1, M2 и H из различных видов биологической матрицы

Table 9. Calculation of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir recovery at levels L, M1, M2, H

Биологическая матрица Biological matrix	СИ ННС, % Recovery NHC, %				СИ ФАВ, % Recovery FAV, %			
	L	M1	M2	H	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank plasma	79,51	100,45	95,72	88,93	71,89	92,79	97,00	83,87
	83,72	98,75	105,48	93,07	73,16	98,42	107,71	95,30
	80,08	108,52	111,36	86,89	67,18	108,35	106,65	83,95
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	87,34	98,58	90,01	94,65	76,19	100,41	104,01	91,37
	77,66	101,50	91,09	92,27	75,67	105,71	98,33	92,51
	86,66	91,25	96,63	97,40	85,67	91,36	104,00	97,25
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	75,06	95,62	95,43	80,90	70,24	101,50	104,37	79,89
	74,45	97,28	93,27	86,42	85,22	101,08	95,25	88,36
	78,59	96,27	99,72	78,75	87,81	98,78	105,51	83,78
Среднее Average	91,37				91,96			
RSD	10,20				12,75			

Эффект матрицы

Для оценки влияния биологической матрицы на количественное определение β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира были проанализированы образцы с добавлением смешанных РСР без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учета влияния степени извлечения анализируемых веществ и ВС из биологической матрицы. Эффект матрицы был оценен на уровнях L и H аналитических диапазонов концентраций β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира (таблица 2). Для ВС прометазина эффект матрицы был рассчитан на уровне 256,10 нг/мл. Данные представлены в таблице 10.

Стабильность

Были проанализированы по пять образцов для оценки настольной и постпрепаративной краткосрочной стабильности, стабильности при трехкратной заморозке-разморозке, стабильности исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 24 дней при температуре –50 до –35 °С), долгосрочной стабильности аналита на уровнях L и H (таблица 2). Долгосрочная стабильность была оценена дважды: проводилась промежуточная оценка при хранении в течение 24 дней при температуре от – при температуре от –25 до –15 °С и при температуре от –85 до –65 °С а также дополнительная оценка при хранении в течение 59 дней при температуре от –25 до –15 °С и при температуре от –85 до –65 °С, поскольку минимальный срок для оценки данного вида стабильности должен соответствовать периоду хранения образцов от начала отбора в клиническом центре до момента завершения анализа последней пробы аналитического этапа исследования. Результаты оценки стабильности представлены в таблице 11.

Таблица 10. Расчет фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта

Table 10. Calculation of IS-normalized matrix factors of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir

Биологическая матрица Biological matrix	NHC NHC		ФАВ FAV	
	Нормализованный Mf Normalized Mf			
	L	H	L	H
Интактная плазма крови Blank plasma	0,77	1,10	1,00	1,26
	0,79	1,05	0,96	1,16
	0,80	1,05	1,09	1,16
	0,76	1,04	0,97	1,12
	0,80	1,06	0,97	1,22
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	0,84	1,04	1,03	1,21
	0,70	0,95	1,02	1,15
	0,83	0,93	0,99	1,06
	0,72	0,85	0,95	0,99
	0,72	0,95	0,83	1,07
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	0,70	1,09	1,01	1,29
	0,78	1,12	0,99	1,33
	0,73	1,07	0,93	1,13
	0,79	0,99	0,90	1,12
	0,79	1,07	0,91	1,14
Среднее Average	0,78	1,05	0,98	1,19
RSD, %	6,70	10,31	6,45	9,59

Таблица 11. Оценка стабильности

Table 11. Stability assessment

Вид стабильности Type of stability	Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions	Среднее значение E, % Average value of E, %			
		NHC		ФАВ FAV	
		L	H	L	H
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализируются свежеприготовленными; хранение при температуре 20 ± 5 °С Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °С	–10,97	–7,53	–2,54	1,63
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	78 часа при температуре 4 °С 78 hours at 4 °С	–3,55	–4,99	–8,58	–5,68
Стабильность при трехкратной заморозке-разморозке Freeze-thaw stability	36 часа при температуре –42,5 ± 7,5 °С и 6 часов при температуре 20 ± 5 °С 36 hours at –42.5 ± 7.5 °С and 6 hours at 20 ± 5 °С	4,66	–9,66	–1,86	–14,70
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	24 дней при температуре –20 ± 5 °С 24 days at –20 ± 5 °С	7,02	–1,63	–8,82	–11,89
	24 дней при температуре –75 ± 10 °С 24 days at –75 ± 10 °С	9,81	0,44	–12,22	–11,94
	59 дней при температуре –20 ± 5 °С 59 days at –20 ± 5 °С	–12,68	–8,29	–11,87	–13,03
	59 дней при температуре –75 ± 10 °С 59 days at –75 ± 10 °С	–10,61	–5,71	–10,42	–11,41
Стабильность ИСР Stock solution stability	24 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °С 24 days at –42.5 ± 7.5 °С	–2,23	–3,43	–9,62	–10,42
Стабильность РСР Work solution stability	24 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °С 24 days at –42.5 ± 7.5 °С	8,15	–1,37	–7,11	–10,01

Таблица 12. Оценка переноса пробы

Table 12. Assessment of carry-over effect

№	Образец Sample	Значение площади Area			Отношение площадей, % Area ratio, %		
		NHC	ФАВ FAV	ПРОМ PROM	NHC	ФАВ FAV	ПРОМ PROM
1	НПКО LLOQ	17042	12405	1758043	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	1886	0	0	11,07	0,00	0,00
2	НПКО LLOQ	16204	11618	1348471	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	0	0	14723	0,00	0,00	1,09
3	НПКО LLOQ	15746	12016	1581170	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	0	0	16587	0,00	0,00	1,05

Перенос пробы

Для оценки параметра «перенос пробы» в рамках валидационных циклов № 1–3 был проведен последовательный анализ калибровочных образцов на уровне 8 (см. таблица 2) и образцов интактной плазмы крови. Результаты оценки переноса пробы представлены в таблице 12.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена разработка и валидация методики совместного количественного определения β-D-N4-гидроксицитидин и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,00–10 000,00 нг/мл для β-D-N4-гидроксицитидина и 250,00–20 000,00 нг/мл для фавипиравира в плазме крови. Данный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований комбинированных препаратов молнупиравира и фавипиравира.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li C. X., Noreen S., Zhang L. X., Saeed M., Wu P. F., Ijaz M., Dai D. F., Maqbool I., Madni A., Akram F., Naveed M. A critical analysis of SARS-CoV-2 (COVID-19) complexities, emerging variants, and therapeutic interventions and vaccination strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;146:112550. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112550.
2. Popovic M. XBB.1.5 Kraken Cracked: Gibbs Energies of Binding and Biosynthesis of the XBB.1.5 Variant of SARS-Cov-2. *Preprints*. 2023;2023010404. DOI: 10.20944/preprints202301.0404.v1.
3. Parums D. V. The XBB. 1.5 ('Kraken') Subvariant of Omicron SARS-CoV-2 and its Rapid Global Spread. Medical Science Monitor: International Medical. *Journal of Experimental and Clinical Research*. 2023;29:e939580. DOI: 10.12659/MSM.939580.
4. Lee C. C., Hsieh C. C., Ko W. C. Molnupiravir — A Novel Oral Anti-SARS-CoV-2 Agent. *Antibiotics*. 2021;10:1294. DOI: 10.3390/antibiotics10111294.
5. Pourkarim F., Pourtaghi-Anvarian S., Rezaee H. Molnupiravir: A new candidate for COVID-19 treatment. *Pharmacology research & perspectives*. 2022;10(1):e00909. DOI: 10.1002/prp2.909.
6. Gordon C. J., Tchesnokov E. P., Schinazi R. F., Götte M. Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;297(1):100770. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100770.
7. Sharaf Y. A., El Deeb S., Ibrahim A. E., Al-Harrasi A., Sayed R. A. Two green micellar HPLC and mathematically assisted UV spectroscopic methods for the simultaneous determination of molnupiravir and favipiravir as a novel combined COVID-19 antiviral regimen. *Molecules*. 2022;27(7):2330. DOI: 10.3390/molecules27072330.
8. Балакин К. В., Стороженко Р. В., Якубова Е. В. Фавипиравир как средство терапии COVID-19. *Научный бюллетень ХимРар*. 2023;1.
9. Eloy P., Le Grand R., Malvy D., Guedj J. Combined treatment of molnupiravir and favipiravir against SARS-CoV-2 infection: One+ zero equals two? *EBioMedicine*. 2021;74:103663. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103663.
10. Gouda A. S., Marzouk H. M., Rezk M. R., Salem A. M., Morsi M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Hassan A. Y., Abdel-Megied A. M. A validated LC-MS/MS method for determination of antiviral prodrug molnupiravir in human plasma and its application for a pharmacokinetic modeling study in healthy Egyptian volunteers. *Journal of Chromatography B*. 2022;1206:123363. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123363.
11. Amara A., Penchala S. D., Else L., Hale C., FitzGerald R., Walker L., Lyons R., Fletcher T., Khoo S. The development and validation of a novel LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of Molnupiravir and its metabolite ß-d-N4-hydroxycytidine in human plasma and saliva. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2021;206:114356. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114356.
12. Parsons T. L., Kryszak L. A., Marzinke M. A. Development and validation of assays for the quantification of β-D-N4-hydroxycytidine in human plasma and β-D-N4-hydroxycytidine-triphosphate in peripheral blood mononuclear cell lysates. *Journal of Chromatography B*. 2021;1182:122921. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122921.
13. Hailat M., Al-Ani I., Hamad M., Zakareia Z., Abu Dayyih W. Development and Validation of a Method for Quantification of Favipiravir as COVID-19 Management in Spiked Human Plasma. *Molecules*. 2021;26(13):3789. DOI: 10.3390/molecules26133789.
14. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthol-assisted homogenous liquid-liquid microextraction for HPLC/UV determination of favipiravir as an antiviral for COVID-19 in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2022;1189:123087. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.123087.
15. Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):220–229. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229.

16. Megahed S., Habib A., Hammad S., Kamal A. Chemometric Approach Based on Factorial and Box-Behnken Designs for Determination of Anti Coronavirus Drug; Favipiravir in Bulk and Spiked Human Plasma by Green HPLC Method. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*. 2021;3(2):70–78. DOI: 10.51435/turkjac.963652.
17. Morsy M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Zainelabdeen M. A., Darwish M. M., Hassan A. Y., Gouda A. S., Rezk M. R., Abdel-Megied A. M., Marzouk H. M. A Novel LC-MS/MS Method for Determination of the Potential Antiviral Candidate Favipiravir for the Emergency Treatment of SARS-CoV-2 Virus in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study in Egyptian Human Volunteers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;199:114057. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114057.
18. Rezk M. R., Badr K. A., Abdel-Naby N. S., Ayyad M. M. A Novel, Rapid and Simple UPLC–MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2021;35(7):e5098. DOI: 10.1002/bmc.5098.

REFERENCES

1. Li C. X., Noreen S., Zhang L. X., Saeed M., Wu P. F., Ijaz M., Dai D. F., Maqbool I., Madni A., Akram F., Naveed M. A critical analysis of SARS-CoV-2 (COVID-19) complexities, emerging variants, and therapeutic interventions and vaccination strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;146:112550. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112550.
2. Popovic M. XBB.1.5 Kraken Cracked: Gibbs Energies of Binding and Biosynthesis of the XBB.1.5 Variant of SARS-Cov-2. *Preprints*. 2023;2023010404. DOI: 10.20944/preprints202301.0404.v1.
3. Parums D. V. The XBB. 1.5 ('Kraken') Subvariant of Omicron SARS-CoV-2 and its Rapid Global Spread. Medical Science Monitor: International Medical. *Journal of Experimental and Clinical Research*. 2023;29:e939580. DOI: 10.12659/MSM.939580.
4. Lee C. C., Hsieh C. C., Ko W. C. Molnupiravir — A Novel Oral Anti-SARS-CoV-2 Agent. *Antibiotics*. 2021;10:1294. DOI: 10.3390/antibiotics10111294.
5. Pourkarim F., Pourtaghi-Anvarian S., Rezaee H. Molnupiravir: A new candidate for COVID-19 treatment. *Pharmacology research & perspectives*. 2022;10(1):e00909. DOI: 10.1002/prp2.909.
6. Gordon C. J., Tchesnokov E. P., Schinazi R. F., Götte M. Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;297(1):100770. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100770.
7. Sharaf Y. A., El Deeb S., Ibrahim A. E., Al-Harrasi A., Sayed R. A. Two green micellar HPLC and mathematically assisted UV spectroscopic methods for the simultaneous determination of molnupiravir and favipiravir as a novel combined COVID-19 antiviral regimen. *Molecules*. 2022;27(7):2330. DOI: 10.3390/molecules27072330.
8. Balakin K. V., Storozhenko R. V., Jakubova E. V. Favipiravir for the treatment of COVID-19. *Nauchnyj bjulleten' HimRar*. 2023;1. (In Russ.)
9. Eloy P., Le Grand R., Malvy D., Guedj J. Combined treatment of molnupiravir and favipiravir against SARS-CoV-2 infection: One+ zero equals two? *EBioMedicine*. 2021;74:103663. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103663.
10. Gouda A. S., Marzouk H. M., Rezk M. R., Salem A. M., Morsi M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Hassan A. Y., Abdel-Megied A. M. A validated LC-MS/MS method for determination of antiviral prodrug molnupiravir in human plasma and its application for a pharmacokinetic modeling study in healthy Egyptian volunteers. *Journal of Chromatography B*. 2022;1206:123363. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123363.
11. Amara A., Penchala S. D., Else L., Hale C., FitzGerald R., Walker L., Lyons R., Fletcher T., Khoo S. The development and validation of a novel LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of Molnupiravir and its metabolite ß-d-N4-hydroxycytidine in human plasma and saliva. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2021;206:114356. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114356.
12. Parsons T. L., Kryszak L. A., Marzinke M. A. Development and validation of assays for the quantification of β-D-N4-hydroxycytidine in human plasma and β-D-N4-hydroxycytidine-triphosphate in peripheral blood mononuclear cell lysates. *Journal of Chromatography B*. 2021;1182:122921. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122921.
13. Hailat M., Al-Ani I., Hamad M., Zakareia Z., Abu Dayyih W. Development and Validation of a Method for Quantification of Favipiravir as COVID-19 Management in Spiked Human Plasma. *Molecules*. 2021;26(13):3789. DOI: 10.3390/molecules26133789.
14. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthol-assisted homogenous liquid-liquid microextraction for HPLC/UV determination of favipiravir as an antiviral for COVID-19 in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2022;1189:123087. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.123087.
15. Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Y., Bely P. A. Development and Validation of HPLC-UV Method for the Determination of Favipiravir in Human Plasma. *Drug development & registration*. 2022;11(3):220–229. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229.
16. Megahed S., Habib A., Hammad S., Kamal A. Chemometric Approach Based on Factorial and Box-Behnken Designs for Determination of Anti Coronavirus Drug; Favipiravir in Bulk and Spiked Human Plasma by Green HPLC Method. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*. 2021;3(2):70–78. DOI: 10.51435/turkjac.963652.
17. Morsy M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Zainelabdeen M. A., Darwish M. M., Hassan A. Y., Gouda A. S., Rezk M. R., Abdel-Megied A. M., Marzouk H. M. A Novel LC-MS/MS Method for Determination of the Potential Antiviral Candidate Favipiravir for the Emergency Treatment of SARS-CoV-2 Virus in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study in Egyptian Human Volunteers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;199:114057. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114057.
18. Rezk M. R., Badr K. A., Abdel-Naby N. S., Ayyad M. M. A Novel, Rapid and Simple UPLC–MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2021;35(7):e5098. DOI: 10.1002/bmc.5098.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-227-236
УДК 543.544; 615.074

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Об аналитических и технологических причинах результатов Out-of-Specification для тестов количественное опредение и растворение (обзор)

Н. А. Эпштейн✉

[1]Центр регистрации и разработки лекарственных средств ООО «ИРВИН 2», 115446, Россия, г. Москва, Коломенский проезд, 13А

✉ **Контактное лицо:** Эпштейн Наум Аронович. **E-mail:** naumepshtein@gmail.com

ORCID: Н. А. Эпштейн – https://orcid.org/0000-0001-8047-4078.

Статья поступила: 04.07.2022 **Статья принята в печать:** 14.02.2023 **Статья опубликована:** 24.02.2023

Резюме

Введение. Результаты вне спецификации (OOS results) представляют собой серьезную проблему при разработке, валидации и использовании методик «Количественное определение» и «Растворение». Тема актуальная, что подтверждается данными поиска в Internet по фразе «Out-of-Specification» + «HPLC» – найдено около 35 300 результатов.

Текст. Рассмотрены и систематизированы в виде сводной таблицы важные для практики аналитические и технологические причины (факторы), которые могут приводить к получению заниженных или завышенных результатов анализов. Речь идет о следующих факторах. Факторы, связанные с расчетной формулой. Факторы, связанные с подготовкой проб (образцов). Факторы, связанные с растворителем образца и соотношением pH раствора образца и подвижной фазы. Факторы, связанные с хроматограммами и их обработкой. Основные технологические факторы.

Заключение. Представлены данные и рекомендации для поиска аналитических и технологических причин получения результатов Out-of-Specification в случае тестов «Количественное определение» и «Растворение».

Ключевые слова: Out-of-Specification, причины, аналитические и технологические факторы, тест «Количественное определение», тест «Растворение»

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

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

Для цитирования: Эпштейн Н. А. Об аналитических и технологических причинах результатов Out-of-Specification для тестов количественное опредение и растворение. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):227–236. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-227-236

About Analytical and Technological Reasons of Out-of-Specification Results for Assay and Disolution Tests (Review)

Naum A. Epshtein✉

Center of registration and development of medicines LLC «IRVIN 2», 13A, Kolomensky passage, Moscow, 115446, Russia

✉ **Corresponding author:** Naum A. Epshtein. **E-mail:** naumepshtein@gmail.com

ORCID: Naum A. Epshtein – https://orcid.org/0000-0001-8047-4078.

Received: 04.07.2022 **Revised:** 14.02.2023 **Published:** 24.02.2023

Abstract

Introduction. Out of specification (OOS) results represent a major challenge in the development, validation and use of the Assay and Dissolution methods. The topic is relevant, which is confirmed by Internet search data for the phrase "Out-of-Specification" + "HPLC" – about 35,300 results were found.

Text. The analytical and technological reasons (factors) that can lead to underestimated or overestimated test results are considered and systematized in the form of a summary table important for practice. These are the following factors. Factors associated with the calculation formula. Factors related to the preparation of samples. Factors related to the sample solvent and ratio of the pH the sample solution and the mobile phase. Factors associated with chromatograms and their processing. The main technological factors.

Conclusion. Data and recommendations are presented to search for analytical and technological reasons for obtaining Out-of-Specification results in the case of tests Assay and Dissolution.

Keywords: Out-of-Specification, reasons, analytical and technological factors

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

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

For citation: Epshtein N. A. About analytical and technological reasons of Out-of-Specification results for assay and disolution tests. *Drug development & registration*. 2023;12(1):227–236. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-227-236

© Эпштейн Н. А., 2023
© Epshtein N. A., 2023

ВВЕДЕНИЕ

Процедура Out-of-Specification (OOS) – «вне спецификации» является актуальной при разработке аналитических методик и технологий получения лекарственных средств, при анализе готовой продукции. Согласно руководству FDA по процедуре Out-of-Specification, «**результаты вне спецификации** включают все результаты испытаний, которые не соответствуют спецификациям или критериям приемлемости, установленным в документах на лекарственные средства, мастер-файлах (DMF) на активные фармацевтические субстанции, официальных руководствах, или производителем лекарственного средства. Этот термин также применяется ко всем текущим лабораторным испытаниям, которые не соответствуют установленным спецификациям» [1]. На практике это означает, что требуется всегда исследовать причины получения заниженных или завышенных результатов анализов. Поиск причины OOS является сложной задачей и требует существенных затрат времени и средств. Об актуальности темы Out-of-Specification говорит результат поиска в Internet данных по фразе «Out-of-Specification» + «HPLC» – найдено около 35 300 ссылок. Однако характерно, что в них рассматриваются только общие вопросы процедуры Out-of-Specification или просто даются ссылки на эту процедуру. Эти сведения важны для организации процедуры OOS, но они недостаточны на практике.

Целью статьи является рассмотрение важных для практики аналитических и технологических причин (факторов), которые потенциально могут приводить к получению заниженных или завышенных результатов анализов.

Прежде всего отметим, что процедура OOS подразумевает в общем случае проверку влияния всех потенциально возможных факторов [2–9]. В связи с этим полезно строить и использовать диаграмму Исикавы; наглядный пример приведен в [3]. В публикации А. Г. Макаренко наиболее подробно рассмотрена полная процедура OOS[1]. Выполнение полной процедуры OOS занимает в среднем не меньше 5 рабочих дней[2], и поэтому стремятся как можно быстрее найти причину OOS. В Интернете опубликованы SOP по процедуре OOS, например[3, 4, 5]. Опубликованы подробный чек-лист[6] и статистический подход [9] для процедуры OOS. Продается специальная компьютерная программа «Out of Specification Software» фирмы AmpleLogic[7]. В публикации [8] приведены и обсуждены 16 случаев обнаружения результатов OOS при инспекциях FDA.

Причины (факторы), которые способны повлиять на результаты анализов делят на лабораторные – фаза I исследований OOS, и технологические – фаза II [2]. Влияние лабораторных факторов рассматривают в первую очередь. Эти факторы можно условно разделить на рутинные – качество реактивов и растворителей, ошибки исполнителей в записях и расчетах, неверно взятые навески и т. д. [2, 3] и аналитические – обусловленные методикой анализа. Рутинные причины (факторы) OOS перечисляются в большинстве руководств по процедуре Out of Specification. Не рассматриваются конкретные аналитические и технологические причины (факторы), приводящие к заниженным или завышенным результатам анализа. Для логичного обоснования потенциального влияния этих факторов на OOS разобьём их на группы. Можно выделить следующие основные группы факторов. Факторы, связанные с расчетной формулой; Факторы, связанные с подготовкой проб (образцов); Факторы, связанные с растворителем образца и соотношением pH раствора образца и подвижной фазы; Факторы, связанные с хроматограммами и их обработкой; Основные технологические факторы.

Рассмотрим каждую из перечисленных ниже групп факторов. *Будем обозначать возможность завышения результатов символом* ↑, *а занижения результатов* ↓. При этом предполагается, что выполняются требования пригодности системы [1]. Пронумеруем факторы; это будет важно в дальнейшем для быстрого поиска по сводной таблице вероятных причин занижения или завышения результатов анализов.

---

[1] Макаренко А. Г. Работа с результатами вне спецификации (OOS), результатами вне трендов (OOT) и результатами вне ожидаемых (OOE) в соответствии с современными требованиями ЕС. Доступно по: https://pharm-community.com/wp-content/uploads/wpforo/attachments/8948/301-OutofSpecificationsI2.pdf. Ссылка активна на 23.09.2022.

[2] Tim Sandle. Out-of-Specification Laboratory Investigations: New Look at an Old Issue. Institute of Validation Technologe. 2018. Available at: https://www.ivtnetwork.com/article/out-specification-laboratory-investigations-new-look-old-issue. Accessed: 23.09.2022.

[3] Mubarak Patel. SOP for Handling Out of Specification (OOS). 2020. Available at: https://www.pharmaceuticalsky.com/2020/10/sop-for-handling-out-of-specification.html. Accessed: 23.09.2022.

[4] Junki Singh. Pharma Beginners Blog. Out of Specification (OOS) – SOP and Formats. 2020. Available at: https://pharmabeginers.com/out-of-specification-oos-sop/ Accessed: 23.09.2022.

[5] Out Of Specification Investigation Phase II (MHRA). Available at: https://www.pharmaguideline.net/out-of-specification-investigation-phase-ii-mhra/ Accessed: 23.09.2022.

[6] Procedures for handling OOS results. SOP # A-195-02-0100 (with Checklist). Available at: http://www.locum.co.il/img/sop10.pdf. Accessed: 23.09.2022.

[7] Out of Specification Software. AmpleLogic. Available at: https://amplelogic.com/pharma-focus/qms/out-of-specification-software/ Accessed: 23.09.2022.

Факторы, связанные с расчетной формулой

1. *В расчетной формуле ошибка* (↑↓). Для проверки этого предположения в случае методик с внешним стандартом следует подставить в расчетную формулу следующие значения параметров:
- Равные значения откликов (площадей *S* или высот пиков *H*; оптической плотности *D*) для испытуемого и стандартного раствора определяемого вещества. То есть $S = S_0$; $D = D_0$, где индекс «0» относится к стандартному образцу. Заметим, что эти равенства основываются на близости номинальных концентраций определяемого вещества в стандартном и испытуемом растворе.
- Значения массы образцов a и a_0 и другие данные из расчетной формулы, которые указаны в методике анализа.

Если формула правильная и в указанных в методике значениях a и a_0 нет ошибок, то результат расчета [*X* в формуле (1)] должен совпадать или быть очень близким к нормируемой величине содержания определяемого вещества.

Пример. Количественное определение кетоконазола в мази. Содержание кетоконазола в препарате (*X*), в %, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot (P/100) \cdot 5 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot 25 \cdot a \cdot 5} = \frac{160 \cdot S \cdot a_0 \cdot (P/100)}{S_0 \cdot a}. \quad (1)$$

Подставляем в формулу $S = S_0$ – равные значения площади пика кетоконазола на хроматограммах испытуемого раствора и раствора СО кетоконазола; значение массы СО кетоконазола по методике $a_0 = 0{,}025$ г; содержание кетоконазола в СО берется теоретически как $P = 100$ %; значение номинальной (по методике) массы испытуемого образца мази $a = 2{,}0$ г. Расчет дает $X = 2$ %, что совпадает с нормируемым значением: $2{,}0 \pm 0{,}2$ %. Следовательно формула не содержит ошибок и значения масс стандартного образца и испытуемой пробы указаны правильно.

Аналогичный способ справедлив и для проверки расчетных формул для методов внутреннего стандарта: подставляют не сами значения откликов, а их отношения к откликам внутреннего стандарта.

2. *В стандартном образце не учли содержание влаги и остаточных органических растворителей* (↑) [11]. Из-за этого получается заниженное значение S_0 (или D_0) в формуле типа (1) и, как следствие, завышенное значение *X*.

Примечание. Для тестов количественного определения и растворения требуется использовать только те стандарты, в сертификатах которых указано содержание основного вещества. При этом содержание основного вещества могут давать в любой из двух следующих форм. ***P* («as it is»; «as is»)** – фактическое содержание основного вещества «как есть», то есть за вычетом примесей, влаги и остаточных органических растворителей (ООР). $\boldsymbol{P_{dry}}$ – содержание основного вещества в пересчете на сухое вещество (за вычетом влаги и ООР). В связи с этим в расчетных формулах типа (1) вместо массы стандартного образца a_0 должно стоять скорректированное произведение:

$$a_0 \cdot (P/100) \text{ или } a_0 \cdot (P_{dry}/100) \cdot [(100 - W)/100], \quad (2)$$

где *W* – содержание влаги и остаточных органических растворителей в СО.

Не следует использовать так называемую «чистоту стандарта» (определяемую обычно нормализацией площадей пиков) в качестве содержания основного вещества в СО. При отсутствии первичного СО в продаже целесообразно аттестовывать фармакопейную субстанцию методом баланса масс как первичный лабораторный стандарт [10, 11].

3. *Разложение части основного вещества стандарта из-за гидролиза, окисления и т. д.* (↑) [10, 11]. Это приводит к уменьшению отклика S_0 (или D_0) в расчетной формуле типа (1) и, как следствие ведет к занижению результата анализа *X*. Ситуация характерна для веществ, которые легко подвергаются гидролизу или окислению.
4. *В испытуемой субстанции не учли содержание воды и остаточных органических растворителей W* (↓). Это ведет к занижению результата количественного определения, так как не учли множитель (100 – W)/100, на который умножается масса испытуемого образца (расположен в знаменателе формулы для количественного определения).
5. *В случае солей или комплексов может иметь место занижение результата анализа из-за того, что не учли в знаменателе пересчет массы испытуемого образца на действующее вещество; при этом в качестве стандарта взяты соль или комплекс* (↓) [3, 4]. Наиболее характерны такие случаи для антибиотиков и гормональных препаратов. Заметим, что фактическое соотношение действующего вещества и противоиона в соли (или другой молекулы в комплексе) не должно существенно отличаться от теоретического.
6. *Испытуемый образец (раствор) вязкий и при взятии его объема часть образца может оставаться внутри пипетки на стенке* (↓). Однако для определения концентрации препарата в расчетной формуле в знаменателе используют объем образца. Из-за этого могут получить заниженное значение площади пика (оптической плотности) раствора аналита. Поэтому для расчета концентрации вязкого раствора препарата целесообразно использовать в расчетной формуле не объем образца, а отношение массы испытуемого образца к его плотности.

Факторы, связанные с подготовкой проб (образцов)

7. *Неполная экстракция определяемого вещества из пробы* (↓) [4–6]. Для проверки этого предположения обычно увеличивают продолжительность встряхивания и/или обработки раствора анализи-

руемого образца ультразвуком. В некоторых случаях эффективным оказывается обработка ультразвуком, затем встряхивание или наоборот. Нередко неполная экстракция связана с влиянием оболочки. В таких случаях может помочь *предварительное снятие оболочки*.

Для желудочно-растворимых оболочек. Оболочка этих таблеток должна растворяться или набухать в небольшом количестве воды (реже в 0,01 М HCl) [12]. Поэтому можно взять несколько таблеток (обычно не менее 5) в колбу – при количественном определении, иди по одной таблетке в колбу – при тестировании однородности дозирования, добавить небольшое количество воды (или 0,01 М HCl), обработать ультразвуком (встряхивать) для полного или частичного удаления оболочки или образования в ней больших пор, затем добавить растворитель – экстрагирующий определяемое вещество (2/3 объема колбы), обработать ультразвуком (встряхивать), довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать; фильтровать.

Для кишечнорастворимых оболочек проводят снятие оболочки таким же образом, но с использованием раствора соды или щелочи с pH ≥ 7,8 [12].

8. *При растирании таблеток, покрытых оболочкой, в получающемся порошке имеются кусочки отделившейся оболочки* (↑↓). Для получения достоверных результатов при анализе таких таблеток целесообразно готовить испытуемый раствор следующим образом. Поместить в мерную колбу определенное количество таблеток (не менее 5 для теста «Количественное определение»). Затем провести экстракцию аналита растворителем при обработке ультразвуком (перемешивании). Довести объем раствора растворителем до метки и перемешать; фильтровать. Можно попробовать предварительно снять оболочку [фактор (7)].
9. *Сорбция части определяемого вещества на фильтре; нежелательная сорбция на микроколонке при твердофазной экстракции* (↓) [12]. Для проверки сорбции фильтром достаточно сравнить площади пиков определяемого вещества на хроматограммах раствора СО без фильтрации и с фильтрацией. Для проверки сорбции на микроколонке следует провести твердофазную экстракцию с модельной смесью препарата с точно известным содержанием определяемого вещества.
10. *Калибровочные коэффициенты* $a_0/S_0 = k$ *– отношение массы стандарта к площади его пика, существенно отличаются для двух навесок стандарта* (↑↓). При анализе субстанций должно выполняться условие 99,0 % ≤ k_1/k_2 ≤ 101,0 %, а при анализе препаратов 98,0 %≤ k_1/k_2 ≤ 102,0 %. Для повышения точности анализа следует подставлять в расчетную формулу $a_0/S_0 = (k_1 + k_2)/2$.
11. *Стандартный образец растворился не полностью* (↑) [10, 11]. Причинами для этого могут быть: плохая растворимость СО, недостаточная продолжительность встряхивания (или обработки ультразвуком), недостаточный объем или неудачный выбор растворителя. Необходимо контролировать на свету (или со специальной подсветкой) отсутствие частичек стандартного образца в колбе со стандартным раствором. При растворении СО перемешиванием рекомендуется затем кратковременная (секунды) обработка раствора СО ультразвуком.

Заметим, что для обеспечения полного растворения труднорастворимых СО можно использовать предварительное растворение СО в небольшом объеме – обычно не более 1 мл, подходящего органического растворителя, затем доводить объем раствора растворителем, указываемым в методике до метки [12].

12. *Стандартный образец частично разложился в растворе* (↑) *или определяемое вещество частично разложилось в растворе* (↓) из-за термической нестабильности, светочувствительности, действия тепла, сильного ультразвука и т. д. [12]. В случае методики ВЭЖХ нестабильность раствора проявляется в существенном изменении площади пика определяемого вещества на последовательных хроматограммах, снятых в течение суток.
13. *Частичная потеря определяемого вещества при растирании образца в ступке* (↓).

Причины. Потеря в порах ступки, частичная деструкция термолабильных или легко гидролизующихся веществ при растирании образцов.

14. *Испарение части растворителя при фильтрации через бумажный фильтр, ускоренном хранении флаконов с раствором и т. д.* (↑). Это приводит к увеличению концентрации аналита, и, следовательно, к завышению результатов количественного определения.
15. *Электризуемость порошка субстанции может приводить к неточному результату взвешивания* (↑↓). Для нивелирования влияния электризации следует использовать весы со снятием электростатики (обычно используют специальную рамку).
16. *Выбросы паров (пробки) при нагревании мазей в легко летучем растворителе* (например, смеси гексан-метанол) для экстракции аналита (↑↓). Для того, чтобы устранить выбросы и их влияние на результаты анализа целесообразно использовать дефлегматор, который вставляется в шлиф колбы с образцом.
17. *Сорбция определяемого (лекарственного) вещества вспомогательным веществом* (↓) [6] Проверка сорбции аналита вспомогательным веществом на фильтре может проводиться следующим образом. Готовят стандартный раствор определяемого вещества. Проводят предварительную обработку фильтра: фильтруют раствор плацебо, приготовленный так как готовится испытуемый раствор. Затем пропускают через обработанный таким образом фильтр часть приготовленного стандартного раствора, отбрасывая первую порцию фильтрата. Полученный раствор (фильтрат) и исходный

стандартный раствор хроматографируют. Затем сравнивают площади пика (оптическую плотность) определяемого вещества на хроматограммах фильтрата и исходного стандартного раствора.

18. *Часть определяемого вещества образует суспензию, выпадает в осадок или образует кристаллы* (↓) при охлаждении раствора (из-за снижения растворимости) или при хранении препарата.
19. *Капсулы. Влияние качества оболочек: частички содержимого капсул могут прилипать к желатиновой оболочке* (↓) [12]. В подобных ситуациях следует анализировать капсулы целиком.
20. *Суспензии: неправильный отбор образца* (↑↓). Необходимо энергично встряхивать флакон до получения однородной суспензии, быстро открыть его и отобрать пробу, не касаясь пипеткой дна емкости и стенок (чтобы случайно не захватить остаток вещества, если не все вещество суспендировано перешло в раствор).
21. *Суспензии: осадок на дне флакона с суспензией не растворяется взмучивается даже при энергичном встряхивании* (↓). Контролировать отсутствие осадка после встряхивания суспензии (если флакон непрозрачный, то энергично встряхивать суспензию, затем быстро слить ее и убедиться, что на дне флакона не остается прилипший ко дну осадок).
22. *При приготовлении испытуемого раствора мази может образовываться эмульсия из ее жировой основы, которая может сорбировать часть определяемого вещества* (↓). Эмульсию необходимо разрушать.

Пример. При приготовлении испытуемого раствора мази, содержащей декспантенол образуется жировая эмульсия. Если эмульсию не разрушить, то она может сорбировать часть декспантенола и агрегироваться в виде жирового слоя над поверхностью жидкости в колбе. В этом случае часть D-пантенола останется в жире, и получают заниженный результат определения D-пантенола. Для получения корректного результата жировую эмульсии разрушают. Для этого обрабатывают ультразвуком эмульсию мази в растворе натрия гидрокарбоната pH 10,0 при 60 °C. Механизм разрушения жировой эмульсии – щелочной гидролиз. Значение pH 10,0 выбрано в связи с тем, что D-пантенол (5 % раствор в воде) имеет pH от 9,0 до 10,5. Вне этих пределов вещество гидролизуется тем сильнее, чем дальше от этих пределов. Ультразвук необходим для увеличения площади поверхности эмульсии (за счет разбивания более крупных частиц эмульсии на более мелкие частицы, обладающие большей удельной поверхностью). Это увеличивает скорость гидролиза эмульсии.

23. *Объем раствора взят неточно из-за образования пены или недостаточного уравновешивания до комнатной температуры* (↑↓). Заметим, что пена обычно ведет к занижению объема жидкости и, следовательно, к повышению концентрации раствора. Образование пены свойственно испытуемым растворам со сравнительно высоким содержанием ацетонитрила, а также растворам с пенообразователем, например, с лаурилсульфатом. Проблему пенообразования можно пытаться решать путем добавления пеногасителей, например, добавлением нескольких капель метанола при доведении объема раствора до метки.
24. *Эффект замещения части растворителя вспомогательными веществами – Displacement Effect* (↑) [6]. При приливании растворителя к порошку таблеток, содержимому капсул и доведении объема раствора до метки, часть порошка не растворяется. Из-за этого реальный объем среды растворения оказывается меньше на несколько %, чем объем мерной колбы. В большинстве случаев можно пренебречь этим различием. Однако его надо учитывать для больших таблеток (поливитаминных препаратов). Например, добавлять точный объем растворителя пипеткой Мора вместо доведения объема раствора до метки.
25. *Мерные пипетки недостаточно хорошо отмыты, тогда:* (↓) – *при приготовлении испытуемых растворов*, (↑) – *при приготовлении стандартных растворов*. Это может существенно влиять на результат анализа, так как загрязнения в виде почти невидимых пленок (капель) остаются внутри пипеток малого объема и существенно уменьшают их фактический объем.
26. *Центрифугирование суспензий при большом числе оборотов в пробирках из полимерного материала* может вызывать разложение части определяемого вещества из-за трения (↓). При этом увеличивается содержание примесей. Например, при анализе таблеток доксазозина при центрифугировании в пробирках из полипропилена 10 мин при 8000 об/мин автор наблюдал разложение основного вещества на 0,14 %, а при 3000 об/мин – 0,06 % с соответствующим ростом содержания примесей.
27. *При центрифугировании сорбция аналита осадком* (↓) [6].
28. *Выпадение осадка или образование мути при охлаждении виалы автосамплера с испытуемым или стандартным раствором* (↓↑). В случае испытуемого раствора (↓), а стандартного раствора (↑).
29. *Дополнительные факторы, приводящие к заниженным результатам теста* «*Растворение*», *подробно обсуждены в статье* [12].

Факторы, связанные с растворителем образца и соотношением pH раствора образца и подвижной фазы

30. *Разные растворители при приготовлении стандартного и испытуемого раствора* (↑↓) [12]. При определении растворения флуоксетина из капсул в воде наблюдали завышенную величину растворения ≈140 %. Исследование Out-of-Specification показало, что причиной было разведение исходного раствора СО флуоксетина буфериро-

ванной подвижной фазой (МР), а не средой теста растворения – водой. Из-за этого в МР и воде оказались различные формы молекул флуоксетина с разными удельными коэффициентами поглощения $E^{1\%}_{1\text{ст.}}$.

31. *При использовании буферного раствора в качестве растворителя образцов* целесообразно предварительно проверить отсутствие мути при смешении близких объемов растворителя образца и подвижной фазы (↓). Образование мути указывает на риск получения заниженного результата анализа.
32. *Часть аналита сорбируется на входе в колонку при начальных инжекциях и затем вымывается при последующих инжекциях* (↑↓). В начале хроматографирования (↓), затем (↑)

Факторы, связанные с хроматограммами и их обработкой

33. *Неточное определение точек начала и конца пика из-за того, что пик имеет размытый передний или задний фронт (длинные хвосты у пика определяемого вещества)* (↑↓) [13]. Такая ситуация обычно встречается, если растворитель образца является более сильным элюентом, чем подвижная фаза, или подвижная фаза имеет недостаточную буферную емкость. Для минимизации влияния искажения формы пика на результат анализа целесообразно накладывать хроматограммы стандартного и испытуемого раствора; затем одинаковым образом размечать точки начала и конца пика определяемого вещества.
34. *Недостаточная продолжительность хроматограммы может приводить к наложению поздно выходящих пиков на пики определяемых веществ* (↑) [13]. В общем случае, для проверки наличия «блуждающих» пиков следует увеличить продолжительность хроматограммы в 3–4 раза по сравнению с указанной в методике.
35. *Системный пик, пик плацебо или примеси выходят под пиком аналита* (↑↓). Для проверки отсутствия такого перекрывания следует в одинаковых условиях снять и наложить хроматограммы бланк, раствора плацебо и испытуемого раствора. Для оценки возможного влияния пиков примесей на результат анализа целесообразно сравнить спектральную чистоту пика аналита на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов [14].
36. *Плохая воспроизводимость площадей (высот) пиков* (↑↓) [13].

Возможные причины. Проблемы с работой инжектора, загрязнение фрита на входе в колонку, плохая базовая линия, пузырьки воздуха, заполненная до краев виала Waters, проблемы с работой детектора (низкая энергия лампы, загрязнение ячейки детектора).

37. *Пик определяемого вещества частично перекрывается с соседним пиком* (↓) при этом имеет место заниженное значение площади пика.
38. *Протекание (утечка) только менее вязкого стандартного раствора через прокладку инжектора* (↑). Автору известен случай, когда испытуемый раствор определяемого вещества не протекал из инжектора, а менее вязкий раствор СО частично протекал из инжектора. Это приводило к завышению результатов анализа. При этом была приемлемая воспроизводимость площади пика аналита.
39. *Проблема с калибровочным графиком* (↓↑) [13]. Большой разброс точек данных относительно линии регрессии может привести к некорректному калибровочному графику. Подчеркнем, что экстраполированный калибровочный график (линия регрессии) должен проходить через нулевую точку или в непосредственной близости от нее.

Если для определения содержания аналита используется калибровочный график, то свободный член калибровочного графика должен быть статистически незначим по t-критерию Стьюдента (отсутствие систематической ошибки).

Основные технологические факторы

40. *При загрузке фармацевтической субстанции на производстве не учтено содержание в ней воды, органических растворителей* (↓).
41. *Средняя масса испытуемых таблеток (содержимого капсул) оказалась выше или вблизи допустимого предела средней массы* (↑).
42. *Средняя масса лекарственной формы находится ниже допустимого значения или в непосредственной близости от него* (↓).
43. *Неоднородность содержания определяемого вещества в лекарственной форме* (↑↓). Причиной может быть нарушение технологического режима. Например, крем получили неоднородным по содержанию лекарственного вещества и консерванта из-за недостаточной продолжительности перемешивания при добавлении плохо растворимых веществ к пропиленгликолю.
44. *При использовании установок с псевдоожиженным слоем может иметь место потеря (унос) части лекарственного вещества* (↓). В таких случаях следует оценить содержание определяемого вещества в пыли с воздушных фильтров, а также в пыли с фильтров, расположенных под кипящим слоем. Затем сопоставить удельное (на грамм) содержание определяемого вещества в пыли и в таблеточной смеси (гранулах).
45. *Недостаточная по газонепроницаемости для паров воды первичная упаковка* (↓). Гидролиз части определяемого вещества в условиях естественного или ускоренного хранения препарата.
46. *Потеря части определяемого вещества на поверхности технологического оборудования* (↓).
47. *Разложение некоторых лекарственных веществ при технологических операциях, связанных с на-*

гревом, растиранием (размолом), прямым прессованием под высоким давлением (↓↑) [3, 6]. Разложение лекарственного вещества при растирании (размоле), прямом прессовании удобно детектировать по увеличению содержания примесей. Автору известна ситуация, когда причиной Out-of-Specification оказалось отщепление HCl от молекул гидрохлорида лекарственного вещества в условиях сушки в псевдоожиженном слое (↑).

48. *Образование химического соединения (комплекса) между лекарственным (ЛВ) и вспомогательным (ВВ) веществом* (↑↓). Много примеров образования таких соединений приведено в обзорах [15, 16]. Показано, например, что кроскармелоза натрия способна связывать катионы аминогрупп при pH > 2 за счет групп —COO^-. Это приводит к занижению результатов анализов.
49. *Нарушение технологического режима по температуре, времени перемешивания, порядку загрузки компонентов лекарственной формы и т. д.* (↓).

Рассмотренные выше факторы систематизированы в таблице 1 по действию (↓), (↑↓)), (↑) – для быстрого поиска возможной причины Out-of-Specification.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные и рекомендации являются важными для целенаправленного поиска аналитических и технологических причин получения результатов Out-of-Specification.

Таблица 1. Факторы, которые могут влиять на результаты тестов «Количественное определение» и «Растворение»

Table 1. The factors that may affect the results of the Assay and Dissolution tests

№ фактора Factor No.	Факторы, которые могут вызывать занижение результатов анализа (↓) Factors that may cause an understating of the analysis results (↓)	Примечание Note
4	В испытуемой субстанции не учли содержание воды и остаточных органических растворителей In the test substance, the content of moisture and residual organic solvents was not taken into account	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
5	В случае соли или комплекса не учли в знаменателе пересчет массы испытуемого образца на действующее вещество In the case of a salt or a complex, the calculation of the mass of the test sample to the active substance was not taken into account in the denominator	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
6	Испытуемый образец (раствор) вязкий и при взятии его объема часть образца может оставаться внутри пипетки на стенке The test sample (solution) is viscous and, when taking its volume, part of the sample can remain inside the pipette on the wall	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
7	Неполная экстракция определяемого вещества из пробы Incomplete extraction of the analyte from the sample	В тексте даны рекомендации The text contains recommendations
9	Сорбция части определяемого вещества на фильтре; нежелательная сорбция на микроколонке при твердофазной экстракции Sorption of a part of the analyte on the filter; unwanted sorption on the microcolumn during solid phase extraction	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
12	Определяемое вещество частично разложилось The substance to be determined is partially decomposed	Причины приведены в тексте The reasons are given in the text
13	Частичная потеря определяемого вещества при растирании образца в ступке Partial loss of the analyte during grinding	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
17	Сорбция определяемого (лекарственного) вещества вспомогательным веществом Sorption of the determined substance (drug) by the excipient	Проверка этого приведена в тексте Verification of this is given in the text.
18	Часть определяемого вещества образует суспензию, выпадает в осадок, образует кристаллы (при охлаждении или хранении раствора препарата) Part of the analyte forms a suspension, precipitates, forms crystals (when cooling or storing a solution of the medicine)	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
19	Капсулы: частички содержимого капсул могут прилипать к желатиновой оболочке Capsules: particles of the contents of the capsules may stick to the gelatin shell	Рекомендацию см. в тексте See text for recommendation
21	Суспензии: осадок на дне флакона с суспензией не растворяется Suspensions: the sediment at the bottom of the vial with suspension does not dissolve	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
22	При приготовлении испытуемого раствора мази образуется эмульсия, которая сорбирует аналит When preparing the test solution of the ointment, an emulsion is formed, which sorbs the analyte	Разрушение эмульсии см. текст Breaking the emulsion see text
26	Центрифугирование суспензий при большом числе оборотов в пробирках из полимерного материала может вызывать разложение аналита Centrifugation of suspensions at a high number of revolutions in test tubes made of polymeric material can lead to partial decomposition of the analyte	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text

Продолжение таблицы 1

№ фактора Factor No.	Факторы, которые могут вызывать занижение результатов анализа (↓) Factors that may cause an understating of the analysis results (↓)	Примечание Note
27	При центрифугировании сорбция аналита осадком The sorption of the analyte by the precipitate during centrifugation	Уменьшение площади пика аналита The analyte peak area reduction
29	Дополнительные причины заниженных результатов теста «Растворение» приведены в [12] Additional reasons for underestimated results of the Dissolution test are given in [12]	Тест «Растворение» Dissolution test
31	При приливании растворителя образца (буферного раствора) к подвижной фазе образуется муть When the sample solvent (buffer solution) is added to the mobile phase, a haze is formed	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
37	Пик аналита частично перекрывается с соседним пиком The analyte peak partially overlaps with the neighboring peak	Заниженная площадь пика аналита Underestimated analyte peak area
40	При загрузке фармацевтической субстанции на производстве не учли содержание в ней воды When loading the drug substance in production, the water content in it was not taken into account	Технологический фактор The technological factor
42	Средняя масса лекарственной формы находится ниже допустимого предела или близко от него The average mass of the dosage form is below the allowable limit or close to the it	Технологический фактор The technological factor
44	В установке с псевдоожиженным слоем происходит потеря (унос) части лекарственного вещества In a fluidized bed unit, some quantity of the drug substance is lost (carried away)	Технологический фактор The technological factor
45	Недостаточная по газонепроницаемости для паров воды первичная упаковка Insufficient gas tightness for water vapor in the primary packaging	Технологический фактор. Гидролиз The technological factor. Hydrolysis
46	Потеря части определяемого вещества на поверхности технологического оборудования Loss of part of the analyte on the surface of the process equipment	Технологический фактор The technological factor
49	Нарушение технологического режима по температуре, времени перемешивания и т. д. Violation of the technological regime in terms of temperature, mixing time, etc.	Технологический фактор The technological factor
Факторы, которые могут вызывать занижение или завышение результатов анализа (↑↓) *Factors that may cause an understating or overstating of the analysis results (↑↓)*		
1	В расчетной формуле ошибка There is an error in the calculation formula	Способ проверки см. в тексте See text for verification method
8	При растирании таблеток, покрытых оболочкой, в получающемся порошке имеются кусочки отделившейся оболочки When grinding coated tablets, the resulting powder contains pieces of detached coating	В образцы попадают разные количества оболочки Different quantities of the shell fall into the samples
10	Калибровочные коэффициенты (отношение массы СО к площади его пика) существенно отличаются для двух навесок СО Calibration coefficients (ratio of RS mass to its peak area) are significantly different for two samples of reference standart	Рекомендация дана в тексте The recommendation is given in the text
15	Электризуемость порошка стандарта или аналита может приводить к неточному результату взвешивания The electrifiability of a standard or analyte powder can lead to inaccurate weighing results	Надо снятие электростатики You need to remove electrostatics
16	Выбросы паров (пробки) при нагревании мазей в легко летучем растворителе Vapor emissions (plug), when ointments are heated in a highly volatile solvent	Используйте дефлегматор Use dephlegmator
20	Суспензии: неправильный отбор образца Suspensions: incorrect sampling	Площадь пика (↑↓) The peak area (↑↓)
23	Объем раствора взят неточно из-за образования пены и т. д. The volume of the solution was not accurately taken due to foam formation etc.	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
25	Мерные пипетки недостаточно хорошо отмыты: (↓) – при приготовлении испытуемых растворов, (↑) – при приготовлении стандартных растворов Volumetric pipettes are not well washed after taking the test solutions: (↓) –when preparing test solutions, (↑) – when preparing standard solutions	Уменьшение фактического объема мерной пипетки Reducing the actual volume of the volumetric pipette
28	Выпадение осадка или образование мути при охлаждении виалы автосамплера с испытуемым или стандартным раствором Precipitation or turbidity during cooling of the autosampler vial with test or standard solution	Для испытуемого раствора (↓), а для раствора СО (↑) For the test solution (↓) and the RS solution (↑)

Окончание таблицы 1

№ фактора **Factor No.**	**Факторы, которые могут вызывать занижение результатов анализа (↓)** **Factors that may cause an understating of the analysis results (↓)**	**Примечание** **Note**
30	Разные растворители при приготовлении стандартного и испытуемого раствора (↑↓) Different solvents in the preparation of the standard and test solution (↑↓)	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
32	Часть аналита сорбируется на входе в колонку при начальных инжекциях и затем вымывается при последующих инжекциях Part of the analyte is adsorbed at the column inlet during initial injections and then washed out during subsequent injections	В начале хроматографирования (↓), затем (↑) At the beginning of chromatography (↓), then (↑)
33	Неточное определение точек конца и/или начала пика. Характерно для пиков плохой формы Inaccurate definition of end and/or peak start points. Characteristic of badly shaped peaks	Рекомендация дана в тексте The recommendation is given in the text
35	Системный пик, пик плацебо или примеси выходят под пиком аналита The system peak, placebo peak, or impurity peak is eluting under the analyte peak	Чаще всего (↑), редко (↓) Most often (↑), rarely (↓)
36	Плохая воспроизводимость площадей (высот) пиков Poor reproducibility of peak areas (heights)	Возможные причины даны в тексте Possible reasons are given in the text
39	Проблема с калибровочным графиком Calibration chart problem	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
43	Неоднородность содержания определяемого вещества в лекарственной форме Heterogeneity of the content of the analyte in the dosage form	Технологический фактор The technological factor
47	Разложение вещества при технологической операции с нагревом, растиранием (размолом) Decomposition of a substance during a technological operation with heating, grinding (grinding)	Например, отщепление HCl (↑) For example, the elimination of HCl (↑)
48	Образование химического соединения (комплекса) между лекарственным и вспомогательным веществом The formation of a chemical compound (complex) between the drug and the excipient	Технологический фактор The technological factor
	Факторы, которые могут вызывать завышение результатов анализа (↑) Factors that may cause an overestimation of the results of the analysis (↑)	
2	В стандартном образце не учли содержание влаги и остаточных органических растворителей In the reference standard did not take into account the moisture content and residual organic solvents	Обоснование приведено в тексте The rationale is in the text
3	Разложение части основного вещества стандарта из-за гидролиза, окисления и т. д. Decomposition of part of the basic substance of the standard due to hydrolysis, oxidation, etc.	Уменьшение площади пика СО Peak area reduction of the RS
11	Стандартный образец растворился не полностью The standard sample did not completely dissolve	Уменьшение площади пика СО Peak area reduction of the RS
12	Стандартный образец частично разложился в растворе Standard sample partially decomposed in solution	Уменьшение площади пика СО Peak area reduction of the RS
14	Испарение части растворителя при фильтрации через бумажный фильтр и т. д. Evaporation of part of the solvent (when filtered through a paper filter, insufficiently sealed containers, etc.)	Концентрация вещества ↑ The concentration of the substance ↑
24	Эффект замещения части растворителя вспомогательными веществами The effect of replacing part of the solvent with excipients	Уменьшение объема раствора Reducing the volume of the solution
34	Недостаточная длительность хроматограммы – наложение поздно выходящих пиков на пик аналита Insufficient duration of the chromatogram – overlapping of late eluting peaks with the analyte peak	Увеличить продолжительность хроматограммы Increase the duration of the chromatogram
38	Протекание (утечка) только менее вязкого стандартного раствора через прокладку инжектора Leakage (leakage) of only the less viscous standard solution through the injector gasket	Пояснение дано в тексте The explanation is given in the text
41	Средняя масса таблеток (содержимого капсул) оказалась выше или вблизи допустимого предела The average weight of the tablets (capsule contents) was above or near the allowable limit	Технологический фактор The technological factor

ЛИТЕРАТУРА

1. Guidance for Industry. Investigating Out-of-Specification (OOS). Test Results for Pharmaceutical Production. Revision 1. Rockville: FDA; 2022.
2. Kelly B. Anderson. Out-of-Specification (OOS) Investigations. Avoiding Complete Failure by Looking at All Pieces of the Puzzle. New York: John Wiley and Sons Ltd.; 2018.
3. Thomas S., Huynh-BaKim K. Highlights of Investigating Out-of-Specifications Test Results. *Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets*. 2010;229–237. DOI: 10.1007/978-1-4419-0889-6_28
4. Kuselman I., Pennecchi F., Burns C., Fajgelj A., de Zorzi P. IUPAC/CITAC Guide: Investigating out-of-specification test results of chemical composition based on metrological concepts (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2012;84(9):1939–1971. DOI: 10.1351/PAC-REP-11-10-04.
5. Kumar K. A., Gupta N. V. Handling of Out of Specification Results. Intern. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2015;6(2);38–44.
6. Hemanth K. S., Paneesh C. Handling Out-of-Specification during laboratory incidence. *J. Global Trends Pharm. Sci*. 2019;10(3):6591–6597.
7. McDowall R. D. Are You Invalidating Out-of-Specification (OOS) Results into Compliance? *LCGC North America*. 2020;37(7):411–419.
8. Mote N. N. Reference for Investigation of Out of Specification Results in Pharmaceutical Industry. *Austin Pharmacology & Pharmaceutics*. 2021;6(1):01–07.
9. Köppel H., Schneider B., Wätzig H. Out-of-specification test results from the statistical point of view. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;44(3):718–729. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.02.035
10. Эпштейн Н. А. Аттестация фармацевтических субстанций как лабораторных первичных стандартов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал.* 2021;55(6):47–52. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-6-47-52.
11. Epshtein N. A. Certification of pharmaceutical substances as in-house primary standards (Review). *Pharm. Chem. J.* 2021;55(6):616–620. DOI: 10.1007/s11094-021-02466-1.
12. Эпштейн Н. А. Тест «растворение»: причины получения заниженных результатов и их устранение (Обзор). *Химико-фармацевтический журнал.* 2021;55(8):55–59. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-55-59.
13. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. Introduction to modern liquid chromatography. 3d ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.; 2010.
14. Эпштейн Н. А. Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов (Обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–136. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
15. Bharate S. S., Bharate S. B., Bajajc A. N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *J. Excipients and Food Chem*. 2010;1(3):3–26.
16. Hotha K. K., Roychowdhury S., Subramanian V. Drug-Excipient Interactions: Case Studies and Overview of Drug Degradation Pathways. *Amer. J. Anal. Chem*. 2016;7(01):107–140. DOI: 10.4236/ajac.2016.71011.

REFERENCES

1. Guidance for Industry. Investigating Out-of-Specification (OOS). Test Results for Pharmaceutical Production. Revision 1. Rockville: FDA; 2022.
2. Kelly B. Anderson. Out-of-Specification (OOS) Investigations. Avoiding Complete Failure by Looking at All Pieces of the Puzzle. New York: John Wiley and Sons Ltd.; 2018.
3. Thomas S., Huynh-BaKim K. Highlights of Investigating Out-of-Specifications Test Results. *Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets*. 2010;229–237. DOI: 10.1007/978-1-4419-0889-6_28
4. Kuselman I., Pennecchi F., Burns C., Fajgelj A., de Zorzi P. IUPAC/CITAC Guide: Investigating out-of-specification test results of chemical composition based on metrological concepts (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2012;84(9):1939–1971. DOI: 10.1351/PAC-REP-11-10-04.
5. Kumar K. A., Gupta N. V. Handling of Out of Specification Results. Intern. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2015;6(2);38–44.
6. Hemanth K. S., Paneesh C. Handling Out-of-Specification during laboratory incidence. *J. Global Trends Pharm. Sci*. 2019;10(3):6591–6597.
7. McDowall R. D. Are You Invalidating Out-of-Specification (OOS) Results into Compliance? *LCGC North America*. 2020;37(7):411–419.
8. Mote N. N. Reference for Investigation of Out of Specification Results in Pharmaceutical Industry. *Austin Pharmacology & Pharmaceutics*. 2021;6(1):01–07.
9. Köppel H., Schneider B., Wätzig H. Out-of-specification test results from the statistical point of view. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;44(3):718–729. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.02.035.
10. Epshtein N. A. Certification of Pharmaceutical Substances as In-House Primary Standards (Review). *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 2021;55(6):47–52. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-6-47-52.
11. Epshtein N. A. Certification of pharmaceutical substances as in-house primary standards (Review). *Pharm. Chem. J.* 2021;55(6):616–620. DOI: 10.1007/s11094-021-02466-1.
12. Epshtein N. A. Dissolution Test: Causes of Understated Results and Elimination of These (Overview). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(8):55–59. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-55-59.
13. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. Introduction to modern liquid chromatography. 3d ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.; 2010.
14. Epshtein N. A. Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors (Review). *Drug development & registration*. 2020;9(3):129–136. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
15. Bharate S. S., Bharate S. B., Bajajc A. N. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *J. Excipients and Food Chem*. 2010;1(3):3–26.
16. Hotha K. K., Roychowdhury S., Subramanian V. Drug-Excipient Interactions: Case Studies and Overview of Drug Degradation Pathways. *Amer. J. Anal. Chem*. 2016;7(01):107–140. DOI: 10.4236/ajac.2016.71011.

25 YEARS pharmtech & ingredients



25-я Юбилейная Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства

Забронируйте стенд

21–24 ноября 2023

Москва, Крокус Экспо

pharmtech-expo.ru

+7 (495) 799-55-85
pharmtech@ite.group

ITE ОРГАНИЗАТОР ORGANISER

0+

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 этичного 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:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармаколо- гия (медицинские науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. 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 А4 Microsof 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 Х1, Х2 и Х3 придумали и разработали эксперимент, авторы Х4 и Х5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. Х3 и Х4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы Х1 и Х6 участвовали в обработке данных. Автор Х7 проводил теоретические расчеты. Авторы Х1, Х2 и Х7 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: Синдранол 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-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацеутикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-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, написании рукописи и т. д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). 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 psychophar-macogenetics]. 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):111–117DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: http://www. nlm.nih.gov/citingmedicine.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B . Obesity among individuals with serious mental illness. Acta Psychiatr Scand. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/

Варианты библиографического описания патентов: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте http://search.crossref.org/ или https://www. citethisforme.citethisforme.com.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные 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:

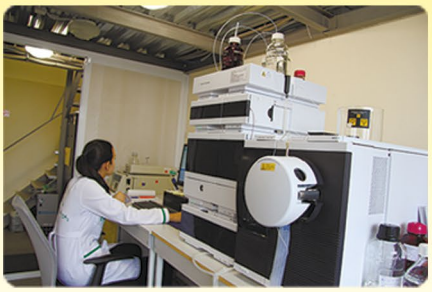
- *Публикации в печатном и электронном журнале*
  - Научные статьи
  - Рекламные статьи
  - Рекламные модули
- *Баннерная реклама на сайте*
  Размещение рекламных баннеров на сайте pharmjournal.ru
- *Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала*
- *e-mail-маркетинг (в базе 12000 + адресов)*
- *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

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ®

Журнал является Open Access изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

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.

Основные пять тематических разделов журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», соответствует отраслям науки:

- ✓ 3.2.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).
- ✓ 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки).
- ✓ 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНИТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- ➢ Услуга комплексного перевода.
- ➢ Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- ➢ При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.

Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.





Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: **info@cpha.ru**

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ®



Печатный журнал

Информационный ресурс

Фармацевтический журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Это интернет-ресурс и печатный научный журнал международного уровня для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств.

Наша аудитория:

Среди наших читателей специалисты и руководители отделов разработки ЛС, контроля и обеспечения качества, специалисты по ДКИ, КИ, отделов регистрации, сотрудники аналитических лабораторий, технологи, инженеры, а также топ-менеджмент фармацевтических компаний.

Разделы журнала:

- ✓ Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- ✓ Фармацевтическая технология.
- ✓ Методы анализа лекарственных средств.
- ✓ Доклинические и клинические исследования.
- ✓ Регуляторные вопросы.

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНИТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Периодичность выхода номеров журнала 4 раза в год

Мы в Telegram

По вопросам сотрудничества
info@pharmjournal.ru