WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

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

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Лабконцепт

SILAB
Simply Intelligent

LICART
art of chromatography

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНЫХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИЙ ОКК И R&D,
реализованных в среде единственного отечественного клиент-серверного ПО Space CDS.

+7 (812) 327-37-00
Санкт-Петербург

lc@labconcept.ru

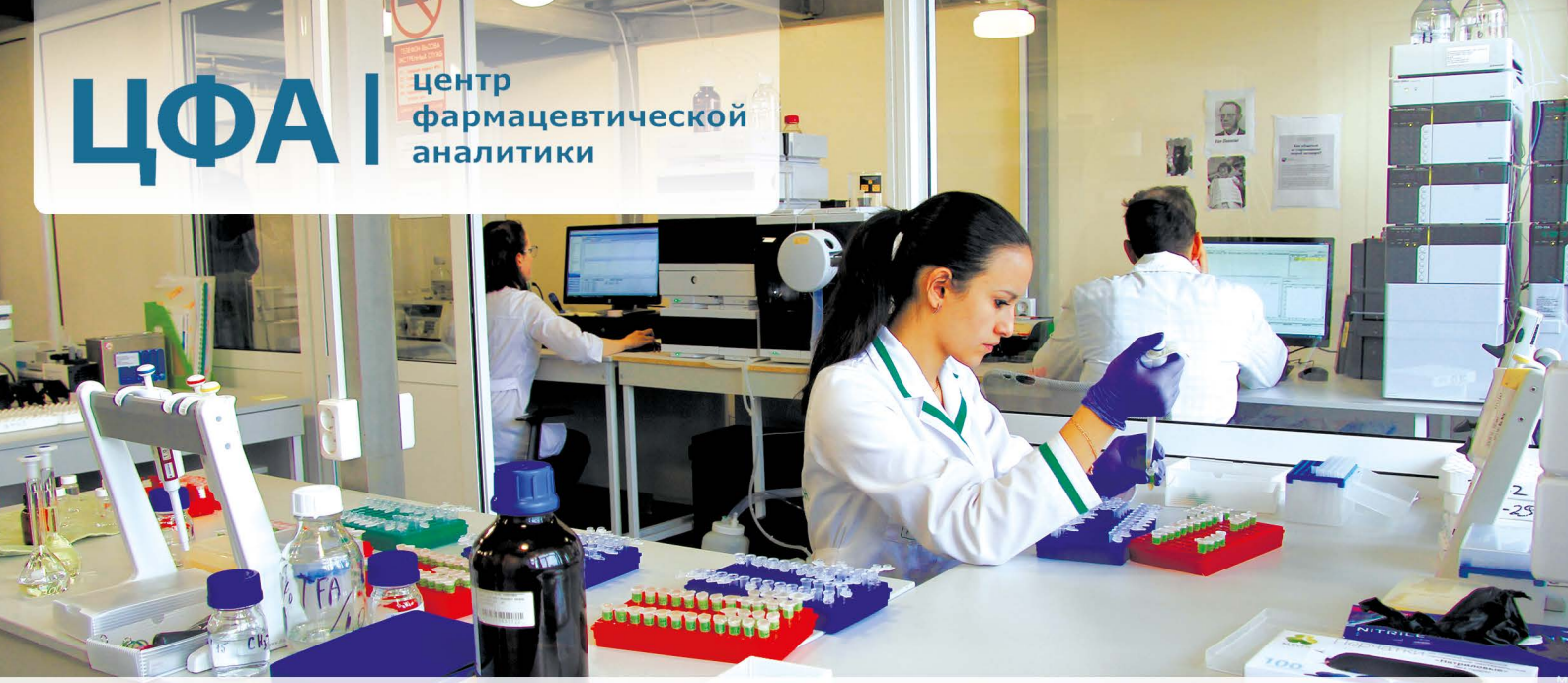
labconcept.ru

2023. Том 12, № 2 2023. Volume 12, No. 2

18+

Summum bonum medicinae sanitas

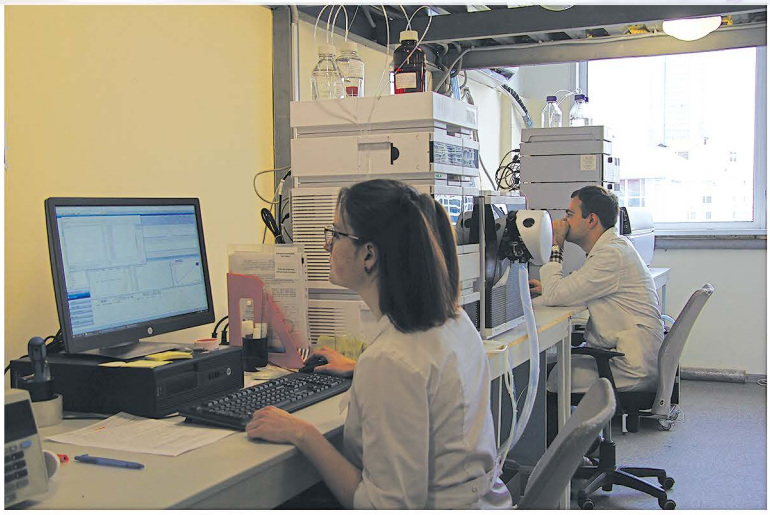
ЦФА | центр фармацевтической аналитики



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, № 2

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2023. Volume 12, No. 2

Цели и задачи журнала

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

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

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

Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества.

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

В **пятом разделе** рассматриваются вопросы валидации методик, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в 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

Мероприятия 19

Поиск и разработка новых лекарственных средств

Биоактивные производные ксантоновых С-гликозидов – QSAR-подход
В. Н. Аксенова, М. А. Морозова, А. В. Сыроешкин 21

Применение наночастиц селена в онкологии (обзор)
Е. А. Духновский 34

Обзор производных пиперидина и морфолина как перспективные источники биологически активных соединений (обзор)
А. Е. Хамитова, Д. А. Берилло 44

Фармацевтическая технология

Влияние вспомогательных веществ и усилия прессования на содержание примеси N-(4-аминобензоил)-L-глутаминовой кислоты в препарате фолиевой кислоты в процессе хранения
Н. А. Образцова, А. А. Самсонов, М. А. Ковтуненко, В. Н. Шмелева, Н. А. Голубева 55

Методы анализа лекарственных средств

Разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения
А. М. Полуянов, А. Кочуг, Л. С. Митрофанова, И. Д. Никитин, О. Ю. Вергасов, И. Е. Шохин, Е. Н. Фишер 62

Фитохимический анализ надземной части щавеля приморского (*Rumex maritimus* L.)
В. В. Подгурская, Е. А. Лукша, И. А. Савченко, И. Н. Корнеева, Е. В. Иванова 73

Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев
Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева 79

Методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP на клетках линии Caco-2
Ю. С. Транова, А. А. Слепнев, И. В. Черных, А. В. Щулькин, П. Ю. Мыльников, Н. М. Попова, М. И. Поветко, Е. Н. Якушева 87

Разработка и валидация методики количественного определения эторикоксиба в жидкой лекарственной форме
А. Х. Амандусова, А. Е. Коваленко, А. В. Морозов, К. Р. Савельева, Т. Л. Баталова, О. А. Остапюк, Л. В. Персанова, Т. Ю. Андреевичева, А. Г. Бениашвили, В. Н. Шестаков, С. В. Поляков 95

Сравнительный анализ качественного состава эфирного масла травы полыни горькой синантропной флоры Воронежской области
Н. А. Дьякова, И. М. Коренская, А. И. Сливкин 104

Содержание минорных элементов в грудном сборе № 4
И. В. Гравель, Д. В. Лёвушкин 113

Физико-химическая и функциональная характеризация лекарственного препарата Ринсулин® Р
А. В. Бабина, Р. В. Драй, В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, П. Г. Заикин, В. И. Шмурак, Т. Э. Елтышева, И. Е. Макаренко 124

Доклинические и клинические исследования

Совместное определение нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС
Т. Н. Комаров, З, П. К. Карнакова, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, Н. С. Багаева, И. Е. Шохин, К. Я. Заславская, П. А. Белый 135

**Изучение фармакокинетики препарата для инфузионного введения Арепливир®
(МНН: фавипиравир) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы
I клинического исследования**
Т. Н. Комаров, Н. С. Багаева, К. К. Карнакова, И. Е. Шохин, К. Я. Заславская, П. А. Белый 146

Взаимосвязь фармацевтической разработки и доклинических исследований (обзор)
И. Н. Ампилогова, М. В. Карлина, В. Г. Макаров, М. Н. Макарова 155

**Гипертоническая активность растворов для инъекций может являться причиной
постинъекционных осложнений (обзор)**
А. Л. Ураков, Н. А. Уракова, З. В. Шубина, Л. В. Ловцова, А. В. Самородов, К. Г. Гуревич, А. П. Столяренко,
В. И. Корунас, Д. О. Липатов, Д. Д. Муминов 164

**Влияние агониста фарнезоидного Х-рецептора на постпрандиальную липемию у крыс,
получающих рацион, содержащий супрафизиологическую дозу жиров**
Ю. Н. Алехин, О. С. Попова, В. С. Понамарёв, П. А. Паршин 174

**Изучение радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития при нейтронном
и фотонном облучении опухолевых клеток**
М. С. Третьякова, А. Г. Дрозд, М. В. Белоусов, К. С. Бразовский, М. С. Ларькина, С. В. Кривощеков,
А. А. Артамонов, И. А. Милойчикова, А. В. Безмага, А. М. Большаков, Е. С. Сухих, Е. В. Плотников 185

**Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу
в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа**
М. А. Колганова, О. С. Сагимбаева, Ю. С. Борисова, Е. Е. Бекетов, И. Е. Шохин 190

Регуляторные вопросы

**Регулирование вывода орфанных лекарственных препаратов
на рынок Евразийского экономического союза как механизм повышения доступности лечения
редких заболеваний (обзор)**
А. В. Фотеева, Н. А. Конева, О. С. Белоглазова, Н. Б. Ростова 198

Дискуссии

Молекулярный докинг: методологические подходы к оценке рисков
А. Х. Тальдаев, И. Д. Никитин, Р. П. Терехов, И. А. Селиванова 206

Материалы конференций 212

Исправления 222

CONTENTS

Introduction 10

Events 19

Research and development of new drug products

Bioactive Xanthone C-glycoside Derivatives – QSAR Approach
Valeriya N. Aksenova, Mariya A. Morozova, Anton V. Syroeshkin 21

Application of Selenium Nanoparticles in Oncology (Review)
Evgeny A. Dukhnovsky 34

Overview of Piperidine and Morpholine Derivatives as Promising Sources of Biologically Active Compounds (Review)
Akzhonas E. Khamitova, Dmitry A. Berillo 44

Pharmaceutical Technology

Influence of Excipients and Pressing Force on the Impurity Content of N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamic Acid in Folic Acid Drugs During Storage
Nadezhda A. Obraztsova, Aleksey A. Samsonov, Maksim A. Kovtunenko, Varvara N. Shmeleva, Natalia A. Golubeva 55

Analytical Methods

Development, Validation and Approbation Analytical Method for the Quantitative Determination of Taurine by HPLC-UV Method in the Test of Comparative Dissolution Kinetics
Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug, Lidia S. Mitrofanova, Ilya D. Nikitin, Oleg Yu. Vergasov, Igor E. Shohin, Elizaveta N. Fisher 62

Phytochemical Analysis of the Aerial Part of Golden Dock (*Rumex Maritimus* L.)
Vera V. Podgurskaya, Elena A. Luksha, Irina A. Savchenko, Irina N. Korneeva, Evgenia V. Ivanova 73

Application of Scanning Electron Microscopy to Study Morphological and Anatomical Features of Sea Buckthorn Leaves
Natalia A. Kovaleva, Olga V. Trineeva 79

Method for Testing of Drugs Belonging to Substrates and Inhibitors of the Transporter Protein BCRP on Caco-2 Cells
Yulya S. Tranova, Alexander A. Slepnev, Ivan V. Chernykh, Aleksey V. Shchulkin, Pavel Yu. Mylnikov, Nataliya M. Popova, Mariya I. Povetko, Elena N. Yakusheva 87

Development and Validation of a Method for the Quantitative Determination of Etoricoxib in Liquid Dosage Form
Akzhvek Kh. Amandusova, Aleksei E. Kovalenko, Andrei V. Morozov, Kristina R. Savelyeva, Tatyana L. Batalova, Oxana A. Ostapyuk, Luydmila V. Persanova, Tatyana Yu. Andreevicheva, Allan G. Beniashvili, Vladislav N. Shestakov, Sergei V. Polyakov 95

Comparative Analysis of Quality of Essential Oil of Wormwood Herb Synanthropic Flora of Voronezh Region
Nina A. Dyakova, Irina M. Korenskaya, Alexey I. Slivkin 104

The Content of Minor Elements in the Breast Collection No. 4
Irina V. Gravel, Dmitry V. Levushkin 113

Physicochemical and Functional Characterization of Medicinal Product Rinsulin® R
Anna V. Babina, Roman V. Drai, Valerya B. Saparova, Alina N. Afanasyeva, Pavel G. Zaikin, Vladimir I. Shmurak, Tatyana E. Eltysheva, Igor E. Makarenko 124

Preclinical and clinical study

Simultaneous Determination of Nirmatrelvir and Ritonavir 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 135

Phase I Pharmacokinetics Study of Drug for Infusion «Areplivir» (INN: Favipiravir) (LLC "PROMOMED RUS", Russia)
Timofey N. Komarov, Natalia S. Bagaeva, Kseniia K. Karnakova, Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely 146

The Interconnection Between Pharmaceutical Development and Preclinical Research (Review)
Irina N. Ampilogova, Marina V. Karlina, Valery G. Makarov, Marina N. Makarova 155

Hypertonic Activity of Injection Solutions Can Cause Post-injection Complications (Review)
Aleksandr L. Urakov, Natalya A. Urakova, Zinaida V. Shubina, Lubov V. Lovtsova, Aleksandr V. Samorodov, Konstantin G. Gurevich, Anastasia P. Stolyarenko, Vladislav I. Korunas, Danila O. Lipatov, Dior D. Muminov 164

Effect of a Farnesoid X-receptor Agonist on Postprandial Lipemia in Rats Fed a Supraphysiological Fat Dozes
Yury N. Alekhin, Olga S. Popova, Vladimir S. Ponamarev, Pavel A. Parshin 174

Study of the Radiosensitizing Action of Lithium Ascorbate Under Neutron and Photon Irradiation of Tumor Cells
Maria S. Tretyakova, Anastasia G. Drozd, Mikhail Belousov, Konstantin V. Brazovskiy, Maria S. Larkina, Sergei V. Krivoshchekov, Anton A. Artamonov, Irina A. Miloichikova, Artur V. Bezmaga, Alexey M. Bolshakov, Evgenia S. Sukhikh, Evgenii V. Plotnikov 185

Development and Validation of the ELISA Method for Neutralizing Anti-trastuzumab Antibodies Detection in Human Blood Serum
Maria A. Kolganova, Olesya S. Sagimbaeva, Julia S. Borisova, Evgeny E. Beketov, Igor E. Shokhin 190

Regulatory Issues

Regulation of the Launch of Orphan Drugs on the Market of the Eurasian Economic Union as a Mechanism to Increase the Availability of Treatment for Rare Diseases (Review)
Alexandra V. Foteeva, Nataliia A. Koneva, Olga S. Beloglazova, Natalya B. Rostova 198

Discussions

Molecular Docking: Methodological Approaches of Risk Assessment
Amir Kh. Taldaev, Ilya D. Nikitin, Roman P. Terekhov, Irina A. Selivanova 206

Conference Proceedings 212

Erratums 222

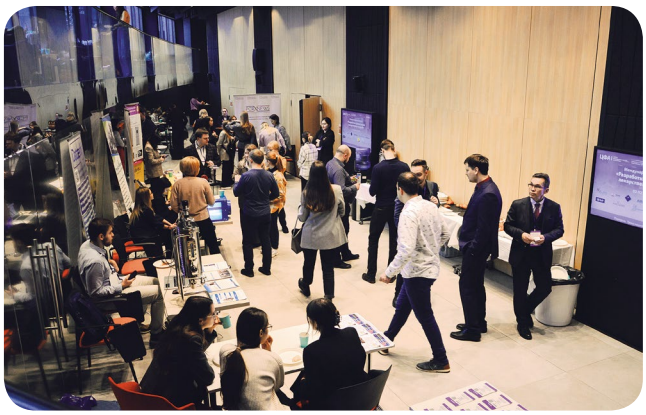
Редакционная статья / Editorial article

Конгресс "Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС"

Конгресс "Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС" пройдет в Москве 22 сентября. Мероприятие посвящено обсуждению таких важных тем, как предрегистрационные исследования лекарственных средств, которые предназначены для обеспечения их качества, эффективности и безопасности. Также мы обсудим вопросы трансфера технологий и пострегистрационных исследований лекарственных препаратов.

Congress "Chemical and Biological Drugs: Pharmaceutical and Clinical Development in Accordance with the EAEU rules"

The Congress "Chemical and Biological Drugs: Pharmaceutical and Clinical Development in Accordance with the EAEU rules" will be held in Moscow on September 22. We will discuss such themes as pre-registration trials which are necessary for quality, effectiveness and safety assurance. As well as we will discuss technology transfer and post-authorisation studies of drugs.



Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас на уже ставшее традиционным мероприятие, посвященное обсуждению вопросов, связанных с разработкой, исследованиями и регистрацией лекарственных средств.

Конгресс проводится ежегодно, начиная с 2012 года, и за годы своего существования превратился из небольшой местечковой конференции в уважаемое и ожидаемое отраслевое мероприятие. Тематика мероприятий традиционно охватывает все жизненные этапы лекарственного средства, начиная от разработки и заканчивая пострегистрационными исследованиями ЛС.

В этом сезоне мы поговорим о фармацевтической и клинической разработке химико-фармацевтических и биологических препаратов согласно правилам ЕАЭС.

Конгресс **«Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС»** организован журналом «Разработка и регистрация лекарственных средств» и ООО «Центр фармацевтической аналитики».

Конгресс пройдет в очном формате в Москве в Конгресс-центре Сеченовского Университета.

Мероприятие посвящено обсуждению таких важных тем, как предрегистрационные исследования лекарственных средств, которые предназначены для обеспечения их качества, эффективности и безопасности. Будут представлены доклады, рассматривающие вопросы разработки и исследований биопрепаратов: от оценки биоаналогичности в условиях *in vitro* до клинических исследований. Также мы обсудим вопросы трансфера технологий и пострегистрационных исследований лекарственных препаратов.

Программа конгресса состоит из нескольких секций, включающих фармацевтическую разработку оригинальных и воспроизведенных ЛС, доклинические и клинические исследования, проводимые в соответствии с требованиями Решений ЕЭК.

Слушатели конгресса: фармацевтические предприятия-производители и их сотрудники из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудники лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений.

Докладчики конгресса: ведущие ученые, специалисты и лидеры мнений, представляющие фармацевтическую отрасль, академическую общественность и регуляторные органы в сфере обращения лекарственных средств.

Дата: 22 сентября 2023 г.

Место: Конгресс-центр Сеченовского Университета, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8 (м. Фрунзенская).

Подробности и регистрация на сайте конгресса https://www.rrls-congress.ru/

ЦФА | центр фармацевтической аналитики

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Конгресс

«Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС»

22 сентября 2023

г. Москва, Конгресс-центр Сеченовского Университета

УДК 615.11

Редакционная статья / Editorial article

Роль указов Петра I в формировании и развитии российской фармации. Часть 1

К. С. Гузев✉

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

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

Резюме

В первой части статьи на основе системного анализа указов Петра I приведены шаги Российского Императора по учреждению и становлению аптечной службы России. Анализ текста указов показал, что особый интерес Петра I к распределению лекарств появился в конце XVII – начале XVIII века, после первого посещения Европы. Первым его шагом, направленным на контроль распределения лекарств, стал Указ таможенной службе о необходимости досмотра и присылке в Москву аптекарских припасов, привозимых из-за границы. Получив контроль над привозом медикаментов и монопольным их распределением, Петр I организует доставку лекарств из царской аптеки в армию. Следующим шагом царя стала организация сети московских аптек. Для этого он издает Указ об организации на Москве восьми аптек. Позже такие аптеки были организованы в Петербурге и других крупных городах России. Владельцам этих аптек Петр I выдает именные грамоты, призванные охранять их от чрезмерных поборов и несправедливости городских властей. Для снабжения появившихся аптек необходимо было наладить их снабжение соответствующим сырьем. Для этого Петр I своими указами распорядился закупать лекарственные травы, собранные в Сибири, организовать в Москве, Петербурге и Астрахани аптечные огороды и ограничить торговлю некоторыми важными товарами. Кроме того, по Указу Петра I отправляются научные экспедиции по России на поиск российской минеральной воды и изучению богатств Сибири.

The Role of the Decrees of Peter the Great in the Formation and Development of Russian Pharmacy. Part 1

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

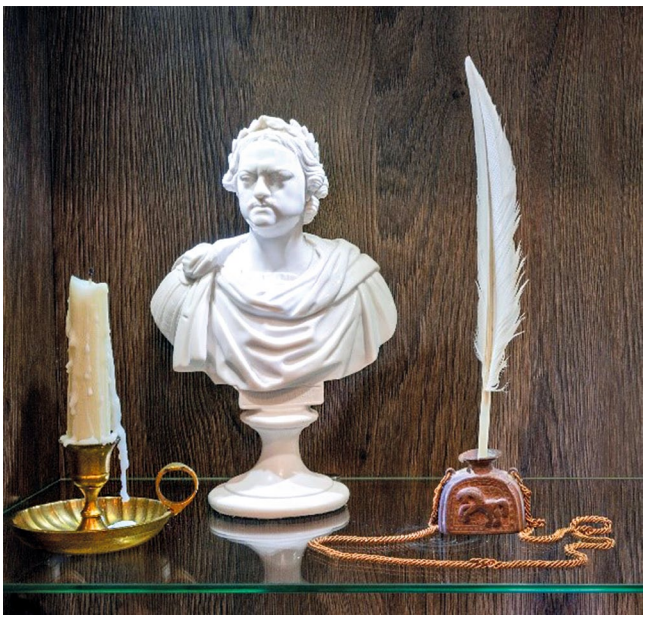
Abstract

The first part of the article, based on a systematic analysis of the decrees of Peter the Great, presents the steps of the Russian Emperor to establish and develop the pharmacy service in Russia are given. An analysis of the text of the decrees shows that Peter the Great's special interest in the distribution of medicines appeared from the end of the 17th to the beginning of the 18th century, after his first visit to Europe. His first step, aimed at controlling the distribution of medicines, was the Decree to the customs service on the need to inspect and send to Moscow pharmaceutical supplies brought from abroad. Having gained control over the import of medicines and their monopoly distribution, Peter the Great organized the delivery of medicines from the royal pharmacy to the army. The Emperor's next step was the foundation of a network of Moscow pharmacies. To do this, he issued a Decree on the establishment of eight pharmacies in Moscow. Later, such pharmacies were also established in St. Petersburg and other major Russian cities. Peter the Great gave the owners of these pharmacies nominal letters designed to protect them from excessive extortion and injustice of the city authorities. It was necessary to establish the supply of the new pharmacies with the appropriate raw materials. Peter the Great, by his decrees, ordered to purchase medicinal herbs collected in Siberia, to create pharmacy gardens in Moscow, St. Petersburg and Astrakhan, and to restrict trade in certain important goods. In addition, according to the decree of Peter the Great, scientific expeditions are sent around Russia to search for mineral water and explore the riches of Siberia.

«История России в XVIII в.
не швейцарский пейзаж.
Скорее это пейзаж
из истории мироздания»

К. А. Валишевский

В 2022 г. исполнилось 350 лет со дня рождения Петра Алексеевича Романова – Великого князя, государя, русского царя и Императора Всероссийского. С его именем связано большое число нововведений, в корне изменивших Россию. К наиболее важным изменениям, касающимся организации внутреннего устройства страны, можно отнести образование губерний (1708 г.), ее деление на 50 провинций, состоящих из дистриктов, а в дальнейшем (1728 г.) – на уезды. В 1711 г. учреждается Сенат, в 1718 г. – Коллегии, в 1721 г. – священный Синод. Благодаря этим нововведениям был перестроен по-новому весь аппарат государственной власти России. В 1719 г. впервые вводится присяга на верность Государственной службе, а в 1721 г. – присяги на каждый чин. Впервые организована перепись городского населения России (1721 г.). Не менее важные изменения начали происходить в армии и на флоте. После Азовских походов 1695–1696 гг. началось быстрое создание регу-



лярной армии. Вместо стрельцов и поместной конницы создаются солдатские полки. К 1695 г. регулярная армия России насчитывала более полумиллиона человек. Она состояла из 76 полевых полков и 55 батальонов, 52 конных полков, 104 пограничных и внутренних гарнизонных батальонов и 39 губернских команд. Параллельно с этим идет строительство российского флота. Было создано 7 судостроительных верфей, на которых в короткий срок было построено 395 больших и малых судов. В 1705 г. построено основное здание Адмиралтейства. Для нужд армии и флота в 1701 г. была открыта школа математических и навигационных наук, готовившая инженеров, моряков, геодезистов, архитекторов, мастеровых и учителей. В 1701 г. в Москве и Петербурге открываются артиллерийские школы, утверждаются Воинский и Морской Уставы (1716 и 1725 гг. соответственно). В 1713 г. в Москве начинает работать инженерная школа, а в 1715 г. в Петербурге – морская Академия. Расширяется практика отправки молодых дворян и купеческой молодежи за границу на обучение морскому, пехотному, артиллерийскому, инженерному делу[1].

О роли Петра I в развитии отечественной медицины написано довольно много. Причем его заслуги широко представлены в классических учебниках по истории российской медицины (Л. Ф. Змеев, С. Ковнер, М. Ю. Лахтин, Н. П. Загоскин), а также учебниках по этому предмету советского периода (Т. Мейер-Штейнег и К. Зудгоф, Б. Д. Петров, М. П. Мультановский, М. Б. Мирский). Наиболее полное перечисление заслуг Петра I в развитии военной медицины представлено в работе Н. Куприянова «История медицины России в царствование Петра Великого»[2]. Однако о вкладе Петра Великого в развитие отечественной фармации известно не много, и факты об этом разбросаны по редким источникам. Из одной монографии в другую переходит рассказ об Указе от 14 февраля 1700 г. «О наказании незнающих медицинских наук и по невежеству в употреблении медикаментов, причиняющих смерть больным» и Указе от 22 ноября 1701 г. «О заведении в Москве вновь осьми аптек... и об уничтожении зелейных лавок». Часто упоминают о двух привилегиях на открытие аптеки в Москве полученных Иоганом Готфридом Грегориусом (22 ноября 1701 г.) и Даниилом Алексеевичем Гурчиным (28 декабря 1701 г.). На этом вклад Петра I в становление отечественной фармации, как правило, заканчивался.

Из современных авторов, занимавшихся изучением становления отечественной фармации, можно отметить работу Виктора Матвеевича Сало (1928–2005). В его монографии «История фармации в России», изданной в 2007 г., формированию фармацевтической службы России Петровского периода уделено довольно много места. Однако, с нашей точки зрения, автор прекрасно систематизировав имеющийся в его распоряжении архивный материал, не смог показать системного подхода в деятельности Петра I и поступательного хода его нововведений[3].

Поэтому целью настоящего исследования явилась попытка объединить информацию об указах Петра I, касающихся фармации, включая не только организацию вольных аптек и медицинского снабжения армии и флота, но и соответствующего образования, промышленности, науки и практики, уделив особое внимание системности предпринимаемых им шагов.

При написании работы основными источниками информации служили указы, Петра I, представленные в многотомном издании «Полное собрание законов Российской Империи» (ПСЗРИ) в период с 1688 (Т. II) по 1725 г. (Т. VII), труды кафедры истории и энциклопедии медицины императорского Московского университета, материалы классических учебников по истории медицины и фармации, а также отдельные монографии, посвященные развитию этих специальностей.

Для установления роли Петра I в становлении и развитии отечественной фармации были отобраны соответствующие указы, именные грамоты, регламенты, резолюции и проведен их системный анализ. Полученный результат представлен в виде последовательных шагов Петра I по организации работы аптечной службы в начале XVIII в.

Шаг первый – таможенная политика Российского государства по отношению к лекарствам.

Петр I и его окружение понимали, поскольку какого-либо производства лекарств в России не было, то их можно было только завозить из-за границы. Что практиковалось с давних времен. Об этом свидетельствует утверждение В. Рихтера, приведенное в его классической монографии «История медицины в

[1] Палкин *Б. Н. Русские госпитальные школы* XVIII века. М.: Медгиз; 1959. 271 с.

[2] Куприянов Н. История медицины России в царствование Петра Великого. Санкт-Петербург. 1872. 16 с.

[3] Сало В. М. История фармации в России. М.: Литтерра; 2007. 256 с.

России»: «*Для совершенного устройства и снабжения аптек, часто посылаемы были люди в иные земли – врачи или особые поверенные, дабы вывозить оттуда потребные для них материалы*»[1]. Для упорядочивания этого процесса надо было взять под контроль привоз медикаментов из-за рубежа. Для этого Петр I издает Указ «Об осмотре на заставах по городам всяких товаров, питей и аптекарских припасов, посылаемых в Москву, *о* за́писе их в таможенные книги и об отпуске за таможенною печатью»[2]. Согласно этому указу Великие Государи указали, чтобы все товары, привозимые из-за границы иноземными и русскими торговыми людьми, досматривались специальными людьми из Таможни (целовальниками и подьячими), записывались в книги, опечатывались таможенной печатью и направлялись в Москву в приказ Большой Казны. После досмотра товары рассылались по приказам, для которых они куплены и привезены. В частности, лекарства должны были направляться в Аптечный приказ. Отпуск опечатанных товаров их владельцам проводился только после их досмотра Великими Государями. То есть все лекарства, пряные зелья и вина, привозимые в Россию, ставились на учет, передавались в Аптекарский приказ и, как правило, в дальнейшем выкупались у владельцев служащими приказа по договорной цене с обязательной уплатой пошлины. Таким образом, московская таможенная служба стала контролировать поступление лекарств в Россию – их брали на учет, за них получали пошлинный сбор и передавали в Аптекарский приказ для дальнейшего использования.

Шаг второй – начало централизованного снабжения армии лекарствами.

В 1698 г. выходит Указ «Об отпуске лекарств в Рязанский полк из Новой Аптеки»[3]. Он гласил: «*Быть на службе в Рязанском полку у боярина и воеводы Алексея Петровича Салтыкова лекарям иноземцам ... Готфриду Бергарду да Андрею фон-Крагену; а сколько в тот полк каких лекарств надобно, тому роспись будет, а по той росписи в тот полк на вышепоказанную службу, по росписи вышеозначенных лекарей, отпущено лекарств из новой Аптеки по цене на 100 рублев*». Из Указа становится понятно, что в Рязанский полк направляются два лекаря с лекарствами, полученными по росписи (перечню), составленной ими же. Причем лекарства получаются централизовано из Новой царской аптеки, организованной специально для снабжения лекарствами армии. Таким образом, указ о посылке в Рязанский полк двух докторов с лекарствами может быть расценен как начало организации централизованного снабжения армии медикаментами. В последующем снабжение лекарствами армии и флота было расширено и получило свое дальнейшее развитие.

Шаг третий – организация сети аптек в Москве, Петербурге и иных городах России.

К 1701 г. наступил момент, когда функционирующая царская аптека уже не справлялась с работой по обеспечению государя, его семьи, ближайшего окружения и армейских полков медикаментами. Остро встал вопрос об организации в Москве сети аптек, призванной продавать лекарства всем желающим. С этой формой организации работы аптек Петр I сталкивался, путешествуя по Европе. Он часто заходил в аптеки и расспрашивал их владельцев о правилах работы, условиях закупки, хранении и продаже медикаментов. Кроме того, в юности, приезжая в немецкую слободу, Петр знакомился с заграничным бытом и по рассказам иностранцев слышал о благотворном влиянии лекарств[4]. Дополнительным поводом, ускорившим принятие решения о создании вольных аптек, стал случай отравления боярина Петра Петровича Салтыкова человеком его Алешкой Каменским. Результатом разбора этого случая стал Указ «О наказании незнающих медицинских наук, и по невежеству в употреблении медикаментов, причиняющих смерть больным»[5]. Этот Указ, с нашей точки зрения, является одним из самых важных в ряду указов, определяющих становление аптечной службы в России. Поэтому далее следует его краткий пересказ. «*Разбор дела об отравлении боярина Петра Петровича Салтыкова человеком его Алешкой Каменским лекарством, от которого он, боярин, умер. При расспросе и под пыткой Алешка сказал, что он своего боярина лечил всякими лекарствами, купленными в лавке, в зелейном ряду. Сам боярин призвал Алешку и просил его купить лекарства от сна в зелейном ряду. Алешка купил арьяну на три деньги, принес и разделил его на двенадцать зерен, размером меньше конопляных зерен. Давал ему то лекарство ото сна, а не для отравы и без умысла. К допросу был привлечен Ганька Варфоломеев – сиделец из лавки в зелейном ряду. Он рассказал, что продал арьяну на четыре деньги, и велел давать мочному человеку по три зерна, а немочному два зерна конопляных. На следующий день Алешка приходил к Ганьке и рассказал, что боярин не просыпается, только в ночи стонал. Ганька велел Алешке барина водить, и если этого нельзя, то дать ему парного молока. По справке из Аптекарского приказа и по свидетельству Докторов и Лекарей то лекарство болящим дают по рассмотрению по три-четыре-пяти зерен с иными лекарствами, но де болящий с того лекарства и с двух зерен умрет*». Для принятия окончательного решения был упомянут Указ от 4 марта 1686 г., в котором было велено наказывать за смерть, причинен-

[1] Рихтер В. История медицины в России. Часть 1. М. 1814. С. 323.

[2] ПСЗРИ. 1475 01.11.1693. Т. III. С. 167.

[3] ПСЗРИ. 1624. 22.03.1698. Т. III. С. 444.

[4] Ткешелашвили И. С. Русская фармация до возникновения первых вольных аптек в России. (Труды кафедры истории и энциклопедии медицины, Императорского Московского Университета. Том. 1. Вып. 1.) М. 1902. 29 с.

[5] ПСЗРИ. 1756. 14.02.1700. Т. IV. С.10.

ную при приеме лекарств. В результате Великий Государь повелел, а бояре приговорили Алешку Каменского за неправильное использование лекарств и смерть боярина Петра Петрович в ссылку в Азов с женою на каторгу. При вынесении приговора были учтены несколько важных условий: был учинен допрос с привлечением всех сторон – обвиняемый, сотрудник зелейной лавки, служители Аптечного приказа, доктора и лекари, приближенные ко двору; установлены и учтены все детали происшествия; при вынесении приговора за пример решения был принят указ восемнадцатилетней давности. Само наказание, с нашей точки зрения, было довольно щадящим – каторга в Азове, но с семьей. Этот случай стал веским поводом для запрета торговли лекарствами в зелейный лавках, послужил поворотным моментом в организации на Москве вольных аптек и уничтожении зелейных лавок. Спустя короткое время Петр I издает Указ «О заведении в Москве вновь осьми аптек с тем, чтобы в них никаких вин не было продаваемо, о ведении оных Посольскому приказу и об уничтожении зелейных лавок». В Указе написано: «*...для всяких надобных и потребных лекарств быть на Москве вновь осми аптекам, и построить те аптеки в Китае и в Белом и Земляном городах, на больших проезжих и многолюдных улицах без всякого утиснения, и держать и продавать в тех аптеках всякие лекарства и лекарственные спирты и иные к тому принадлежащие потребные и целительные напитки, ... те аптеки с Докторами и Аптекарями и с Лекарями и иными чинами во всяких делах ведать в Государственном Посольском приказе. Кроме того, в Царствующем граде Москве ... зелейному ряду что в Китае городе, также и по всем улицам, и по перекресткам, и лавкам, в которых продавали всякие непотребные травы и зелья, будто вместо лекарств, не быть, и те по улицам и перекресткам лавки все сломать и очистить, а в том зелейном ряду торговать иными товарами, какими пристойно. И буде кто всяких чинов из Русских людей или иноземцев похочет те аптеки держать и строить своим иждивением ... велено Ему Великому Государю бить челом том и о даче себе под аптеки земель, и о жалованных грамотах. ... А покупать в те аптеки всякие лекарства за морем и у городов Архангельска и Азова, кому случайнее и способнее*»[1]. Этот указ Петра I относится к одним из самых известных и цитируемых в фармацевтической исторической литературе. Он знаменует начало организации в Москве вольных аптек, в которых будут продаваться лекарства для всех жителей города. В нем описана процедура организации аптек, с помощью именных жалованных грамот за ними закреплен особый статус, четко указано подчинение этих аптек. И самое главное – определен запрет торговли лекарствами в зелейных и травяных лавках и их полного разорения в Москве. Но выпустить указ это одно, а организовать аптеки это – другое. На исполнение этого указа потребовалось долгих 12 лет, и даже после этого срока зелейные лавки, несмотря на запрет, еще долго торговали своими снадобьями. Первая вольная аптека была открыта 22 ноября 1701 г. Руководил ею алхимист аптекарского приказа Иоган Готфрид Грегориус, получивший фармацевтическое образование за границей[2]. Вторым человеком, получившим привилегию на открытие аптеки, был Даниил Алексеевич Гурчин. Об этом свидетельствует царская грамота, выданная ему 28 декабря 1701 г. Благодаря хвалебным одам, написанным им в честь петровских побед, об этом аптекаре имеются дополнительные сведения. Так, по информации Орешникова А., Даниил Гурчин родился и получил начальное образование в Польше. Где Гурчин получил медицинские знания неизвестно, но из его трудов видно, что он хорошо владел польским языком, латынью и имел широкие медицинские познания. Русским языком владел «не вполне» – допускал орфографические ошибки. Приехал в Россию на рубеже XVII–XVIII вв. в числе лекарей-иностранцев. О жизни в Москве каких-либо сведений нет, но автор предполагает, что Гурчин «принадлежал к кругу интеллигенции, центром которой до переезда столицы в Петербург была Немецкая слобода». Был довольно состоятельным, вращался в кругу высокопоставленных вельмож. Какое-то время служил «доктором» в Государевой (царской) аптеке. Л. Ф. Змеев в своем труде «Русские врачебники» приводит текст рецепта, присланного из Государевой аптеки доктором Даниилом Алексеевичем Гурчиным. Однако не ясно, был ли Гурчин ранее доктором или фармацевтом, но в дальнейшем он именовал себя только «Аптекарем Его Царского Величества». Собирал сведения о лечебном действии лекарств, записывая их в рукописные книги. Из-под его пера вышли сочинения «Аптека домовая», «Аптека обозная» и «Фармакопея» – совместный труд с Афанасием Холмогорским.[3, 4]. Третья привилегия была дана в 1703 г. Гавриилу Андреевичу Саульсу «иноземцу цесарской земли», изучавшему аптекарское дело в Голландии. Аптека была открыта у Покровских ворот. Четвертая аптека была открыта в 1704 г. Михаилом Иессеном Арнкилем за Варварскими воротами. Пятая – Алексеем Меркуловым в 1709 г. на Пречистенке. Шестая – Авраамом Рутом в 1712 г. за Старым Каменном мостом. Седьмая – Гавриилом Бышевским на Варварке. Вось-

[1] ПСЗРИ. 1879. 22.11.1701. Т. IV. С. 177.

[2] ПСЗРИ. 1881. 28.11.1701. Т. IV. С. 178.

[3] Ткешелашвили И. С. Русская фармация до возникновения первых вольных аптек в России. (Труды кафедры истории и энциклопедии медицины, Императорского Московского Университета. Т. 1. Вып. 1). М. 1902. 29 с.

[4] Орешников А. Даниил Гурчин, московский аптекарь начала XVIII столетия. Сборник статей в честь графини П. С. Уваровой. 1916. С. 47–69.

мая аптека была открыта в 1713 г. Альбертом Цандером на Сретенской улице[1].

Аптекари, состоящие на службе у российских царей, как правило, были высокообразованными и состоятельными людьми, получившими медицинские знания в университетах Европы. Вместе с врачами они находились на высокой ступени гражданского общества, и Петр I поддерживал их высокий статус. Первым владельцам аптек выдавались именные грамоты. Это означало, что каждого аптекаря, получившего такую грамоту, Петр знал лично. Он был уверен в честности, справедливости и профессионализме будущего владельца аптеки. Грамота давала право закупать лекарства за границей и торговать ими в Москве. Владелец аптеки мог передать ее своим детям и внукам, а также при необходимости продать ее по своему усмотрению по договорной цене. Грамота защищала владельца аптеки от чрезмерных поборов, постоя и несправедливости от городских властей. В процессе организации вольных аптек в Российских городах аптекарям была предоставлена привилегия на организацию и содержание аптеки. Для большей независимости аптекарей от губернского начальства Петр I централизует оплату их труда, передав исполнение этой процедуры своим Указом в ведение Аптекарского приказа: «О бытии Аптекарским служителям и полковым лекарям в тех окладах, кои им положены в Аптекарском приказе»[2]. В дальнейшем, когда количество аптекарей стало увеличиваться, и произошло разделение на владельцев вольных аптек и аптечных служащих (гражданских и военных), положение последних в обществе стало снижаться.

Из представленных сведений видно, что в начале XVIII в. владельцы аптек стояли на довольно высокой ступени гражданского общества и благодаря предоставленной привилегии стремились сохранить свое особенное положение. Что же касается наемных аптечных служащих, то они, выполняя огромный объем работы, медленно опускались в социальной иерархии. Такое разделение между двумя слоями фармацевтического сословия в дальнейшем еще больше увеличивалось, но это произошло после Петра I.

Отработав схему организации и контроля работы аптек в Москве и, наконец, дождавшись нормального функционирования коммунальных служб в Санкт-Петербурге, в 1721 г. Сенат утверждает Указ «Об учреждении в городах аптек под смотрением Медицинской Коллегии, о вспоможении приискивающим медикаменты в Губерниях, и о бытии под надзором помянутой Коллегии гошпиталям»[3]. Подписанию Указа предшествовало выступление в Сенате доктора И. Л. Блюментроста, который доказывал целесообразность учреждения Медицинской Коллегии и подчинению ей всех имеющихся в России аптек. В Указе сказано: «*Сего августа 14 дня, по Его Царские Величества указу Правительствующий Сенат приказали: для исправления вышеупомянутых нужд и лучшего в том способа, в Санкт-Петербурге и в губерниях и Провинциях, аптеки позволить содержать вольные, против того, как и в Москве такие аптеки обретаются, и содержать оные в Канцелярии Медицинской под смотрением оной. Токмо того предостерегать, чтоб за неимением Докторов или Лекарей, в коих либо местах обывателям без пользы, время в болезнях не продолжалось*». Таким образом, в соответствии с Указом Аптечный приказ был переподчинен вновь организованной структуре управления здравоохранением России – Медицинской канцелярии, располагавшейся в новой столице. Начиная с 1721 г. сеть аптек стала формироваться и в Санкт-Петербурге, а также в губернских и других провинциальных городах.

Шаг четвертый – обеспечение аптек сырьем для приготовления лекарств.

Снабжение полковых аптек медикаментами требует большого количества сырья. Первым шагом в этом направлении стал Указ «О покупке в Придворную аптеку лекарственных растений, кореньев, мускуса, каменного масла и прочих аптекарских припасов, привозимых из Сибири, по продажной цене в Москве»[4]. Указ гласит: «*...коренья, коры, травы, цветы и мускус, струя, масло каменное, и прочие лекарственные статьи в Сибири в промысле, и в привозе к Москве бывают, и те статьи принять, в верхней Его Великаго Государя аптеку, и во что на Москве станут и то написать, дать в аптеку о том ведомость и взять по цене деньги..., а лиственные особо велеть купя спелыми, прислать пудов с 40 или 50, по гривне за пуд. ... лекарственные статьи и про иные, которые по ведомостям в Сибири и в близлежащих странах родятся, и в привозе бывают, велеть присылать в Сибирский приказ с ценами, и к каким болезням что употребляют, и то описать тоже*». Как видно, Указ фиксирует возможность Сибири стать районам-поставщиком лекарственного сырья для Государевой аптеки. Присылать лекарства по описи следует в Москву, строго контролируя их качество, а покупать лекарства надлежит у поставщиков по фиксированной цене.

Два года спустя Петр I издает новый Указ «О покупке в Сибирских городах ревеню по 300 пуд на год в казну, о присылке онаго в Москву и о запрете сей торговли частным людям под смертью казнию»[5]. В Указе говорится: «*В Сибирских городах покупать в казну стольнику Лариону Акимову сыну Синявину коренья ревеню по 300 пуд на год, и присылать к Москве в приказную Семеновскую палату ... и выде-*

[1] Змеев Л. Ф. Русские врачебники: Исследование в области нашей древней врачебной письменности Л. Ф. Змеева, бывшего преподавателя истории врачебных наук в Императорской Военно-медицинской академии. Санкт-Петербург. 1895. 274 с.

[2] ПСЗРИ. 2624. 08.01.1713. Т. V. С. 2.

[3] ПСЗРИ. 3811. 14.08.1721. Т. VI. С. 412.

[4] ПСЗРИ. 1909. 15.04.1702. Т. IV. С. 192.

[5] ПСЗРИ. 1967. 07.02.1704. Т. IV. С. 245.

лить ему для покупки того ревеню 1000 рублев. А под тот ревень и другие товары давать ... дощенник со всеми припасами да работных людей 30 человек. А тот ревень из Сибирских городов с Сибирскими служивыми людьми к Москве, а с Москвы ... пропускать везде без промедления. И сказать Великого Государя указ, что буде кто иноземцы или русские люди ... у проезжих людей купят ревень тайным обычаем ... и эту покупку не объявят, и тем людям за то их воровство и утайку быть в смертной казни...». Вновь государь печется о лекарственном сырье. Велит закупать тот ревень в Сибири, назначает ответственных за эту работу людей, отпускает для этого деньги, обеспечивает доставку ревеня в Москву, а за нарушение его указа грозит смертной казнью.

Очередным шагом в обеспечении аптек лекарственным сырьем стала организация в 1706 г. аптекарского огорода в Москве. Сад был заложен на тогдашней северной окраине Москвы (за Сухаревой башней). На это место из-под стен Кремля был перенесен государственный огород, используемый для выращивания лекарственных растений, находившийся при аптеке Гостиного двора. Основой для создания коллекции Аптекарского огорода послужили растения из дворцового Измайловского сада. В устройстве нового огорода принял личное участие Петр I, посадивший в нем три хвойных дерева: ель, пихту и лиственницу – «для наущения граждан в их различии». Первоначально хозяином огорода был Аптекарский приказ, затем Московский госпиталь, а в конце XVIII века им распоряжалась Московская медико-хирургическая академия[1]. В Петербурге также был заложен Аптекарский огород. Точная дата устроения Петербургского аптекарского огорода неизвестна. По одним сведениям, огород берет свое начало с Указа Петра I от 1713 г., по другим, эта дата перенесена на 1714 г. Поиски этого Указа в ПСЗРИ не увенчались успехом, но известно точно, что царь Петр при переносе столицы из Москвы в Петербург распорядился об устройстве «столь нужного для врачебного дела учреждения», как Аптекарский огород «для сеяния на нем лекарственных трав и цветов». Главной целью этого огорода стало разведение лекарственных растений для Аптекарского приказа[2].

Со временем стало понятно, что не все лекарственные растения можно вырастить на организованных в Москве и Петербурге аптекарских огородах. Встала необходимость закладки подобного аптекарского огорода на южных территориях России. Для этого наиболее подходила Астрахань. В связи с этим Петр I издает Указ «О заведении в Астрахани Аптекарского огорода, виноградных садов и конского завода Персидской породы». Указ требует: «*Завести в Астрахани Аптекарской огород, также сделать оранжерею и держать вывозные из Персии деревья и травы (которые не могут в огороде зимовать) и для приуготовления трав, которые потребны в Аптеку, взять из Санкт-Петербурга в Астрахань Аптекаря, да огородника*»[3]. В дальнейшем «Аптекарские огороды» были учреждены во многих крупных городах в составе военных госпиталей.

Нельзя не вспомнить о еще одном Указе Петра I. Он датирован 26 июня 1717 г. и называется «О приискании в России минеральных вод». Некоторые знания о лечебных свойствах минеральной воды царь получил в Европе во время «Великого посольства» в конце XVII века, посещая европейские курорты. Поэтому государь повелел: «*По получении сего Указа велите искать в Нашем Государстве (а особливо в тех местах, где есть железные руды) ключевых вод, которыми мочно пользоваться от болезней, на приклад, какими в здешних краях пользуются, как Пирмонтская, Шпавассер и проч. ...*»[4]. Согласно указу, немецкий доктор медицины Готлиб Шобер отправился в экспедицию на поиски российской минеральной лечебной воды. На средства Аптекарской канцелярии в 1717–1718 гг. Шобер Г. совершил экспедицию по Волге до Каспийского моря, обследовал минеральные источники Самары, объехал Нижнее Поволжье, описал Брагунские горячие источники на Тереке, открыл источники Северного Кавказа (Пятигорск, Железноводск, Кисловодск), указав на целебные свойства этих вод для лечения многих болезней. Петр I очень был обрадован, когда узнал, что в России есть собственные источники лечебных вод. И когда эти источники были изучены и опробованы, он часто ездил на Олонец сам и рекомендовал их своим приближенным.

Продолжая изучение Российских богатств, Петр I отправляет экспедицию в Сибирь. Для этого он принимает на работу немца Даниила Готлиба Мессершмидта. Д. Г. Мессершмидт родился в Данциге (6/16 сентября 1685 г.), учился в университетах Иены и Галле, где изучал медицину, зоологию и ботанику. В 1713 г. защитил диссертацию на тему «О разуме как главенствующем начале всей медицинской науки», получил ученую степень доктора медицины. В сентябре 1717 г. Мессершмидт был представлен царю и по его указу с января 1718 г. был принят на службу. 15 ноября 1718 г. он получил предписание отправиться в Сибирь «*для изыскания всяких раритетов и аптекарских вещей: трав, цветов, корений, семян и прочих принадлежащих статей в лекарственные составы*». Кроме того, Д. Г. Мессершмидт счел необходимым дополнительно изучить географию Сибири, ее натуральную историю, медицину (в частности эндемические болезни), памятники древности, филологию и этнографию. Во время экспедиции он делал зарисов-

[1] Зархин И.Б. Очерки из истории отечественной фармации. М.: МЕДГИЗ, 1956. 187 с.

[2] Куприянов Н. История медицины России в царствование Петра Великого. Санкт-Петербург, 1872. 16 с.

[3] ПСЗРИ. 3668. 26.10.1720. Т. VI. С. 251.

[4] ПСЗРИ. 3096 24.06.1717. Т. V. С. 498.

ки интересных предметов и изготавливал чучела животных. Экспедиция Д. Г. Мессершмидта растянулась на восемь лет и завершившись в Москве 31 января 1727 г. Коллекции, собранные и описанные Мессершмидтом, поступили в Кунсткамеру в 1729 г. Они включали подробные описания сибирских растений, животных, насекомых, моллюсков, панцирных, ракообразных, змей, рыб, китообразных, птиц и четвероногих. В описаниях Мессершмидт дает их названия по-латыни, по-русски, по-немецки, по-английски, на тангутском и монгольском языках. Собранные минералы распределены на 6 классов: вода, земля, сера, соль, металлы, камни. Большое значение для академического музея имели археологические предметы, привезенные Мессершмидтом, так как он их не только покупал, но и сам занимался раскопками, с указанием в дневнике, где и при каких обстоятельствах, на какой глубине они были обнаружены. По мнению современных ученых, собранные Д. Г. Мессершмидтом материалы имели большое значение для ботанических, зоологических, археологических, этнографических, лингвистических исследований Сибири[1].

Сюда же можно отнести Указ «Об учреждении казенной продажи дегтем, коломазью, мелом, рыбьим жиром, ворванным и кашалотовым салом и о воспрещении сей торговли частным людям»[2]. За пять месяцев до того, Государь ограничил торговлю этими продуктами, а с июля 1707 г. потребовал сдачи имеющихся у народа указанных товаров специально отобранным людям. А тем, кто будет продолжать торговлю этими товарами, на них будет назначен штраф: «*...а февраля с 11 числа сего года по Его Великого Государя указу, теми товарами (дегтем, коломазью, мелом, рыбьим жиром, ворванным и кашалотным салом) торговать никому не велено, а велено тот товар в прежние их меры, с прежнею ценою продавать выборным из слобод целовальникам под надзиранием мытенных Бурмистров, а оприч их тем товаром торговать никому не велено. А буде у кого того товара за продажею ныне на лицо: чтоб те люди приходя, те товары немедленно объявляли в Ратуше и деньги им за тот товар, по покупной их цене, выданы им будет безволокитно. А буде кто с сего числа теми товарами торговать, и на тех людях, за ослушание указа, по взятию у них товара безденежно, доправлена на них будет пеня, против винных корчемников*». Несомненно, этот товар является важным для Российского государства. Он почти полностью направлялся за рубеж, но часть его оставалась в Аптечном приказе и использовалась в качестве лекарственного средства.

[1] Тункина И. В., Савинов Д. Г. Даниэль Готлиб Мессершмидт: У истоков сибирской археологии. СПб: ООО «ЭлекСис»; 2017. 168 с.

[2] ПСЗРИ. 2155 21.07.1707. Т. IV. С. 382.

Информационная статья / Informational article

21-я Международная выставка «Аналитика Экспо» стала рекордной по количеству установленных взаимовыгодных контактов

С 11 по 14 апреля в МВЦ «Крокус Экспо» состоялась 21-я Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов «Аналитика Экспо 2023».

The 21st International Exhibition Analitika Expo Became a Record by the Number of Established Beneficial Contacts

The 21st International Exhibition of Laboratory Equipment and Chemical Reagents Analitika Expo was held at the Crocus Expo from the 11th till 14th of April

Выставка «Аналитика Экспо 2023» выступила уникальной площадкой, на которой собрались производители и поставщики лабораторного оборудования, представители производственных и научно-исследовательских лабораторий и другие специалисты отрасли для заключения взаимовыгодных соглашений, изучения новинок лабораторного оборудования и обсуждения актуальных вопросов. В 2023 году участниками стали 184 компании из России, Белоруссии, Индии, Китая, Казахстана.

Новые приборы и методы представили многолетние участники выставки: «Аналитэксперт», «Альгимед», «БиоХимМак», «Диполь», «БиоСистемы», «Катроса Реактив», «Лабораторное Оборудование и Приборы», «Люмэкс-Центрум», «НПО СПВЛАБ», «Мелитэк», «Миллаб», «Петротех», «Вибротехник», «Тескан», «ХИММЕД», «Хеликон», СКБ «Хроматэк», «Хромос Инжиниринг», «Экросхим», «РОСХИМРЕАКТИВ», «ПраймКемикалсГрупп», «Меммерт Раша» и многие другие.

Больше 30 компаний впервые приняли участие в выставке, среди которых: «3С-лаборатория», «Алкор Био», «Апекслаб», «БИОКОНТРОЛЬ ГР», «Камоцци Пневматика», «ДНК-Технология», «ЛионТех», «Набитекс Сайнтифик», «БСКБ Нефтехимавтоматика», «НИЦ Инновации», «Взор», «Сибирские аналитические системы», «ВЕСЭКСПЕРТ», «БелАналитика», «ПроЛаб-Трейд», «ЦТС Наука» и другие.

Тематические разделы выставки:

- Лабораторное оборудование и приборы.
- Лабораторная посуда, пластик, расходные материалы.
- Химические реактивы.
- Лабораторная мебель.
- Средства автоматизации лабораторных исследований.
- Контрольно-измерительное оборудование.
- Оборудование для биотехнологий.
- Лабораторное оборудование для экологического мониторинга.

Выставку посетили 6 716 специалистов из 20 стран и 67 регионов России из химической, фармацевтической, сельскохозяйственной, медицинской, нефтегазовой, пищевой, биотехнологической отраслей, представители лабораторий по экологическому мониторингу окружающей среды, а также дистрибьюторы лабораторного оборудования и компании, специализирующиеся на проектировании, строительстве, реновации и комплексном оснащении лабораторий.

На протяжении всех четырех дней выставки в конференц-залах проходила обширная научно-деловая программа:

- 103 спикера;
- более 40 часов лекций, презентаций новых продуктов и дискуссий;
- 1 625 делегатов.

Ключевым мероприятием деловой программы стала пленарная сессия «Оснащение аналитических лабораторий в современных реалиях», в течение которой спикеры обсудили вопросы импортозамещения и сохранения высокого качества измерений в аналитической химии с учетом введения санкций и изменения рынка лабораторного оборудования и приборов.

Кроме того, состоялись мероприятия на актуальные темы:

- Вода, воздух, почва. Профессиональный взгляд на лабораторный контроль (совместно с Аналитическим центром «РОСА»).
- Химия в Искусстве и Искусство в Химии. В рамках семинара выступил **Сирро Сергей Владимирович**, заведующий отделом технологических исследований Государственного Русского музея.
- Практические аспекты организации и проведения межлабораторных сличительных испытаний для целей корпоративных заказчиков.
- Актуальные вопросы анализа смазочных материалов и топлив.
- Мобильные лаборатории и пробоподготовка в них.
- Контроль пищевых продуктов на содержание вредных веществ антропогенного происхождения. Семинар подготовлен совместно с Научным советом по аналитической химии РАН и ФГБУ «ВГНКИ».
- Впервые на площадке выставки состоялся Биотехнологический конгресс (Секция: Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение).

Более 400 специалистов приняли участие в семинаре «Способы обеспечения качества результатов испытаний в лаборатории», организованном при поддержке ААЦ «Аналитика».

Все четыре дня работала площадка SMARTLABFORUM, которая представляла собой симбиоз шоурума лабораторной мебели и конференц-площадки для презентаций новинок продукции.

В ежегодном конкурсе среди участников выставки победителями стали:

- Компания JET Guangzhou BIO Filtratu – «Стенд, привлекающий наибольшее внимание посетителей».
- Компания ЛАКОПА – «Активная работа персонала на выставке».
- Компания МИЛЛАБ – «Отлично продуманное расположение экспонатов на стенде».
- Компания «Набитекс Сайнтифик» – «Эффективные визуальные коммуникации».
- Торговый Дом «Химмед» получил награду за «Наибольшее количество привлеченных посетителей на выставку при помощи промокода».

Научно-деловая программа была организована при экспертной поддержке ведущих отраслевых ассоциаций, медиа и образовательных организаций: Ассоциации «РОСХИМРЕАКТИВ», Аналитического центра ЗАО «Роса», ААЦ «Аналитика», Научного совета по аналитической химии РАН, журнала «Мир нефтепродуктов», компании BLOCK, Ассоциации «Компетентность и качество», ЧОУ ДПО «Содействие», Центра аккредитации «Стандарт», Учебного центра GxP.

Генеральный партнер SMARTLABFORUM: компания A90B.

Спонсор выставки: компания «Энерголаб».

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-21-33
УДК 615.31

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Биоактивные производные ксантоновых C-гликозидов – QSAR-подход

В. Н. Аксенова✉, **М. А. Морозова, А. В. Сыроешкин**

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

✉ **Контактное лицо:** Аксенова Валерия Николаевна. **E-mail:** aksenovav001@yandex.ru

ORCID: В. Н. Аксенова – https://orcid.org/0000-0001-7661-1877; М. А. Морозова – https://orcid.org/0000-0003-1586-2183;
А. В. Сыроешкин – https://orcid.org/0000-0003-3279-7520.

Статья поступила: 26.12.2022 **Статья принята в печать:** 17.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Ксантоновые гликозиды обладают уникальной структурой и свойствами. Большое количество исследований направлено на поиск производных C-гликозида мангиферина с более высокой биодоступностью. Применение QSAR-анализа позволит оптимизировать направление поиска новых ксантоновых производных с заданными характеристиками.

Цель. Используя доступные дескрипторы химической структуры, физико-химических свойств и биоактивности молекул, проанализировать выборку известных гомологов и аналогов мангиферина с целью QSAR прогнозирования биологического действия новых ксантоновых C-гликозидов.

Материалы и методы. Объектами исследования служили 26 молекул природных гомологов и модифицированных производных мангиферина. С использованием программы ChemicPen построены топологические графы соединений. Для расчета топологического индекса Балабана, обладающего высокой дискриминирующей способностью, применили ПО ChemicDescript. Липофильность молекул (log P), а также критерии правила Липински, рассчитаны в Molinspiration. При помощи Pass Online прогнозирован спектр наиболее вероятной (P_a > 0,7) биологической активности описываемых соединений. Для графического представления полученных результатов использовали ПО Origin (OriginLab, США).

Результаты и обсуждение. Мангиферин и его природные гомологи – наиболее гидрофильные соединения. Гидролиз C-гликозидной связи, алкилирование, ацилирование, введение аминозамещенного радикала в структуру мангиферина приводит к росту липофильных свойств. Спектр наиболее вероятной биологической активности описываемых молекул: противоопухолевое, антиоксидантное и кардиопротективное действие. Результаты ADMET моделирования на основе критериев подобия вещества лекарственному показали, что только 4 соединения соответствуют эмпирическому правилу пяти. Ошибка прогноза, установленная в результате кросс-валидации модели, связывающая индекс Балабана и липофильность соединений с их биоактивностью, составила в среднем не более 3 %.

Заключение. Продемонстрирована взаимосвязь между структурой и свойствами обсуждаемых молекул. Открываются возможности прогнозирования свойств природных и синтетических ксантоновых C-гликозидов и дальнейшего использования полученных результатов для направленного синтеза новых соединений.

Ключевые слова: мангиферин, QSAR, хемоинформатика, ксантоновые C-гликозиды

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

Вклад авторов. В. Н. Аксенова – литературный обзор, выполнение отдельных разделов моделирования, обработка и интерпретация полученных данных, анализ и структурирование результатов. М. А. Морозова – планирование дизайна исследования, работа над текстом статьи, формулирование выводов. А. В. Сыроешкин – идейный вдохновитель.

Финансирование. Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Для цитирования: Аксенова В. Н., Морозова М. А., Сыроешкин А. В. Биоактивные производные ксантоновых C-гликозидов – QSAR-подход. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):21–33. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-21-33

Bioactive Xanthone C-glycoside Derivatives – QSAR Approach

Valeriya N. Aksenova✉, **Mariya A. Morozova, Anton V. Syroeshkin**

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

✉ **Corresponding author:** Valeriya N. Aksenova. **E-mail:** aksenovav001@yandex.ru

ORCID: Valeriya N. Aksenova – https://orcid.org/0000-0001-7661-1877; Mariya A. Morozova – https://orcid.org/0000-0003-1586-2183;
Anton V. Syroeshkin – https://orcid.org/0000-0003-3279-7520.

Received: 26.12.2022 **Revised:** 17.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Xanthone glycosides have unique structures and properties. Many efforts focus on the search for C-glycoside derivatives of mangiferin with higher bioavailability. The application of the QSAR approach allows for the optimization of the search for novel xanthone derivatives with the desired characteristics.

Aim. Using available descriptors of chemical structure, physical-chemical properties, and biological activity, analyze a sample set of known homologs and analogs of mangiferin to QSAR prognosis bioactivity of new xanthone C-glycosides.

© Аксенова В. Н., Морозова М. А., Сыроешкин А. В., 2023
© Aksenova V. N., Morozova M. A., Syroeshkin A. V., 2023

Materials and methods. 26 molecules of natural homologs and modified derivatives of mangiferin formed the analyzed sample set. Topological graphs of compounds were constructed using ChemicPen software. ChemicDescript software was used for the calculation of molecular descriptors, including the Balaban index. Physicochemical characteristics of molecules as well as Lipinski's rule criteria were calculated in Molinspiration. The spectrum of the most probable ($P_a > 0.7$) biological activity of the described compounds were predicted using Pass Online. The software Origin (OriginLab, USA) was used for the graphical representation of the results.
Results and discussion. Mangiferin and its natural homologs are the most hydrophilic compounds. The hydrolysis of the C-glycosidic bond, alkylation, acylation, and the introduction of an amino substituent radical into the mangiferin structure led to the increase of its lipophilic properties. The spectrum of the most probable biological activities of the described molecules: antitumor, antioxidant, and cardioprotective effects. The results of ADMET modeling based on the substance-drug similarity criteria showed that only 4 compounds correspond to the rule of five. We proposed the validation model to predict bioactivity from lipophilicity and molecule structure described with Balaban index. The error of prediction obtained in a result of cross-validation turned out to be about less than 3 %.
Conclusion. A correlation between the structure and properties of the molecules discussed has been demonstrated. The obtained results can be used for further prediction of the properties of natural and synthetic xanthone C-glycosides and directed synthesis of new active compounds.

Keywords: mangiferin, QSAR, chemoinformatics, xanthone C-glycosides

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. Valeriya N. Aksenova - literature review, performing certain sections of modelling, processing and interpreting the data obtained, analysing and structuring the results. Mariya A. Morozova – planning a design of the research, working on the article text, formulating conclusions. Anton V. Syroeshkin – mastermind of the idea.

Funding. The publication was carried out with the support by the PFUR's Strategic Academic Leadership Program.

For citation: Aksenova V. N., Morozova M. A., Syroeshkin A. V. Bioactive xanthone C-glycoside derivatives – QSAR approach. *Drug development & registration*. 2023;12(2):21–33. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-21-33

ВВЕДЕНИЕ

Ксантоновые гликозиды являются вторичными метаболитами растений, грибов, лишайников и бактерий различных семейств и родов и обладают уникальной структурой и свойствами. Среди них мангиферин, выделяемый из растений семейств *Liliaceae, Aristolochiaceae, Rubiaceae, Gentianaceae* и др., один из наиболее изученных С-гликозидов ксантонового ряда, нашедших применение в медицине [1]. В молекуле мангиферина (рисунок 1) атом углерода во втором положении ксантонового ядра замещен остатком β,D-глюкопиранозы, образуя с углеводным фрагментом устойчивую к кислотному и ферментативному гидролизу С-гликозидную связь [2].

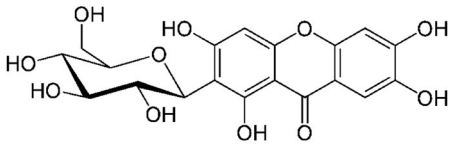


Рисунок 1. Структура ксантонового С-гликозида мангиферина

Figure 1. The structure of the xanthone C-glycoside mangiferin

Мангиферин зарегистрирован в качестве противогерпетического лекарственного средства «Алпизарин» в РФ [3]. Однако его применение не ограничено только вирулицидным действием: как производное ксантона, он проявляет противовоспалительное, антиоксидантное, антидиабетическое, противораковое, радиопротекторное действие [4]. Большое количество проводимых в настоящее время исследований направлено на исправление главного «недостатка» молекулы – ограниченной биодоступности. Так известно, что синтез гликозилированных производных мангиферина зачастую позволяет получить более активные соединения с улучшенными показателями растворимости при минимизации токсичности [5]. Применение QSAR-подхода для прогнозирования физико-химических свойств и биологически активного потенциала позволяет оптимизировать направление поиска новых производных мангиферина.

Цель настоящей работы: используя доступные дескрипторы химической структуры, физико-химических свойств и биоактивности молекул, проанализировать выборку известных гомологов и аналогов мангиферина с целью QSAR прогнозирования биологического действия новых ксантоновых С-гликозидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – молекулы природных гомологов и модифицированных производных ксантонового С-гликозида мангиферина, описанные в недавних обзорных и оригинальных статьях научных журналов [6–10]. В результате отбора в состав выборки корреляционного анализа «структура-свойство» включили 26 соединений. С применением програм-

мы ChemicPen v. 2.6 были построены молекулярные графы отобранных для анализа структур (https://cetramax-chemicpen.software.informer.com) [11]. Для дальнейшей аналитической работы – расчета топологических и физико-химических дескрипторов, прогнозирования биологической активности – использовали формулы соединений, представленные в форматах .chp и .mol.

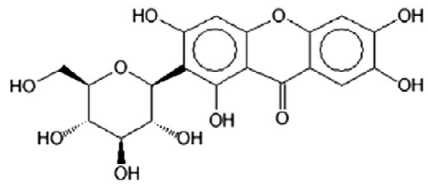
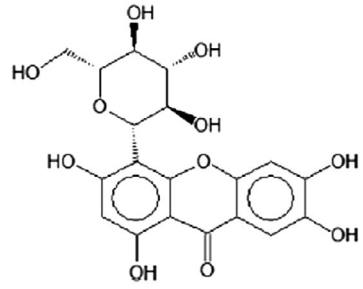
Известно, что топологические дескрипторы – это достаточно простой и удобный QSAR-инструмент для прогнозирования многих молекулярных свойств органических соединений [12]. Индекс расстояний-связности Балабана (J), основанный на матрице расстояний между атомами молекулы, обладает высокой дискриминирующей способностью и весьма широко используется для моделирования и оценки различных физико-химических параметров, а также биологической активности соединений. [13]. Это и послужило основой выбора стерического дескриптора Балабана для настоящего исследования. Индекс Балабана, вычисляемый по матрице топологических расстояний между атомами, рассчитывали в программе ChemicDescript [14]. С привлечением веб-ресурса molinspiration.com определены молекулярные массы, количество акцепторов и доноров водородной связи, смоделированы дескрипторы липофильности (log P) молекул [15]. Для быстрого и малозатратного биологического скрининга потенциально активных производных мангиферина применили возможности ресурса Pass Online (http://www.way2drug.com/passonline/). Использовали оценку фармакологического действия, численно выраженную как вероятность наличия (P_a) или отсутствия (P_i) ее проявления. Анализ и графическое представление его результатов осуществляли с использованием ПО Origin (OriginLab, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

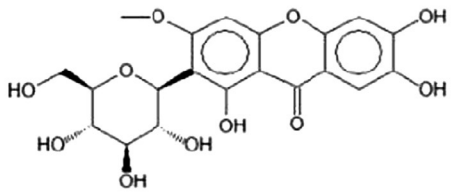
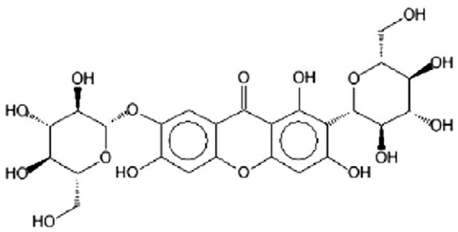
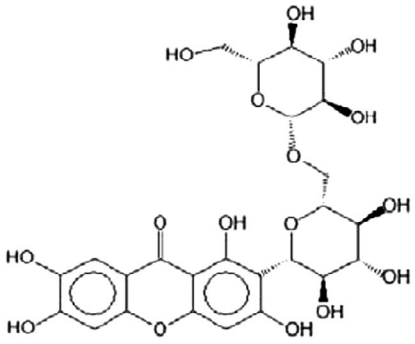
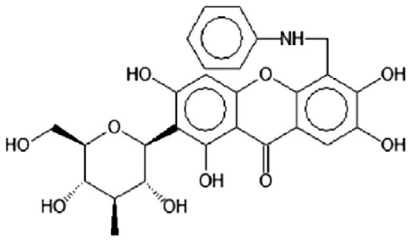
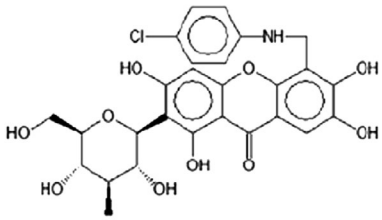
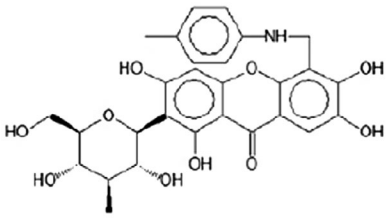
В таблице 1 представлены формулы исследуемых соединений, разделенные на несколько групп в соответствии с особенностями строения. Группа 1 – мангиферин (1.1), его структурные изомеры и гомологи: изомангиферин (1.2), гомомангиферин (1.3), неомангиферин (1.4) и гликозилированное производное мангиферина (биозид) (1.5). Гомомангиферин в отличие от мангиферина имеет метоксигруппу в положении 3, в то время как у изомангиферина сахарный остаток присоединен в положении 4. Неомангиферин – единственный ксантоновый гликозид, содержащий одновременно С- и О-гликозидную связь. Группа 2 – синтезированные авторами работы [10] аминопроизводные мангиферина – 5-(N-фениламинометилено) мангиферин (2.1), 5-(N-*n*-хлорофениламинометилено) мангиферин (2.2), 5-(N-4-метилфениламинометилено) мангиферин (2.3), 5-(N-*n*-метоксифениламинометилено)мангиферин (2.4), 5-(N,N-дифениламинометилено) мангиферин (2.5), 5-(N-α-нафтиламинометилено)мангиферин (2.6). Группа 3 – ацилированные производные, среди которых продукт биотрансформации, полученный в результате действия липазы (3.1), а также 2′-*транс*-О-кофеоилмангиферин (3.5). Группа 4 – алкилированные производные, в том числе, продукт биоферментации культуры *Arthrobacter nicotianae* (4.1). Пятая группа – агликон мангиферина норатириол (5.1) и его производные – 2-карбальдегид норатириола (5.2), норатириола пропионат (5.3) и норатириола тетрапропионат (5.4)

Таблица 1. Ксантоновые С-гликозиды – производные мангиферина

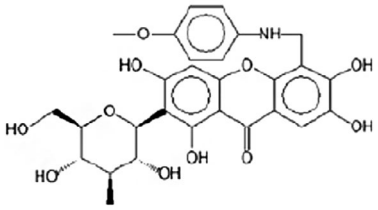
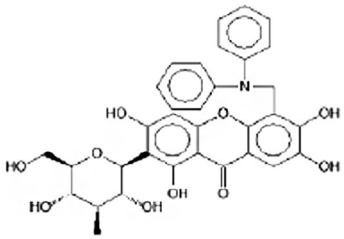
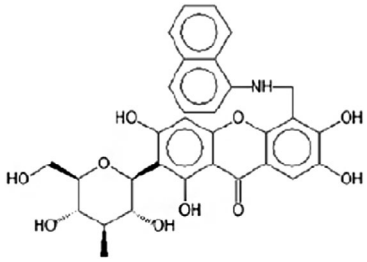
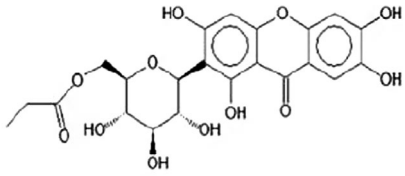
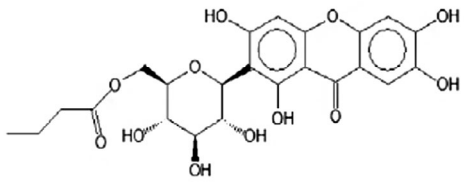
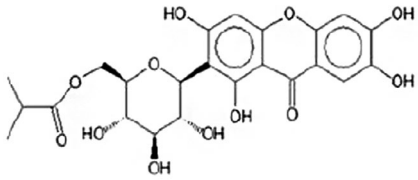
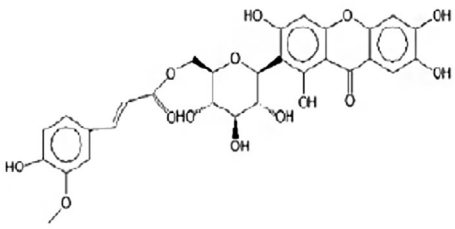
Table 1. Xanthone C-glycosides – derivatives of mangiferin

№	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	P_a	P_i
1.1		Антиоксидантная Противоопухолевая* Antioxidant Antitumor*	0,957 0,958	0,003 0,003
1.2		Кардиопротективная Антиоксидантная Противоопухолевая* Cardioprotective Antioxidant Antitumor*	0,951 0,961 0,971	0,002 0,003 0,003

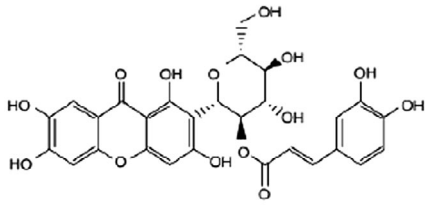
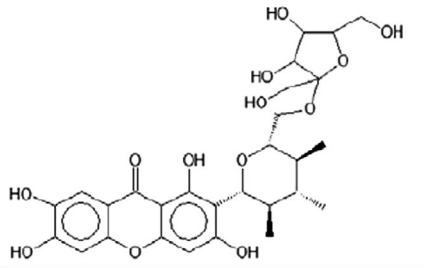
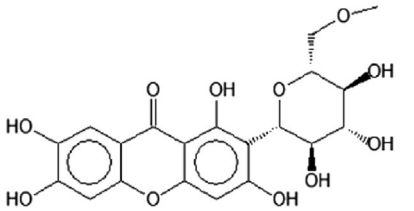
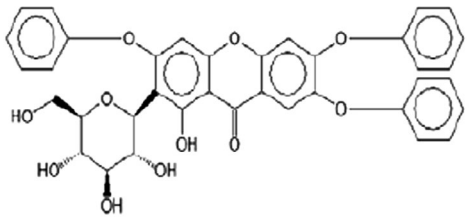
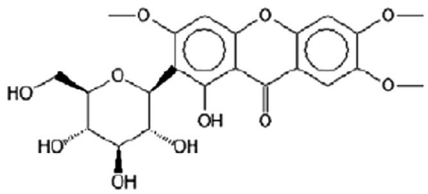
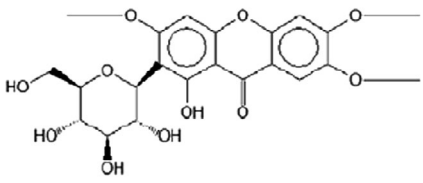
Продолжение таблицы 1

№	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	P_a	P_i
1.3		Кардиопротективная Антиоксидантная Противоопухолевая* Cardioprotective Antioxidant Antitumor*	0,958 0,951 0,952	0,002 0,004 0,003
1.4		Кардиопротективная Антиоксидантная Противоопухолевая* Cardioprotective Antioxidant Antitumor*	0,985 0,966 0,962	0,001 0,002 0,001
1.5		Кардиопротективная Антиоксидантная Регуляция апоптоза Cardioprotective Antioxidant Apoptosis' regulation	0,988 0,945 0,954	0,001 0,004 0,002
2.1		Антиоксидантная Противоопухолевая* Antioxidant Antitumor*	0,804 0,760	0,035 0,016
2.2		Антиоксидантная Противоопухолевая* Antioxidant Antitumor*	0,831 0,751	0,029 0,017
2.3		Антиоксидантная Противоопухолевая* Antioxidant Antitumor*	0,731 0,750	0,049 0,017

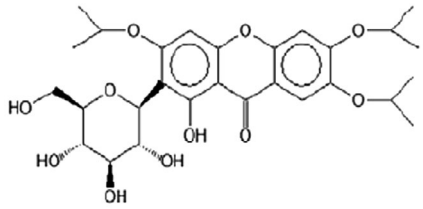
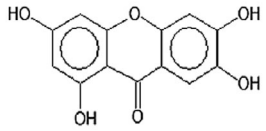
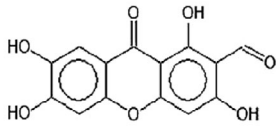
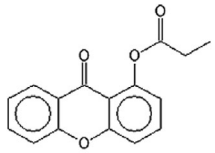
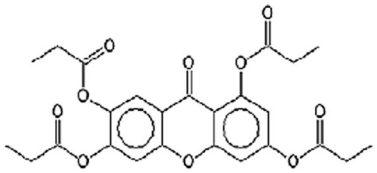
Продолжение таблицы 1

№	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	P_a	P_i
2.4		Антиоксидантная Противоопухолевая* Antioxidant Antitumor*	0,763 0,764	0,044 0,015
2.5		Противоопухолевая*** Antitumor***	0,786	0,013
2.6		Антибактериальная активность Antibacterial activity	0,716	0,050
3.1		Антиоксидантная Регуляция апоптоза Antioxidant Apoptosis' regulation	0,967 0,925	0,002 0,003
3.2		Кардиопротективная Антиоксидантная Регуляция апоптоза Cardioprotective Antioxidant Apoptosis' regulation	0,948 0,963 0,941	0,002 0,003 0,002
3.3		Антиоксидантная Antioxidant	0,956	0,003
3.4		Антиоксидантная Antioxidant	0,980	0,001

Продолжение таблицы 1

№	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	P_a	P_i
3.5		Антиоксидантная Регуляция апоптоза Antioxidant Apoptosis' regulation	0,984 0,943	0,001 0,002
4.1		Противоопухолевая** Antitumor**	0,962	0,003
4.2		Антиоксидантная Antioxidant	0,965	0,003
4.3		Антиоксидантная Antioxidant	0,920	0,007
4.4		Кардиопротективная Cardioprotective	0,954	0,002
4.5		Кардиопротективная Антиоксидантная Противоопухолевая* Cardioprotective Antioxidant Antitumor*	0,948 0,943 0,922	0,002 0,004 0,004

Окончание таблицы 1

№	Структурная формула Structural formula	Активность Activity	P_a	P_i
4.6		Кардиопротективная Антиоксидантная Противоопухолевая* Cardioprotective Antioxidant Antitumor*	0,900 0,931 0,965	0,003 0,005 0,003
5.1		Антиоксидантная Регуляция апоптоза Противоопухолевая** Antioxidant Apoptosis' regulation Antitumor**	0,965 0,952 0,961	0,003 0,002 0,003
5.2		Противоопухолевая** Antitumor**	0,895	0,006
5.3		Антиоксидантная Регуляция апоптоза Antioxidant Apoptosis' regulation	0,932 0,855	0,005 0,005
5.4		Антиоксидантная Противоопухолевая* Противоопухолевая** Antioxidant Antitumor* Antitumor**	0,918 0,782 0,851	0,007 0,013 0,009

Примечание. *Усиление экспрессии антионкогена TP53.
** Ингибирование экспрессии гена HIF-1α.
*** Хемопревентивная активность.

Note. * Increase expression of the antioncogene TP53.
** Inhibition of the HIF-1α gene expression.
*** Chemopreventive activity.

Спектр наиболее вероятной ($P_a > 0,7$) биологической активности описываемых молекул включал: противоопухолевое действие (усиление экспрессии антионкогена TP53, ингибирование экспрессии гена HIF-1α, хемопревентивная активность), антиоксидантное и кардиопротективное действие. Кроме того, для некоторой части описанных в таблице 1 соединений, выявлена возможность регуляции процесса апоптоза путем ингибирования проницаемости митохондриальных Ca^{2+}-зависимых пор (mPTP). Антибактериальная активность, обусловленная ингибированием фермента синтеза тейхоевой кислоты – поли(глицерофосфат)глицерофосфотрансферазы, – на значимом уровне прогнозирована только для соединения 2.6.

Анализируя значения липофильности молекул, рассчитанные в Molinspiration, выявили ряд важных закономерностей: мангиферин и его природные гомологи – наиболее гидрофильные соединения, причем дополнительный углеводный фрагмент в составе молекулы (1.4, 1.5) приводит к двукратному снижению значения log P (рисунок 2). Все остальные модификации молекулы мангиферина – гидролиз С-гликозидной связи (5.1–5.4), алкилирование (4.1–4.6), ацетилирование (3.1–3.5), введение аминозамещенной группы (2.1–2.6) – приводят к росту липофильности.

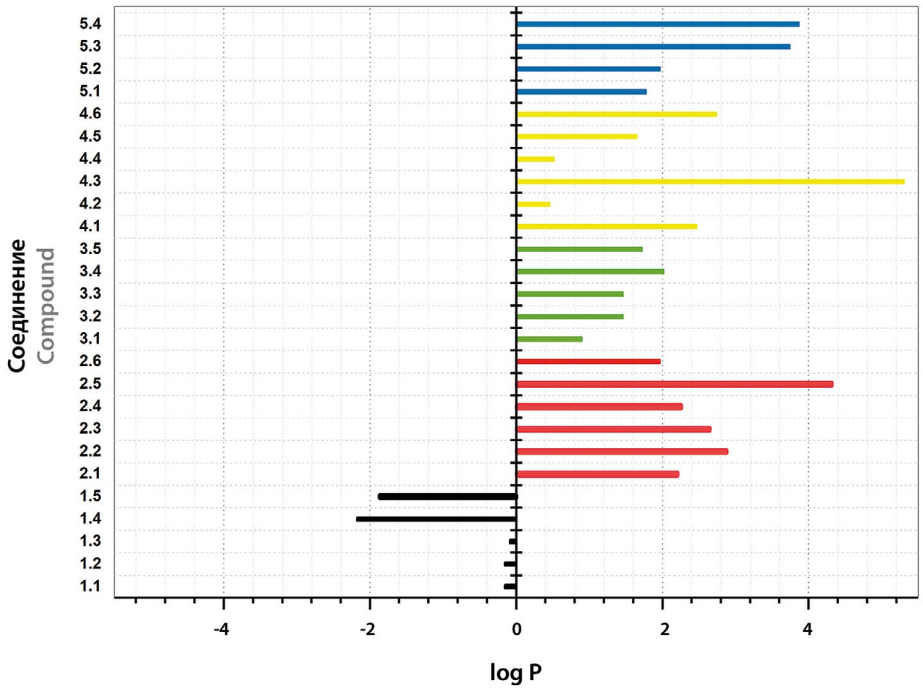


Рисунок 2. Сравнительная диаграмма липофильности природных соединений в сравнении с модифицированными синтетическими аналогами мангиферина.

Группа 1 – мангиферин и его структурные изомеры – черный; группа 2 – аминопроизводные мангиферина – красный; группа 3 – ацилированные производные мангиферина – зеленый; группа 4 – алкилированные производные мангиферина – желтый; группа 5 – агликон нораториол и его производные – синий

Figure 2. Comparative lipophilicity diagram of natural compounds versus modified synthetic analogues of mangiferin.

Group 1 – mangiferin and its structural isomers – black; Group 2 – mangiferin amino derivatives – red; Group 3 – acylated mangiferin derivatives – green; Group 4 – alkylated mangiferin derivatives – yellow; Group 5 – aglycon noratyriol and its derivatives – blue

Наиболее вероятные виды биологической активности производных мангиферина – противоопухолевую, антиоксидантную, кардиопротективную – сопоставили с физико-химическими свойствами (липофильностью) и структурой (индексом Балабана, J) рассматриваемых соединений. Полученные результаты QSAR, представленные на рисунке 3 в трехмерном пространстве, оказались весьма информативными. Так, противоопухолевая активность (рисунок 3, А) наиболее максимально выражена у соединений со значениями липофильности от 0 до 2, при этом алкилированные производные мангиферина (4.1, 4.6) с наибольшей вероятностью обладают антипролиферативными свойствами. Мангиферин (1.1), как и его агликон (5.1) несколько уступают модифицированным молекулам, но проявляют высокую степень потенциальной активности ($P_a > 0{,}9$). Очевидно, что исходя из физико-химических свойств (log P) применение агликона целесообразно при пероральном приеме, в то время как мангиферин следует использовать парентерально в виде водных растворов. Введение дополнительного гликозидного фрагмента (1.4), так же как и модификация агликона не влияет на противоопухолевую активность и, следовательно, не имеет практического смысла.

Антиоксидантные свойства ярко выражены ($P_a > 0{,}8$) у всех анализируемых групп, кроме аминопроизводных мангиферина и так же, как и в случае противоопухолевых свойств, параболически зависят от липофильности (рисунок 3, Б). Показано, что модификация структуры мангиферина путем ацилирования может рассматриваться как один из потенциальных путей получения соединений с более выраженной антиоксидантной активностью.

Наиболее высокая вероятность проявления кардиопротективных свойств присуща водорастворимым дисахариду (1.4) и биозиду (1.5) мангиферина, линейно снижаясь пропорционально уменьшению гидрофильных свойств соединений (рисунок 3, В). Отметим, что сам мангиферин не рассматривается как кардиопротектор, в то время как продукт его ацилирования (3.2), несмотря на большую липофильность, потенциально способен проявлять эти свойства.

Некоторые производные мангиферина (1.5, 3.5, 5.1) обладают вероятной фармакологической активностью в отношении регуляции конформации белков

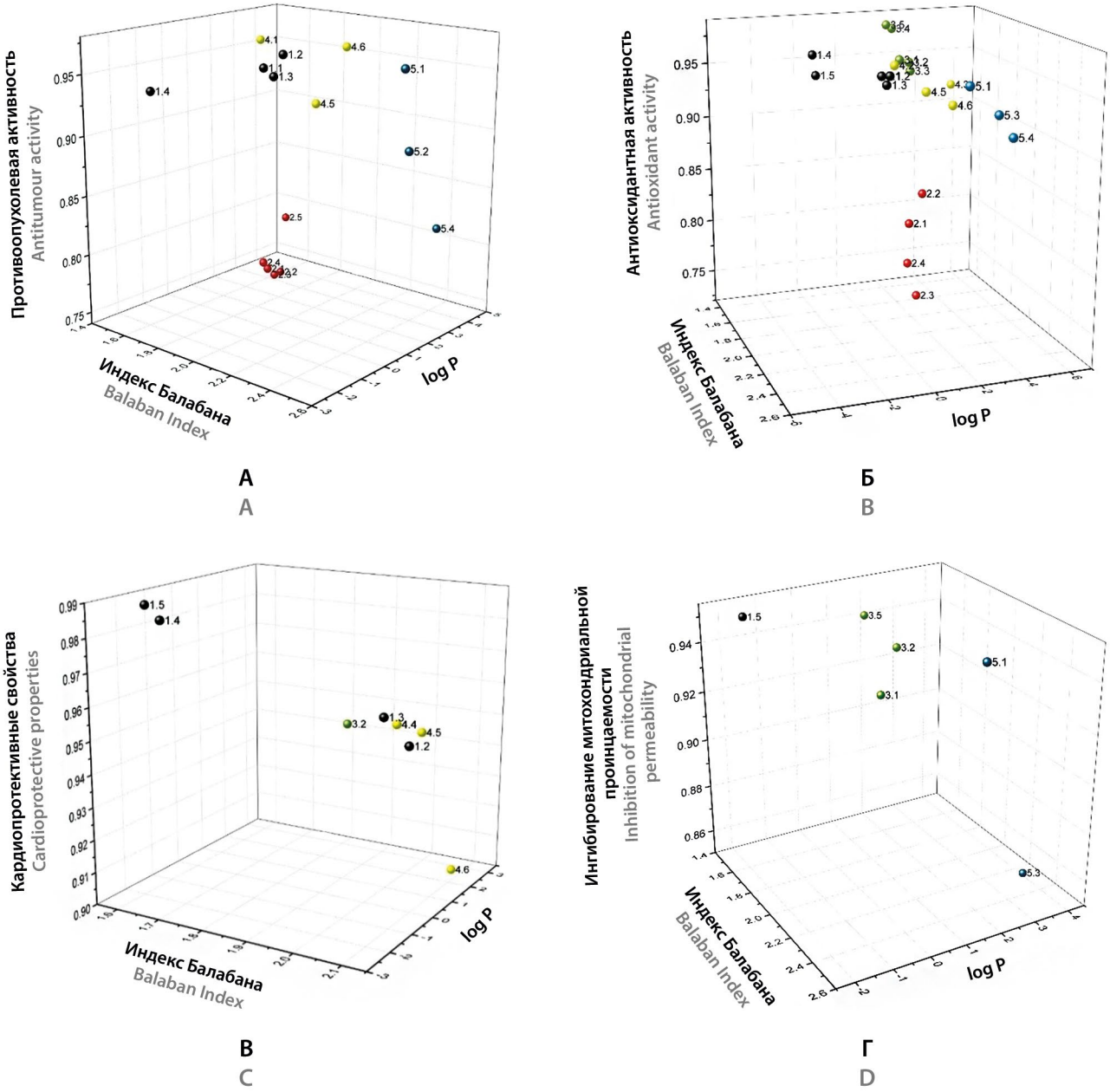


Рисунок 3. Трехмерные диаграммы структура-липофильность-биологическая активность для рассматриваемых производных мангиферина

А – противоопухолевая активность (выявлена у 15 соединений из 26); Б – антиоксидантная активность (выявлена у 21 соединений из 26); В – кардиопротективные свойства (выявлены у 8 соединений из 26); Г – регуляция апоптоза (выявлена у 6 соединений из 26)

Figure 3. Three-dimensional structure-lipophilicity-biological activity diagrams for the considered mangiferin's derivatives

A – antitumour activity (identified in 15 out of 26 compounds); B – antioxidant activity (identified in 21 out of 26 compounds); C – cardioprotective properties (identified in 8 out of 26 compounds); D – regulation of apoptosis (identified in 6 of 26 compounds)

митохондриальных пор (рисунок 3, Г). Отметим, что избирательные ингибиторы работы mPTP могут быть эффективны в лечении ишемической болезни сердца, ишемии сосудов головного мозга, а также при нейродегенеративных заболеваниях, предупреждая апоптоз клеток в условиях гипоксии [16]. Исходя из полученных результатов QSAR-анализа, имеет смыл направленная химическая модификация структуры мангиферина путем ацилирования фрагментов молекулы, так же как и получение О-дигликозидов, либо гидролиз С-гликозидной связи, с высвобождением агликона норатириола.

Оптимизацию результатов QSAR-скрининга производных мангиферина продолжили с применением эмпирического правила Липински (таблица 2). Результаты ADMET моделирования на основе критериев подобия вещества лекарственному показали, что только 4 соединения (5.1, 5.2, 5.3, 5.4) имеют молекулярную массу не более 500 г/моль; содержат в своей структуре суммарно не более 10 акцепторов водородной связи (nON); не более пяти доноров водородной связи (nOHNH) протонов и одновременно достаточно гидрофильны (log P < 5): норатириол и его ацилированные производные. Остальные производные и даже сам мангиферин не прошли тест на "drug-likeness". Однако, в литературе описано большое число примеров, когда биоактивные соединения именно растительного происхождения формально не соответствуют правилу пяти, но успешно применяются в качестве лекарственных средств [17].

Кроме того, стоит отметить, что большинство сегодняшних молекул-кандидатов, включая производные соединений природного происхождения, находятся на совершенно новом уровне структурной сложности, обладая уникальными физико-химическими свойствами. Их большая молекулярная масса, повышенная липофильность, значительное количество ароматических колец увеличивают потребность в стратегиях улучшения биодоступности, выходящих за рамки одной лишь оптимизации соединения. Для облегчения пероральной биодоступности новых ЛС, дальнейшего расширения разнообразия и сложности молекул должны быть использованы технологии систем доставки лекарств наноразмерного диапазона [18–20].

В ходе работы были также построены модели, позволяющие прогнозировать и численно оценивать вероятность проявления противоопухолевой, кардиопротективной и антиоксидантной активности новых соединений ксантонового ряда. На рисунке 4 приведен один из примеров полученной калибровки в трехмерном пространстве – модель на плоскости.

Оценку ошибки прогноза проводили методом кросс-валидации с исключением по одному образцу. Полученные средние отклонения от принимаемого за истинное значение активности (данные программы Pass) представлены в таблице 3.

Средняя ошибка прогнозируемого значения антиоксидантной и кардиопротективной активности не превышала 1 %, при высоком разбросе получаемых значений – в пределах 3 %. В случае противоопухолевого действия прецизионность модели низкая в связи с разбросом в значениях точек и их малым количеством на калибровочной плоскости.

Таблица 2. Выполнение критериев правила Липински для выборки ксантоновых С-гликозидов – производных мангиферина

Table 2. Implementation of the Lipinski rule criteria for sampling xanthone C-glycosides – derivatives of mangiferin

Соединение Compound	Mr, г/моль g/mol	nON	nOHNH	logP	Соответствие критериям правила Compliance with the criteria of the rule
1.1	422.34	11	8	–0.16	нет no
1.2	422.34	11	8	–0.16	нет no
1.3	436.37	11	7	–0.09	нет no
1.4	584.48	16	11	–2.18	нет no
1.5	584.48	16	11	–1.87	нет no
2.1	525.51	11	8	2.21	нет no
2.2	559.96	11	8	2.88	нет no
2.3	539.54	11	8	2.65	нет no
2.4	555.54	12	8	2.26	нет no
2.5	600.62	10	7	4.32	нет no
2.6	579.60	11	8	1.97	нет no
3.1	478.41	12	7	0.90	нет no
3.2	492.43	12	7	1.46	нет no
3.3	492.43	12	7	1.46	нет no
3.4	598.51	14	8	2.02	нет no
3.5	584.49	14	9	1.72	нет no
4.1	578.57	13	8	2.47	нет no
4.2	436.37	11	7	0.46	нет no
4.3	692.72	11	5	5.31	нет no
4.4	464.42	11	5	0.52	нет no
4.5	506.50	11	5	1.65	нет no
4.6	548.59	11	5	2.74	нет no
5.1	260.20	6	4	1.78	да yes
5.2	288.21	7	4	1.97	да yes
5.3	268.27	4	0	3.74	да yes
5.4	484.46	10	0	3.87	да yes

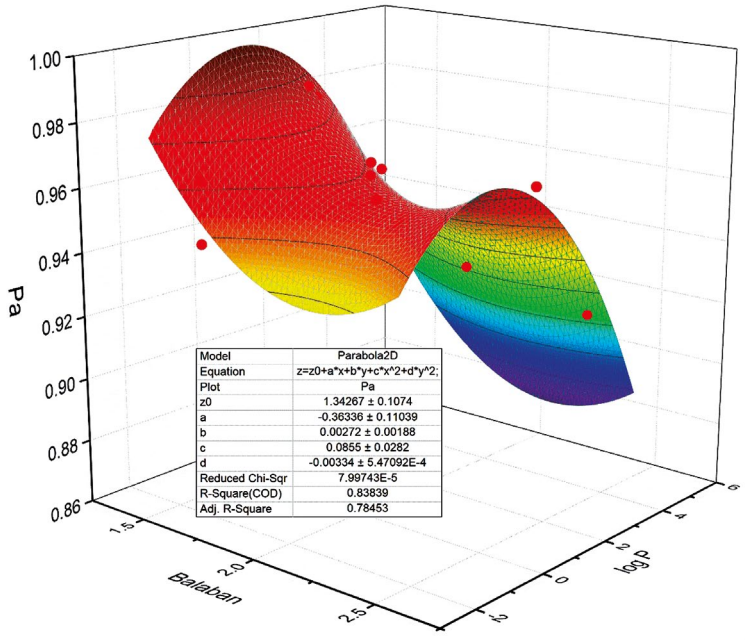


Рисунок 4. Параболическая модель, построенная по данным log P, J и P_a (Pass) для прогноза антиоксидантных свойств производных мангиферина

Figure 4. Parabolic model constructed from log P, J and P_a (Pass) data to predict the antioxidant properties of mangiferin derivatives

Таблица 3. Результаты кросс-валидации с исключением по одному образцу для построенных моделей прогноза активности производных мангиферина

Table 3. Results of the cross-validation with single sample exclusion for the constructed mangiferin derivatives activity prediction models

Модель прогноза активности Activity prediction model	**Ошибка определения, %** ($\bar{x} \pm SD$) Error of definition, % ($\bar{x} \pm SD$)
Антиоксидантная Antioxidant	0,07 ± 1,30
Кардиопротективная Cardioprotective	–0,73 ± 2,73
Противоопухолевая Antitumor	–0,63 ± 7,56

Помимо кросс-валидации, провели оценку прогнозируемых вероятностей активности для теоретических производных мангиферина. Полученные результаты представлены в таблице 4 в сравнении со значениями, предсказываемыми программой Pass.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

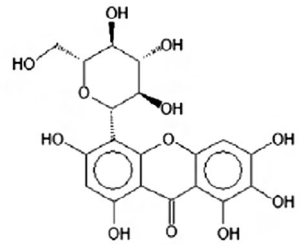
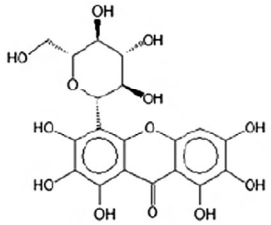
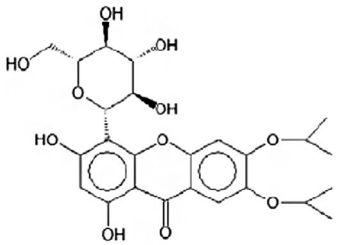
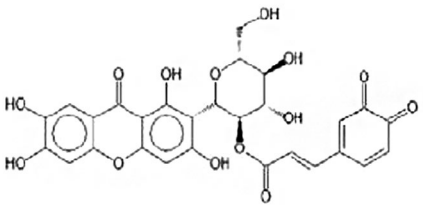
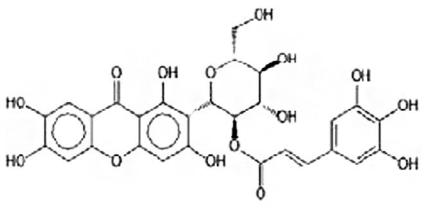
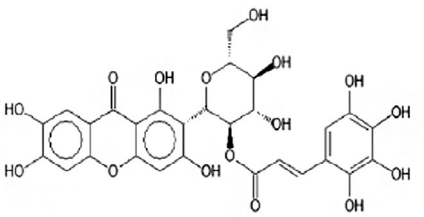
В результате проведенного QSAR-анализа описанных в литературе структур производных мангиферина установлено, что наибольшей кардиопротективной активностью обладает неомангиферин; наиболее вероятные ингибиторы митохондриального пути запуска апоптоза – агликон мангиферина и некоторые продукты его ацилирования; наиболее активные агонисты целостности мембран – молекулы с удлиненным сахарным фрагментом; наибольшая противоопухолевая активность, выраженная в усилении экспрессии гена TP53, характерна для изомангиферина. Принимая во внимание большой научный интерес к разнообразной биологической активности ксантоновых С-гликозидов, полученные результаты важны для демонстрации взаимосвязи между структурой и свойствами обсуждаемых молекул. Предложенные модели прогноза антиоксидантной, кардиопротективной и противоопухолевой активности на основании структуры и простейших физико-химических свойств открывают возможности прогнозирования действия природных и синтетических ксантоновых С-гликозидов, а также дальнейшего использования полученных результатов для направленного синтеза новых соединений на их основе.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

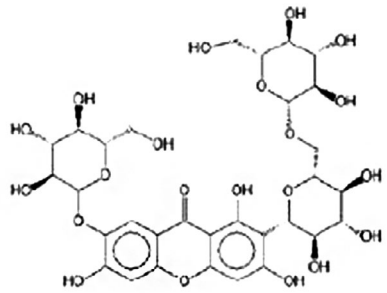
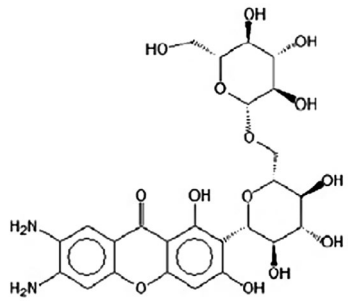
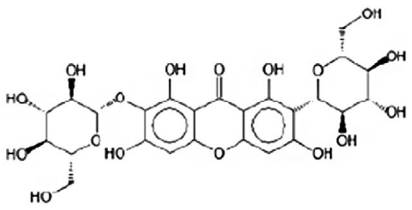
1. Ishaque M., Bibi Y., Masood S., Al Ayoubi S., Qayyum A., Nisa S., Ahmed W. Xanthone C-glycosides isomers purified from Dryopteris ramosa (Hope) C. Chr. with bactericidal and cytotoxic prospects. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29(2):1191–1196. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.09.047.
2. Huang Q., Wang Y., Wu H., Yuan M., Zheng C., Xu H. Xanthone Glucosides: Isolation, Bioactivity and Synthesis. *Molecules.* 2021;26(18):5575. DOI: 10.3390/molecules26185575.
3. Rubleva O. V. To the question of therapy and prevention of viral diseases. *RMZH*. 2012;11:571. (In Russ.)
4. Lum P. T., Sekar M., Gan S. H., Jeyabalan S., Bonam S. R., Rani N. N. I. M., Ku-Mahdzir K. M., Seow L. J., Wu Y. S., Subramaniyan V., Fuloria N. K., Fuloria S. Therapeutic potential of mangiferin against kidney disorders and its mechanism of action: A review. *Saudi J Biol Sci.* 2022 Mar;29(3):1530–1542. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.11.016.
5. Mittal S., Iqubal M. K., Iqbal B., Gupta M. M., Ali J., Baboota S. A pervasive scientific overview on mangiferin in the prevention and treatment of various diseases with preclinical and clinical updates. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2021;18(1):9–21. DOI: 10.1515/jcim-2019-0250.

Таблица 4. **Проверка функциональности построенных моделей для прогноза активности производных мангиферина**

Table 4. **Validation of the functionality of the models built to predict the activity of mangiferin derivatives**

Модель для активности Model for activity	**Соединение** Compound	$P_{a\ (Pass)}$	P_a	$\frac{\lvert P_{a\ (Pass)} - P_a \rvert}{P_{a\ (Pass)}}$, %
Противоопухолевая Antitumor		0,975	0,952	2,3
		0,962	0,951	1,1
		0,980	0,951	2,9
Антиоксидантная Antioxidant		0,975	0,975	0
		0,973	0,973	0
		0,972	0,974	0,2

Окончание таблицы 4

Модель для активности Model for activity	**Соединение** Compound	$P_{a\ (Pass)}$	P_a	$\frac{\lvert P_{a\ (Pass)} - P_a \rvert}{P_{a\ (Pass)}}$, %
Кардиопротективная Cardioprotective		0,992	1,024	3,2
		0,982	0,989	0,7
		0,980	0,983	0,3

6. Jyotshna, Khare P., Shanker K. Mangiferin: A review of sources and interventions for biological activities. *BioFactors*. 2016;42(5):504–514. DOI: 10.1002/biof.1308.
7. Telang M., Dhulap S., Mandhare A., Hirwani R. Therapeutic and cosmetic applications of mangiferin: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2013;23(12):1561–1580. DOI: 10.1517/13543776.2013.836182.
8. Ehianeta T. S., Laval S., Yu B. Bio- and chemical syntheses of mangiferin and congeners. *BioFactors*. 2016;42(5):445–458. DOI: 10.1002/biof.1279.
9. Singh S. K., Sinha S. K., Prasad S. K., Kumar R., Bithu B. S., Kumar S. S., Singh P. Synthesis and evaluation of novel analogues of mangiferin as potent antipyretic. *Asian Pac J Trop Med*. 2011;4(11):866–869. DOI: 10.1016/S1995-7645(11)60210-1.
10. Singh S. K., Kumar Y., Kumar S., Sharma V. K., Dua K., Samad A. Antimicrobial evaluation of mangiferin and its synthesized analogues. *Indian J Pharm Sci*. 2009;71(3):328–331. DOI: 10.4103/0250-474X.56023.
11. Popov V. I. ChemicPen. Certificate of official registration of a software № 2005612073. Rospatent. 2005.
12. Miličević A., Šinko G. Use of connectivity index and simple topological parameters for estimating the inhibition potency of acetylcholinesterase. *Saudi Pharm J*. 2022;30(4):369–376. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.01.025.
13. Marukhlenko A. V., Morozova, M. A., Mbarga, A. M. J., Antipova N. V., Syroeshkin A. V., Podoprigora, I. V., Maksimova T. V. Chelation of Zinc with Biogenic Amino Acids: Description of Properties Using Balaban Index, Assessment of Biological Activity on Spirostomum Ambiguum Cellular Biosensor, Influence on Biofilms and Direct Antibacterial Action. *Pharmaceuticals*. 2022;15:979. DOI: 10.3390/ph15080979.
14. Popov V. I. ChemicDescript. Certificate of official registration of a software № 2003612305. Rospatent. 2003.
15. Hadda T. B., Rastija V., AlMalki F., Titi A., Touzani R., Mabkhot Y. N., Khalid S., Zarrouk A., Siddiqui B. S. Petra/Osiris/Molinspiration and molecular docking analyses of 3-hydroxy-indolin-2-one derivatives as potential antiviral agents. *Current Computer-Aided Drug Design*. 2021;17(1):123–133. DOI: 10.2174/1573409916666191226110029.
16. Yao H., Xie Q., He Q., Zeng L., Long J., Gong Y., Li X., Li X., Liu W., Xu Z., Wu H., Zheng C., Gao Y. Pretreatment with Panaxatriol Saponin Attenuates Mitochondrial Apoptosis and Oxidative Stress to Facilitate Treatment of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury via the Regulation of Keap1/Nrf2 Activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022:9626703. DOI: 10.1155/2022/9626703.
17. Carmichael N., Day P. J. R. Cell Surface Transporters and Novel Drug Developments. *Front Pharmacol*. 2022;13:852938. DOI: 10.3389/fphar.2022.852938.
18. Madkhali O. A. Perspectives and Prospective on Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Molecules*. 2022;27(5):1543. DOI: 10.3390/molecules27051543.
19. Hamdy N. M., Eskander G., Basalious E. B. Insights on the Dynamic Innovative Tumor Targeted-Nanoparticles-Based Drug Delivery Systems Activation Techniques. *Int J Nanomedicine*. 2022;17:6131–6155. DOI: 10.2147/IJN.S386037.
20. Morozova M. A., Tumasov V. N., Kazimova I. V., Maksimova T. V., Uspenskaya E. V., Syroeshkin A. V. Second-order scattering quenching in fluorescence spectra of natural humates as a tracer of formation stable supramolecular system for the delivery of poorly soluble antiviral drugs on the example of mangiferin and favipiravir. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):767. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040767.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-34-43
УДК 546.23:616-006.04

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Применение наночастиц селена в онкологии (обзор)

Е. А. Духновский✉

Институт биохимической технологии и нанотехнологии РУДН (ИБХТН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 10/2

✉ **Контактное лицо:** Духновский Евгений Анатольевич. **E-mail:** eadukh@mail.ru

ORCID: Е. А. Духновский – https://orcid.org/0000-0002-5353-7739.

Статья поступила: 26.04.2022 **Статья принята в печать:** 07.04.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. За последнее время под влиянием стремительного развития нанотехнологий, все большее внимание к использованию в биомедицинских целях, в частности для лечения онкологических заболеваний, привлекают наночастицы селена благодаря своим особым физико-химическим свойствам. В обзоре рассмотрены наночастицы селена, которые широко исследуются в области онкологии.

Текст. Данный обзор посвящен анализу научной литературы по исследованию противораковой активности наночастиц селена в отношении клеточных линий рака человека, а также по исследованию их в качестве системы доставки противоопухолевых препаратов. Кроме этого, обсуждаются механизмы противоопухолевой активности наночастиц селена в отношении злокачественных новообразований.

Заключение. В результате проведенного анализа литературных данных установлено, что наночастицы селена демонстрируют весьма неплохое противоопухолевое действие в отношении различных клеточных линий рака человека. Показано, что противоопухолевая активность наночастиц селена преимущественно связана с индукцией внешних и внутренних сигнальных путей апоптоза, который приводит к гибели раковых клеток. Также наночастицы селена являются перспективными системами для доставки разных противоопухолевых препаратов, обеспечивая высокую эффективность и биодоступность лекарственных средств в опухолевые клетки, а также низкую токсичность в отношении здоровых клеток.

Ключевые слова: наночастицы селена, противораковая активность, система доставки лекарств, цитотоксичность, апоптоз

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

Вклад авторов. Автор участвовал в анализе научной литературы, написании и редактировании статьи.

Благодарность. Публикация подготовлена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Российского университета дружбы народов.

Для цитирования: Духновский Е. А. Применение наночастиц селена в онкологии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):34–43. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-34-43

Application of Selenium Nanoparticles in Oncology (Review)

Evgeny A. Dukhnovsky✉

Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology, RUDN University, 10/2, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Evgeny A. Dukhnovsky. **E-mail:** eadukh@mail.ru

ORCID: Evgeny A. Dukhnovsky – https://orcid.org/0000-0002-5353-7739.

Received: 26.04.2022 **Revised:** 07.04.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Due to the rapid development of nanotechnology, selenium nanoparticles (NPs) have recently attracted much attention due to their unique physical and chemical properties for biomedical applications, in particular for the treatment of oncological diseases. The review considers the selenium nanoparticles, which are widely studied in the field of oncology.

Text. This review is devoted to the analysis of scientific literature on the anticancer activity of selenium nanoparticles against human cancer cell lines, as well as the application of these nanoparticles as a drug delivery system. Besides, the antitumor mechanisms of selenium nanoparticles against malignant neoplasms are discussed.

Conclusion. According to the results of literary data analysis, it was found that selenium nanoparticles exhibit a good antitumor effect against various human cancer cell lines. It is shown that the antitumor activity of selenium nanoparticles is mainly related to activation of the extrinsic and intrinsic signaling pathways of apoptosis leading to cancer cell death. Also, selenium nanoparticles are promising systems for delivery of various anticancer drugs, providing high efficiency, bioavailability of drugs in tumor cells and minimizing toxicity to healthy cells.

Keywords: selenium nanoparticles, anticancer activity, drug delivery system, cytotoxicity, apoptosis

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 analysis of scientific literature data, writing and editing the article.

Acknowledgment. This publication has been prepared with the support of the Peoples' Friendship University of Russia Strategic Academic Leadership Program.

For citation: Dukhnovsky E. A. Application of selenium nanoparticles in oncology. *Drug development & registration*. 2023;12(2):34–43. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-34-43

© Духновский Е. А., 2023
© Dukhnovsky E. A., 2023

ВВЕДЕНИЕ

За счет наноразмерности, высокого отношения поверхности к объему, а также возможности модификации поверхности, одним из эффективных и актуальных подходов в противоопухолевой терапии является применение наночастиц (НЧ) [1–3]. Они нашли широкое применение в диагностике и химиотерапии злокачественных новообразований и имеют некоторые значительные преимущества по сравнению с другими противоопухолевыми агентами [4–6]. Часто химиотерапия традиционными цитостатическими препаратами затрагивает, кроме опухолевых клеток, здоровые и с помощью наносистем можно уменьшить побочные эффекты, возникающие при ее проведении [7]. Кроме того, системы доставки лекарств на основе нанообъектов имеют контролируемые фармакокинетические параметры, такие как клиренс и объем распределения [8].

Известно, что селен является важным и незаменимым микроэлементом, необходимым для нормальной работы таких органов, как сердце, печень, поджелудочная железа [9]. Дефицит селена в организме человека может приводить к развитию многих заболеваний, включая риск развития рака [10]. В качестве профилактики рекомендуется ежедневно принимать различные добавки селена в дозе от 55 мкг [11]. Так, в одном из клинических исследований [12] сообщается о том, что при приеме дозы 200 мкг добавок селена заболеваемость колоректальным раком снижается на 54 %, раком простаты на 50 %, а раком легких на 30 %.

В настоящее время активно проводятся исследования по изучению противоопухолевого действия НЧ селена, а также по использованию их в роли наноносителя. В целом, как показывают исследования, НЧ селена обеспечивают хорошую биодоступность лекарственных средств внутри опухолевых клеток [13, 14], высокую биологическую активность [15, 16], а также более низкую токсичность в отношении нормальных клеток [17]. В связи с этим, НЧ селена могут иметь неплохие перспективы для дальнейшего использования в области онкологии и привлечь внимание со стороны многих исследователей.

В данной обзорной статье рассмотрена противораковая активность НЧ селена в отношении различных клеточных линий опухолей, механизмы противоопухолевой активности НЧ селена**,** а также представлен анализ исследований по применению этих НЧ в качестве системы доставки противоопухолевых препаратов.

Противораковая активность наночастиц селена

Селен обладает хорошей антиоксидантной [18, 19], антидиабетической [20, 21], противовоспалительной [22, 23], а также при высоких дозах противораковой активностью [24, 25]. В чистом виде селен встречается крайне редко. Как правило, он находится в сочетании с другими элементами [26, 27]. Каждая форма селена обладает разнообразными биологическими свойствами и механизмом действия [28, 29]. Известно, что селен положительно влияет на уменьшение опухолей за счет различных механизмов, таких как индукция апоптоза [30], уменьшение повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [31], усиление иммунного ответа [32], антиоксидантные свойства [33], противовоспалительные свойства [34], блокирование передачи сигнальных путей белков [35] и изменение метилирования ДНК генов-супрессоров опухоли [36].

Однако селену в неорганических (например, селенит) или органических (селеноцистеин, селенометионин) формах ввиду низкого терапевтического индекса накладываются значительные ограничения в клинической практике, в частности для химиотерапии рака. Среди таких ограничений можно отметить контроль концентрации селена в плазме крови, поскольку отклонения от оптимальной дозы могут приводить к цитотоксичности в отношении нормальных клеток или низкому терапевтическому эффекту [24, 37].

Поэтому в настоящий момент более эффективной и безопасной формой считаются НЧ селена, обладающие более низкой токсичностью, а также высокой степенью всасывания в кровоток [16, 38, 39]. Однако стоит отметить, что на данный момент ни одна из форм селена не является клинически зарегистрированной основой для создания противоопухолевого препарата, так как существуют противоречивые и неоднозначные результаты между клиническими, эпидемиологическими и лабораторными исследованиями [40, 41].

Противоопухолевое действие НЧ селена исследуется в отношении различных видов рака, чаще всего при раке предстательной железы [42, 43], груди [44, 45], толстой кишки [46, 47], а также легких [48] и печени [49, 50, 51].

Так, в исследовании *in vitro* [42] НЧ селена размером 12 нм, стабилизированные бычьим сывороточным альбумином, ингибируют рост клеточной линии рака простаты человека LNCaP за счет апоптоза, активированного каспазами. Выявлено, что жизнеспособность клеток LNCaP после 24 и 48-часовой обработки НЧ селена при максимальной дозе 100 мкМ составляет около 70 и 36 % соответственно. Авторы исследования L. Kong и др. считают, что регуляция транскрипции рецептора андрогенов и процесса деградации его белка являются основными механизмами подавления рака простаты с использованием НЧ селена [42].

T. Chen и др. [52] сообщают о том, что сферические НЧ селена с размером в диапазоне от 20 до 50 нм, модифицированные полисахаридами сине-зеленой микроводоросли *Spirulina Platensis*, ингиби-

руют рост клеток меланомы человека A375, а также увеличивают клеточное поглощение. Ингибирующее действие НЧ сопровождается индукцией апоптоза, который приводит к остановке клеточного цикла, транслокации фосфатидилсерина, фрагментации ДНК и конденсации хроматина. Покрытие поверхности НЧ селена природными полисахаридами значительно усиливает их способность проникать в клетки меланомы. Так, после 72 ч обработки НЧ селена с покрытием наблюдается высокая противораковая активность при полумаксимальной ингибирующей концентрации IC_{50} равной 7,94 мкМ. При отсутствии же покрывающего агента НЧ селена демонстрируют гораздо более низкий цитотоксический эффект по отношению к раковым клеткам при значении IC_{50} равном около 243,9 мкМ [52].

В другом исследовании *in vitro* E. G. Varlamova и др. [53] показано, что немодифицированные НЧ селена средним размером 100 нм в зависимости от концентрации оказывают различное воздействие на раковые клетки четырех линий человека: MCF-7 (аденокарцинома груди), Caco-2 (колоректальная аденокарцинома), A-172 (глиобластома), DU-145 (карцинома предстательной железы). Установлен дозозависимый противораковый эффект НЧ селена в отношении всех четырех клеточных линий, при этом при самой высокой дозе 10 мкг/мл происходит снижение жизнеспособности примерно на 50 %. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени выявлена повышенная экспрессия мРНК генов маркеров апоптоза при увеличении концентрации НЧ селена в раковых клетках, кроме клеточной линии Caco-2. Это свидетельствует о том, что НЧ селена участвуют в активации адаптивных и проапоптотических путей UPR (ответ на неправильно свернутые белки) апоптоза при стрессе эндоплазматического ретикулума, который возникает при обработке раковых клеток НЧ [53].

K. K. Vekariya и др. [45] показали, что НЧ селена размером в диапазоне от 40 до 90 нм, стабилизированные полисахаридом альгинатом натрия, при концентрации 0,4 мг/кг ингибируют рост раковых клеток молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231. Также в результате исследования наблюдается замедление синтеза ДНК, РНК и белков. При этом авторы предполагают, что НЧ селена способны изменять экспрессию множества функциональных биомолекул, включая некодирующую РНК.

J. Tian и др. [48] показали, что НЧ селена средним размером 24 нм, стабилизированные бычьим сывороточным альбумином, в комбинации с лучевой терапией обладают более эффективным воздействием на раковые клетки легких человека A549 и NCI-H23 по сравнению с их действием по отдельности. Установлено, что при увеличении концентрации НЧ селена до 20 мкг/мл происходит замедление пролиферации раковых клеток. Также в ходе исследования отмечается ингибирование миграции и инвазии клеток рака легкого [48]. Таким образом, возможно использование НЧ селена в качестве радиосенсибилизатора для лучевой терапии рака легких.

S. Zeebaree и др. [51] изучали противораковое действие НЧ селена средним размером 21 нм, полученных с использованием экстракта листьев *Asteriscus graveolens*, на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. В результате установлен дозозависимый цитотоксический эффект воздействия НЧ селена в отношении клеток HepG2 (IC_{50} 3,98 мкг/мл). Методом проточной цитометрии также выявлено нарушение ДНК, остановка клеточного цикла и апоптоз в раковых клетках [51].

Результаты и данные всех вышеприведенных исследований по применению НЧ селена в качестве противоопухолевого агента представлены в таблице 1.

Механизм противоопухолевой активности наночастиц селена

Молекулярный механизм, путем которого селен в форме НЧ может индуцировать уменьшение клеток опухоли, полностью не раскрыт. Предполагается, что НЧ селена взаимодействуют с клетками опухоли через рецептор-опосредованный эндоцитоз, при котором атомы селена в НЧ после связывания на поверхности опухолевых клеток с рецепторами поглощаются ими (рисунок 1) [54].

За счет кислой микросреды опухолевых клеток, pH которой обычно находится в диапазоне 6,4–7 [55, 56], происходит развитие прооксидантных свойств НЧ селена, активирующих продукцию свободных радикалов в виде активных форм кислорода (АФК) в злокачественных клетках. Данные свободные радикалы могут способствовать повреждению мембраны митохондрий, а также приводить к окислительному стрессу эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Вследствие этого наблюдается активация сигнальных путей клеточного стресса, таких как ядерный фактор κB (NF-κB), митоген-активируемая протеинкиназа / регулируемая внеклеточным сигналом протеинкиназа (MAPK/ERK), Wnt/β-катенин, фосфоинозитид-3-киназа / протеинкиназа B / мишень рапамицина млекопитающих (PI3K/AKT/mTOR) и различные пути апоптоза. В результате протекания клеточных процессов происходит повреждение структуры ДНК, которое приводит к дальнейшей остановке клеточного цикла и непосредственно к уничтожению раковых клеток [54, 57].

Кроме индукции апоптоза, гибели раковых клеток при воздействии НЧ селена могут способствовать и другие механизмы, такие как аутофагия и некроптоз (некроз). При этом необходимо отметить, что на активацию разных механизмов может влиять метод получения НЧ селена и их параметры (размер, покрывающий агент, структура (расположение атомов в решетке) [43].

Таблица 1. **Наночастицы селена, обладающие противораковой активностью**

Table 1. **Anticancer activity of selenium nanoparticles**

Клеточная линия человека Human cell line	**Размер (нм) и форма наночастиц** Size (nm) and shape of NPs	**Способ получения наночастиц** Synthesis method of NPs	**Результат** Results	**Ссылка** Reference
Предстательной железы LNCaP Prostate LNCaP	12; сферические 12; spherical	Восстановление селенита натрия глутатионом в присутствии стабилизатора бычьего сывороточного альбумина Reduction of sodium selenite by glutathione in the presence of bovine serum albumin as stabilizing agent	После 24 и 48-часовой обработки НЧ селена при дозе 100 мкМ жизнеспособность клеток составляет около 70 и 36 % After 24 and 48 hours of treatment with selenium NPs at dose of 100 μM, cell viability is about 70 % and 36 %	[42]
Меланомы A375 Melanoma A375	20-50; сферические 20-50; spherical	Восстановление селенита натрия аскорбиновой кислотой в присутствии стабилизатора полисахаридов сине-зеленой микроводоросли *Spirulina Platensis* Reduction of sodium selenite by ascorbic acid using polysaccharides from the blue-green microalgae *Spirulina platensis* as stabilizing agent	Покрытие поверхности НЧ селена природными полисахаридами значительно усиливает противораковую активность Surface coating of selenium NPs with natural polysaccharides significantly enhances the anticancer activity	[52]
Аденокарциномы груди (MCF-7). Колоректальной аденокарциномы (Caco-2). Глиобластомы (A-172). Карциномы предстательной железы (DU-145) Breast adenocarcinoma (MCF-7), Colon adenocarcinoma (Caco-2). Glioblastoma (A172), Prostate carcinoma (DU-145)	100; сферические 100; spherical	Лазерная абляция в жидкости Laser ablation in liquid	Во всех четырех линиях происходит снижение жизнеспособности раковых клеток с увеличением концентрации НЧ селена Cell viability was decreased with an increase in the dose of selenium NPs in four cancer cell lines	[53]
Молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 Breast MCF-7, MDA-MB-231	40-90; сферические 40-90; spherical	Восстановление селенистой кислоты глутатионом в присутствии стабилизатора альгината натрия Reduction of selenous acid by glutathione with sodium alginate as stabilizing agent	Ингибирование роста раковых клеток при дозе 0,4 мг/кг НЧ селена, а также замедление синтеза ДНК, РНК и белков Inhibition of cancer cell growth at a dose of 0.4 mg/kg of selenium NPs, as well as slowing down DNA, RNA and proteins synthesis	[45]
Аденокарциномы легких A549 и NCI-H23 Lung adenocarcinoma A549 and NCI-H23	24; сферические 24; spherical	Восстановление селенита натрия глутатионом в присутствии стабилизатора бычьего сывороточного альбумина Reduction of sodium selenite by glutathione in the presence of bovine serum albumin as stabilizing agent	Ингибирование пролиферации, миграции и инвазии раковых клеток Inhibition of proliferation, migration and invasion of cancer cells	[48]
Гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 Hepatocellular carcinoma HepG2	21; сферические 21; spherical	Восстановление селенистой кислоты экстрактом листьев *Asteriscus graveolens* Reduction of selenous acid using *Asteriscus graveolens* leaf extract	Высокий цитотоксический эффект при IC_{50} 3,98 мкг/мл High cytotoxic effect with an IC_{50} value of 3,98 μg/mL	[51]

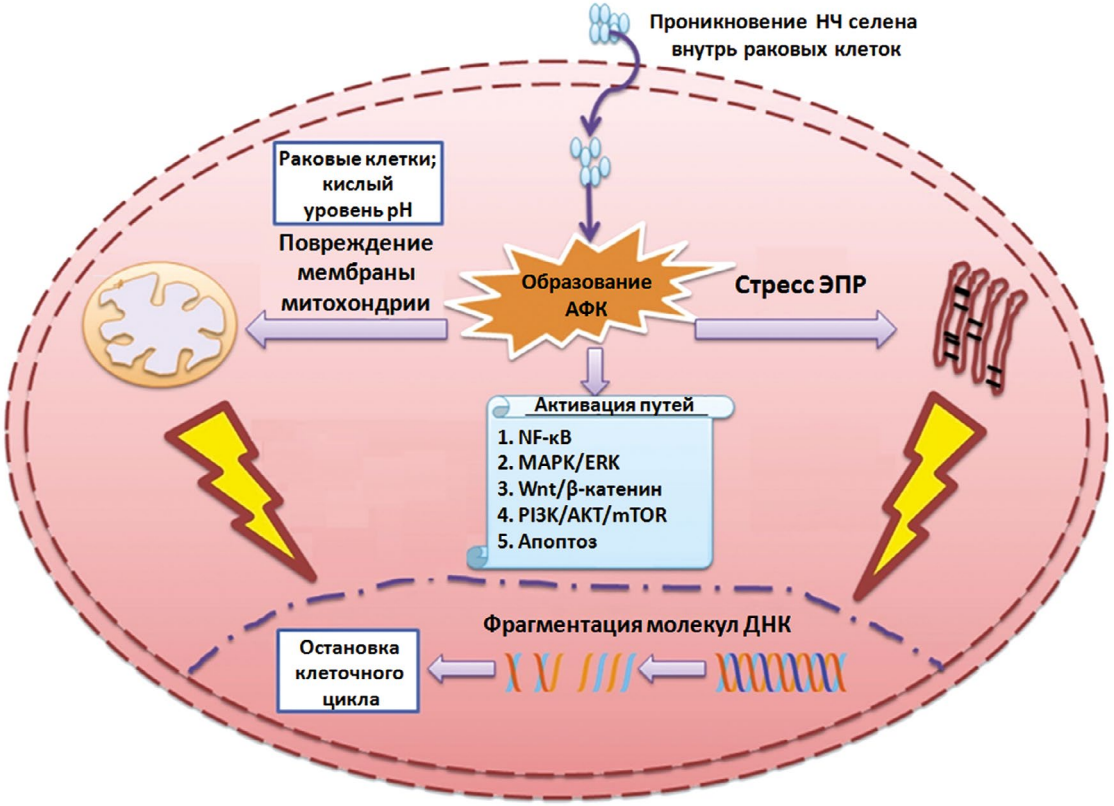


Рисунок 1. **Предполагаемый механизм противоопухолевой активности наночастиц селена [54]**

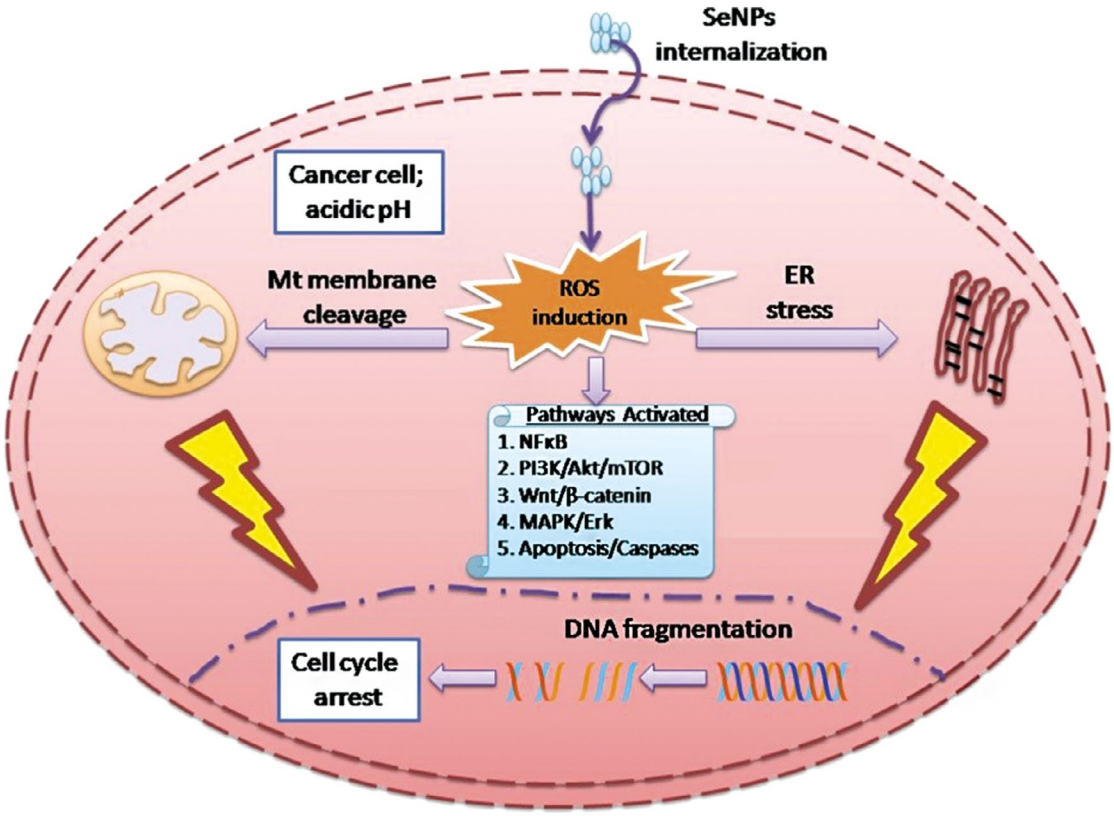


Figure 1. **The possible antitumor mechanism of selenium nanoparticles [54]**

Например, авторами G. Huang и др. с использованием модели трансфекции плазмиды pEGFP-LC3 выявлено, что НЧ селена размером 84 нм, конъюгированные с полисахаридами, извлеченными из гриба *Pleurotus tuber-regium* (PTR), способны активировать сигнальные пути, связанные с белком аутофагии Beclin-1 на клеточной линии рака толстой кишки HCT-116. PTR-НЧ селена запускают процесс апоптоза через активацию аутофагии в клетках, а также остановку внутриклеточной фазы G2/M, что в результате приводит к гибели раковых клеток (рисунок 2) [46].

В работе P. Sonkusre и др. [43] показано, что биогенные НЧ селена размером 110 нм, синтезированные из штамма почвенных бактерий *Bacillus licheniformis JS2*, при концентрации 2 мкг/мл вызывают фактор некроза опухоли-α и регуляторный фактор интерферона 1, индуцированные некрозом на клеточной линии аденокарциномы предстательной железы PC-3.

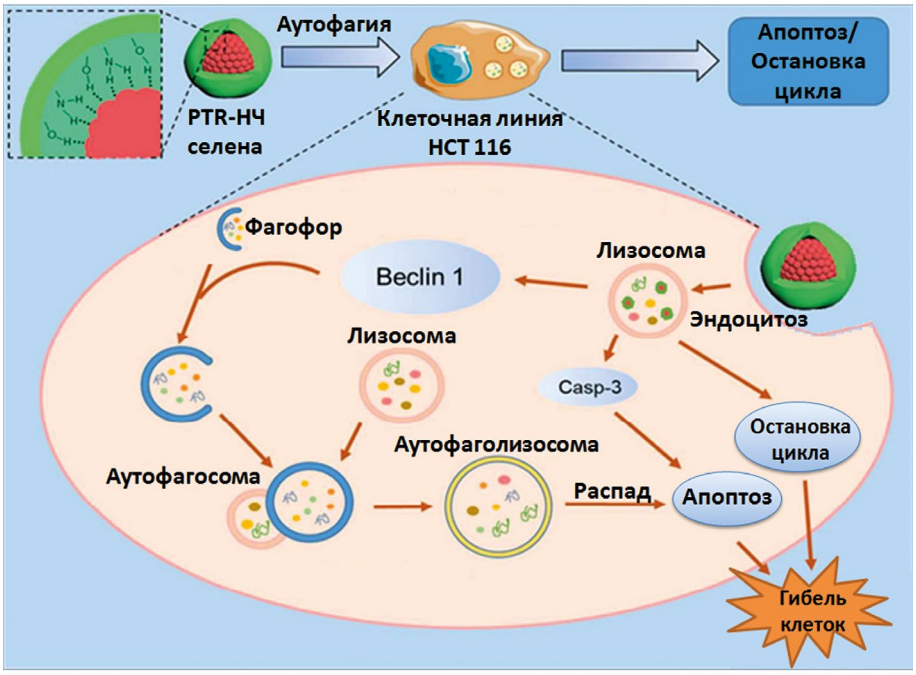


Рисунок 2. **Механизм противораковой активности наночастиц селена на клетках HCT-116 [46]**

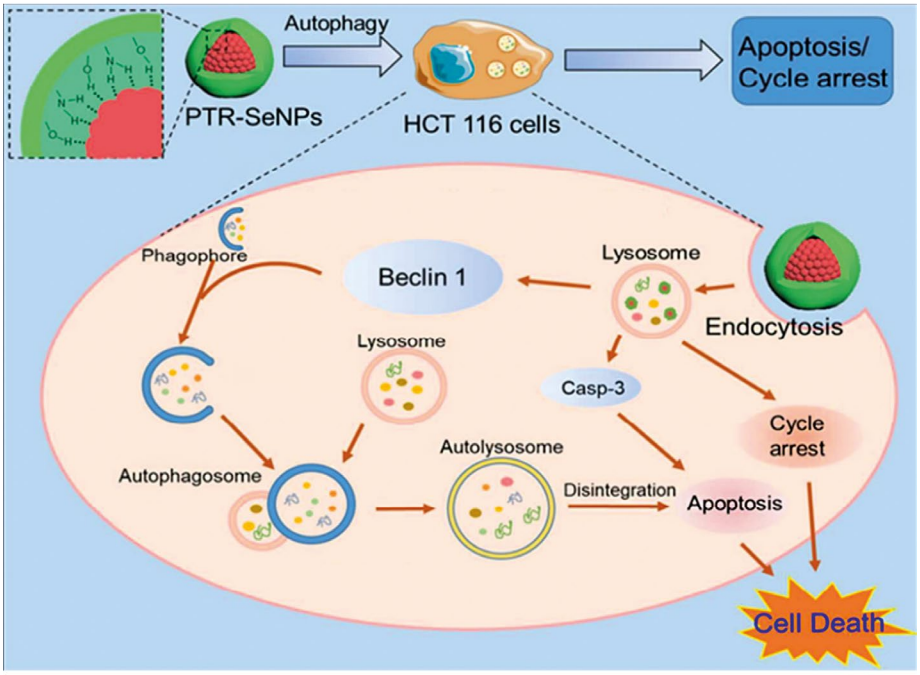


Figure 2. **Mechanism of anticancer activity of selenium nanoparticles on cell line HCT-116 [46]**

Наночастицы селена в качестве системы доставки противоопухолевых препаратов

Носители лекарственных средств должны обеспечивать низкую токсичность, высокую биосовместимость и биодоступность, а также стабильность при физиологических состояниях для безопасного применения в биомедицинских целях, в частности для лечения онкологических заболеваний [58, 59]. Данным требованиям может отвечать селен в качестве наноносителя [60-63], который активно исследуется для доставки разных противоопухолевых препаратов, таких как доксорубицин (ДОКС) [13, 64, 65], цисплатин (цис-ДДП) [14], 5-фторурацил (5-ФУ) [66, 67], оридонин (ОРИ) [68], иринотекан (ИРИ) [69]

Y. Huang и др. изучали систему доставки ДОКС на основе сферических НЧ селена размером 130 нм, конъюгированных с белком плазмы крови трансферрином, на клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7. В ходе исследования НЧ селена получены восстановлением селенита натрия аскорбиновой кислотой с конъюгацией трансферрина (ТФ) и хитозана (ХТЗ) в виде конечной четырехслойной структуры (ТФ-ХТЗ-ДОКС-НЧ селена). В результате работы наблюдалось повышенное селективное поглощение ДОКС благодаря использованию ТФ в качестве таргетного лиганда. Установлено, что такие процессы клеточного поглощения, как клатрин-опосредованный эндоцитоз и эндоцитоз, опосредованный липидными рафтами, участвуют в интернализации НЧ в раковых клетках. Исследованием *in vivo* на модели MCF-7 ксенотрансплантата мышей подтвержден индуцированный ДОКС апоптоз с участием внутренних и внешних путей, а также задержка роста раковых клеток [13].

W. Zheng и др. разработали систему двойной доставки малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты (миРНК) и цис-ДДП на основе сферических НЧ селена размером 80 нм, покрытых полиамидоаминовым дендримером (ПАМАМ) 5 поколения. Данную систему доставки авторы рассматривали на резистентных клетках рака легкого A549/DDP, чтобы исследовать преодоление множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). НЧ селена получали восстановлением селенита натрия тетрагидридоборатом натрия. Отмечается, что миРНК и цис-ДДП в раковых клетках хорошо взаимодействуют, проявляя при этом синергетический эффект. Вестерн-блоттинг анализ выявил снижение экспрессии белков МЛУ, а именно Р-гликопротеина и MRP1 после обработки раковых клеток комплексом ПАМАМ-НЧ селена-цис-ДДП-миРНК. Как предполагается авторами, преодоление лекарственной устойчивости при использовании данного комплекса возможно за счет активации апоптоза и сигнальных путей MAPK/ERK и PI3K/Akt/mTOR, а также остановки клеточного цикла в фазе G1 [14]. Исходя из этого, применение ПАМАМ-НЧ селена может стать основой для преодоления МЛУ в раковых клетках.

W. Liu и др. исследовали систему доставки 5-ФУ на основе сферических НЧ селена средним размером 70 нм на пяти разных линиях раковых клеток человека: A375 (меланома), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), Colo 201 (аденокарцинома толстой кишки) и PC-3 (карцинома простаты). НЧ селена получали восстановлением селенита натрия аскорбиновой кислотой. В диапазоне значений полумаксимальной ингибирующей концентрации IC_{50} 6,2-14,4 мкМ выявлена чувствительность всех пяти линий раковых клеток к системе 5-ФУ-НЧ селена. В результате исследования наблюдалась значительная селективность 5-ФУ-НЧ селена в отношении опухолевых клеток, а также ингибирование их роста. Методом флуориметрии на клетках A375 обнаружено, что 5-ФУ-НЧ селена индуцируют апоптоз, преимущественно вызванный с участием его внутренних путей (активацией каспазы-9) и образованием АФК [66]. Данное исследование демонстрирует возможность использования системы 5-ФУ-НЧ селена в роли химиотерапевтического агента для лечения рака.

В работе J. Pi и др. разработана система доставки ОРИ на основе сферических НЧ селена средним размером 70 нм, конъюгированных с пептидом GE11, для изучения противораковой эффективности на клеточных линиях рака пищевода человека KYSE150 и EC9706. Получение НЧ селена осуществлялось восстановлением селенита натрия аскорбиновой кислотой в присутствии ХТЗ в качестве стабилизатора. После обработки раковых клеток GE11-ОРИ-НЧ селена наблюдалось ингибирование их пролиферации, а также селективное клеточное поглощение с высокой экспрессией рецептора эпидермального фактора роста, который являлся противоопухолевой мишенью нацеливания пептида GE11. Также проведено авторами исследование *in vivo* на модели ксенотрансплантата KYSE-150 мышей BALB/c, которым внутривенно вводили инъекции GE11-ОРИ-НЧ селена в хвост в течение 15 дней при концентрациях 2,5, 5 и 7,5 мг/кг. Показано, что обработка мышей GE11-ОРИ-НЧ селена приводит к ингибированию роста клеток рака пищевода за счет антиангиогенеза, а также к активации иммунной системы путем увеличения продукции фактора некроза опухоли-α и интерлейкина-2 в сыворотке крови [68]. Таким образом, исследование демонстрирует эффективное применение GE11-ОРИ-НЧ селена в качестве системы доставки для лечения рака пищевода.

F. Gao и др. изучали систему доставки ИРИ на основе сферических НЧ селена средним размером 20 нм на клеточной линии илеоцекальной аденокарциномы человека HCT-8. НЧ селена получали восстановлением селенита натрия глутатионом. Результа-

ты исследования после 48 ч обработки показали, что НЧ селена в сочетании с ИРИ при дозе 50 мкМ эффективно увеличивают цитотоксичность в отношении опухолевых клеток НСТ-8 и снижают их жизнеспособность до 47 %. Для оценки токсичности препаратов проведено исследование *in vivo* на модели ксенотрансплантата НСТ-8 мышей линии BABL/c, которым перорально вводили ИРИ-НЧ селена в течение 28 дней в дозе 4 мг/кг. Как показал патологический, гематологический и биохимический анализ крови, значительных отклонений от нормы в группе мышей, получавших ИРИ-НЧ селена, не наблюдалось по сравнению с группами, получавшими только ИРИ или НЧ селена [69]. Из исследования следует, что ИРИ-НЧ селена являются многообещающими кандидатами для лечения рака с более усиленным терапевтическим эффектом и низкой токсичностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время активно проводятся исследования по изучению противоопухолевой активности на основе НЧ селена, которые могут стать хорошими кандидатами для дальнейшего применения в качестве химиотерапевтического агента против различных видов рака.

Как показал ряд исследований, за счет активации апоптоза, остановки клеточного цикла, аутофагии и некроза, НЧ селена способны индуцировать уменьшение злокачественных новообразований. Кроме этого, в результате исследований выявлено, что покрытие поверхности НЧ селена природными полисахаридами значительно усиливает их способность проникать в раковые клетки и проявлять противоопухолевый эффект.

Также показано, что НЧ селена широко исследуются в качестве носителя противоопухолевых препаратов, обеспечивая высокое селективное поглощение в отношении опухолевых клеток и уменьшение побочных эффектов лекарственных средств в отношении здоровых тканей и органов. Благодаря положительным результатам, НЧ селена являются многообещающей стратегией для лечения онкологических заболеваний, однако необходимы дальнейшие исследования для анализа их влияния на живые системы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Libutti S. K., Paciotti G. F., Byrnes A. A., Alexander H. R., Gannon W. E., Walker M., Seidel G. D., Yuldasheva N., Tamarkin L. Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF nanomedicine. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(24):6139–6149. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-10-0978.
2. Wang-Gillam A., Hubner R. A., Siveke J. T., Von Hoff D. D., Belanger B., de Jong F. A., Mirakhur B., Chen L.-T. NAPOLI-1 phase 3 study of liposomal irinotecan in metastatic pancreatic cancer: Final overall survival analysis and characteristics of long-term survivors. *European Journal of Cancer*. 2019;108:78–87. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.12.007.
3. Chao J., Lin J., Frankel P., Clark A. J., Wiley D. T., Garmey E., Fakih M., Lim D., Chung V., Luevanos E., Eliasof S., Davis M. E., Yen Y. Pilot trial of CRLX101 in patients with advanced, chemotherapy-refractory gastroesophageal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2017;8(6):962–969. DOI: 10.21037/jgo.2017.08.10.
4. Zhao Z., Ukidve A., Kim J., Mitragotri S. Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell*. 2020;181(1):151–167. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.001.
5. Sanna V., Sechi M. Therapeutic Potential of Targeted Nanoparticles and Perspective on Nanotherapies. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2020;11:1069–1073. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.0c00075.
6. Ince M., Ince O. K., Ondrasek G., editors. Biochemical Toxicology: Heavy Metals and Nanomaterials. Biochemical Toxicology – Heavy Metals and Nanomaterials. London: IntechOpen; 2020. 230 p. DOI: 10.5772/intechopen.90928.
7. Senapati S., Mahanta A. K., Kumar S., Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018;3(7):1038. DOI: 10.1038/s41392-017-0004-3.
8. Singh A. K., editor. Engineered Nanoparticles: Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity. Boston: Academic Press; 2016. 544 p. DOI: 10.1016/C2013-0-18974-X.
9. Malyugina S., Skalickova S., Skladanka J., Slama P., Horky P. Biogenic Selenium Nanoparticles in Animal Nutrition: A Review. *Agriculture*. 2021;11(12):1244. DOI: 10.3390/agriculture11121244.
10. Kazi Tani L. S., Dennouni-Medjati N., Toubhans B., Charlet L. Selenium Deficiency—From Soil to Thyroid Cancer. *Applied Sciences*. 2020;10(5):5368. DOI: 10.3390/app10155368.
11. Manevska N., Stojanoski S., Makazlieva T. Selenium Treatment Effect in Auto-Immune Hashimoto Thyroiditis in Macedonian Population. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2019;9:22–28. DOI: 10.14740/jem551.
12. Reid M., Duffield-Lillico A., Slate E., Natarajan N., Turnbull B., Jacobs E., Combs G., Alberts D., Clark L., Marshall J. The Nutritional Prevention of Cancer: 400 Mcg Per Day Selenium Treatment. *Nutrition & Cancer*. 2008;60(2):155–163. DOI: 10.1080/01635580701684856.
13. Huang Y., He L., Liu W., Fan C., Zheng W., Wong Y.-S., Chen T. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2013;34(29):7106–7116. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.067.
14. Zheng W., Cao C., Liu Y., Yu Q., Zheng C., Sun D., Ren X., Liu J. Multifunctional polyamidoamine-modified selenium nanoparticles dual-delivering siRNA and cisplatin to A549/DDP cells for reversal multidrug resistance. *Acta Biomaterialia*. 2015;11:368–380. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.08.035.
15. Kokila K., Elavarasan N., Sujatha V. Diospyros montana leaf extract-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their biological applications. *New Journal of Chemistry*. 2017;41(15):7481–7490. DOI: 10.1039/c7nj01124e.
16. Spyridopoulou K., Aindelis G., Pappa A., Chlichlia K. Anticancer Activity of Biogenic Selenium Nanoparticles: Apoptotic and Immunogenic Cell Death Markers in Colon Cancer Cells. *Cancers*. 2021;13:5335. DOI: 10.3390/cancers13215335.
17. Gao X., Li X., Mu J., Ho C.-T., Su J., Zhang Y., Lin X., Chen Z., Li B., Xie Y. Preparation, physicochemical characterization, and anti-proliferation of selenium nanoparticles stabilized by Polyporus umbellatus polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;152:605–615. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.199.
18. Zendedel A., Delavari S., Ahmadvand H., Ghanadi K., Gholami M. Effects of Selenium on Antioxidant Activity and Recovery From Sciatic Nerve Ischemia–Reperfusion in Adult Rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2015;17(12):e5200. DOI: 10.17795/zjrms-5200.
19. Zaki M. S. A., Haidara M. A., Heitham M., Asim A., Massoud E. E. S., Eid R. A. Antioxidant Activity of Selenium on Bisphenol-Induced Apoptosis and Testicular Toxicity of Albino Rats. *International Journal of Morphology*. 2020;38(6):1786–1796. DOI: 10.4067/s0717-95022020000601786.
20. Zhao D., Zhu H., Gao F., Z. Qian, Mao W., Yin Y., Tan J., Chen D. Antidiabetic effects of selenium-enriched Bifidobacterium lon-

gum DD98 in type 2 diabetes model of mice. *Food & Function*. 2020;11(7):6528–6541. DOI: 10.1039/d0fo00180e.
21. Liu Y., Sun J., Rao S., Su Y., Li J., Li C., Xu S., Yang Y. Antidiabetic activity of mycelia selenium-polysaccharide from Catathelasma ventricosum in STZ-induced diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;62:285–291. DOI: 10.1016/j.fct.2013.08.082.
22. Liu Y., Qiu C., Li W., Mu W., Li C., Guo M. Selenium Plays a Protective Role in Staphylococcus aureus-Induced Endometritis in the Uterine Tissue of Rats. *Biological Trace Element Research*. 2016;173(2):345–353. DOI: 10.1007/s12011-016-0659-6.
23. Chen Y.-C., Sosnoski D. M., Gandhi U. H., Novinger L. J., Prabhu K. S., Mastro A. M. Selenium modifies the osteoblast inflammatory stress response to bone metastatic breast cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(11):1941–1948. DOI: 10.1093/carcin/bgp227.
24. Clark L., Dalkin B., Krongrad A., et al. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *British Journal of Urology*. 1998;81(5):730–734. DOI: 10.1046/j.1464-410x.1998.00630.x.
25. Clark L. C., Cantor K. P., Allaway W. H. Selenium in forage crops and cancer mortality in U.S. counties. *Archives of Environmental & Occupational Health*. 1991;46(1):37–42. DOI: 10.1080/00039896.1991.9937427.
26. Parvaiz A., editor. Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques. Amsterdam: Elsevier; 2016. 619 p. DOI: 10.1016/C2014-0-03536-8.
27. Kieliszek M. Selenium–Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food. *Molecules*. 2019;24:1298. DOI: 10.3390/molecules24071298.
28. Weekley C. M., Harris H. H. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. *Chemical Society Reviews*. 2013;42:8870. DOI: 10.1039/c3cs60272a.
29. Yang Y., Huang F., Ren Y., Xing L., Wu Y., Li Z., Pan H., Xu C. The Anticancer Effects of Sodium Selenite and Selenomethionine on Human Colorectal Carcinoma Cell Lines in Nude Mice. *Oncology Research*. 2009;18(1):1–8. DOI: 10.3727/096504009789745647.
30. Zhang Y., Li X., Huang Z., Zheng W., Fan C., Chen T. Enhancement of cell permeabilization apoptosis-inducing activity of selenium nanoparticles by ATP surface decoration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2013;9(1):74–84. DOI: 10.1016/j.nano.2012.04.002.
31. Jung H. J., Lee J. H., Seo Y. R. Enhancement of Methyl Methanesulfonate-Induced Base Excision Repair in the Presence of Selenomethionine on p53-Dependent Pathway. *Journal of Medicinal Food*. 2009;12:340–344. DOI: 10.1089/jmf.2007.0709.
32. Ryan-Harshman M., Aldoori W. The Relevance of Selenium to Immunity, Cancer, and Infectious/Inflammatory Diseases. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*. 2005;66:98–102. DOI: 10.3148/66.2.2005.98.
33. Pourkhalili N., Hosseini A., Nili-Ahmadabadi A., Rahimifard M., Navaei-Nigjeh M., Hassani S., Baeeri M., Abdollahi M. Improvement of isolated rat pancreatic islets function by combination of cerium oxide nanoparticles/sodium selenite through reduction of oxidative stress. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2012;22(6):476–482. DOI: 10.3109/15376516.2012.673093.
34. Miroliaee A. E., Esmaily H., Vaziri-Bami A., Baeeri M., Shahverdi A. R., Abdollahi M. Amelioration of experimental colitis by a novel nanoselenium–silymarin mixture. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2011;21:200–208. DOI: 10.3109/15376516.2010.547887.
35. Christensen M. J., Nartey E. T., Hada A. L., Legg R. L., Barzee B. R. High Selenium Reduces NF-κB-Regulated Gene Expression in Uninduced Human Prostate Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*. 2007;58(2):197–204. DOI: 10.1080/01635580701328701.
36. Yu Y. P., Yu G., Tseng G., Cieply K., Nelson J., Defrances M., Zarnegar R., Michalopoulos G., Luo J.-H. Glutathione Peroxidase 3, Deleted or Methylated in Prostate Cancer, Suppresses Prostate Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Research*. 2007;67(17):8043–8050. DOI: 10.1158/0008-5472.can-07-0648.
37. Vinceti M., Wei E., Malagoli C., Bergomi M., Vivoli G. Adverse Health Effects of Selenium in Humans. *Reviews on Environmental Health*. 2001;16(4):233–251. DOI: 10.1515/reveh.2001.16.4.233.
38. Zhang J., Wang H., Yan X., Zhang L. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sciences*. 2005;76:1099–1109. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.08.015.
39. Gangadoo S., Dinev I., Willson N.-L., Moore R. J., Chapman J., Stanley D. Nanoparticles of selenium as high bioavailable and non-toxic supplement alternatives for broiler chickens. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(14):16159–16166. DOI: 10.1007/s11356-020-07962-7.
40. Vinceti M., Filippini T., Cilloni S., Crespi C. The Epidemiology of Selenium and Human Cancer. *Advances in Cancer Research*. 2017; 136:1–48. DOI: 10.1016/bs.acr.2017.07.001.
41. Collery P. Strategies for the development of selenium-based anticancer drugs. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2018;50:498–507. DOI: 10.1016/j.jtemb.2018.02.024.
42. Kong L., Yuan Q., Zhu H., Li Y., Guo Q., Wang Q., Bi X., Gao X. The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis. *Biomaterials*. 2011;32(27):6515–6522. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.032.
43. Sonkusre P., Cameotra S. S. Biogenic selenium nanoparticles induce ROS-mediated necroptosis in PC-3 cancer cells through TNF activation. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017;7(15):43. DOI: 10.1186/s12951-017-0276-3.
44. Chen F., Zhang X. H., Hu X. D., Liu P. D., Zhang H. Q. The effects of combined selenium nanoparticles and radiation therapy on breast cancer cells in vitro. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2017;46(5):937–948. DOI: 10.1080/21691401.2017.1347941.
45. Vekariya K. K., Kaur J., Tikoo K. ERα signaling imparts chemotherapeutic selectivity to selenium nanoparticles in breast cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2012;8:1125–1132. DOI: 10.1016/j.nano.2011.12.003.
46. Huang G., Liu Z., He L., Luk K.-H., Cheung S.-T., Wong K.-H., Chen T. Autophagy is an important action mode for functionalized selenium nanoparticles to exhibit anti-colorectal cancer activity. *Biomaterials Science journal*. 2018;6:2508–2517. DOI: 10.1039/c8bm00670a.
47. Spyridopoulou K., Tryfonopoulou E., Aindelis G., Ypsilantis P., Sarafidis C., Kalogirou O., Chlichlia K. Biogenic selenium nanoparticles produced by Lactobacillus casei ATCC 393 inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo. *Nanoscale Advances*. 2021;3:2516–2528. DOI: 10.1039/d0na00984a.
48. Tian J., Wei X., Zhang W., Xu A. Effects of Selenium Nanoparticles Combined With Radiotherapy on Lung Cancer Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:598997. DOI: 10.3389/fbioe.2020.598997.
49. Naidoo S., Daniels A., Habib S., Singh M. Poly-L-Lysine–Lactobionic Acid-Capped Selenium Nanoparticles for Liver-Targeted Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23:1492. DOI: 10.3390/ijms23031492.
50. Liu F., Liu H., Liu R., Xiao C., Duan X., McClements D. J., Liu X. Delivery of Sesamol Using Polyethylene-Glycol-Functionalized Selenium Nanoparticles in Human Liver Cells in Culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(10):2991–2998. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06924.
51. Zeebaree S. Y. S., Zeebaree A. Y. S., Zebari O. I. H. Diagnosis of the multiple effect of selenium nanoparticles decorated by Asteriscus graveolens components in inhibiting HepG2 cell proliferation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2020;15:100210. DOI: 10.1016/j.scp.2019.100210.
52. Yang F., Tang Q., Zhong X., Bai Y., Chen T., Zhang Y., Li Y., Zheng W. Surface decoration by Spirulina polysaccharide enhances the cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:835–844. DOI: 10.2147/ijn.s28278.
53. Varlamova E. G., Goltyaev M. V., Maltseva V. N., Turovsky E. A., Sarimov R. M., Simakin A. V., Gudkov S. V. Mechanisms of the Cytotoxic Effect of Selenium Nanoparticles in Different Human Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22:7798. DOI: 10.3390/ijms22157798.

54. Khurana A., Tekula S., Saifi M. A., Venkatesh P., Godugu C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;111:802–812. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.146.
55. Boedtkjer E., Pedersen S. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Review of Physiology*. 2020;82:103–126. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021119-034627.
56. Griffiths J. Are cancer cells acidic? *British Journal of Cancer*. 1991;64:425–427. DOI: 10.1038/bjc.1991.326.
57. Ikram M., Javed B., Raja N., Mashwani Z.-R. Biomedical Potential of Plant-Based Selenium Nanoparticles: A Comprehensive Review on Therapeutic and Mechanistic Aspects. *International Journal of Nanoscience*. 2021;16:249–268. DOI: 10.2147/ijn.s295053.
58. Veselov V. V., Nosyrev A. E., Jicsinszky L., Alyautdin R. N., Cravotto G. Targeted Delivery Methods for Anticancer Drugs. *Cancers*. 2022;14:622. DOI: 10.3390/cancers14030622.
59. Li T., Xu H. Selenium-Containing Nanomaterials for Cancer Treatment. *Cell Reports Physical Science*. 2020;1:100111. DOI: 10.1016/j.xcrp.2020.100111.
60. Wang H., Zhang J., Yu H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;42:1524–1533. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.013.
61. Shi L., Xun W., Yue W., Zhang C., Ren Y., Shi L., Wang Q., Yang R., Lei F. Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Ruminant Research*. 2011;96(1):49–52. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2010.11.005.
62. Zhang J., Wang X., Xu T. Elemental Selenium at Nano Size (Nano-Se) as a Potential Chemopreventive Agent with Reduced Risk of Selenium Toxicity: Comparison with Se-Methylselenocysteine in Mice. *Toxicological Sciences*. 2007;101:22–31. DOI: 10.1093/toxsci/kfm221.
63. Sonkusre P. Improved Extraction of Intracellular Biogenic Selenium Nanoparticles and their Specificity for Cancer Chemoprevention. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 2014;5:1000194. DOI: 10.4172/2157-7439.1000194.
64. Purohit M. P., Verma N. K., Kar A. K., Singh A., Ghosh D., Patnaik S. Inhibition of Thioredoxin Reductase by Targeted Selenopolymeric Nanocarriers Synergizes the Therapeutic Efficacy of Doxorubicin in MCF7 Human Breast Cancer Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017;9(42):36493–36512. DOI: 10.1021/acsami.7b07056.
65. Xia Y., Chen Y., Hua L., Zhao M., Xu T., Wang C., Li Y., Zhu B. Functionalized selenium nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin to improve non-small-cell lung cancer therapy. *International Journal of Nanoscience*. 2018;13:6929–6939. DOI: 10.2147/ijn.s174909.
66. Liu W., Li X., Wong Y-S., Zheng W., Zhang Y., Cao W., Chen T. Selenium Nanoparticles as a Carrier of 5-Fluorouracil to Achieve Anticancer Synergism. *ACS Nano*. 2012;6:6578–6591. DOI: 10.1021/nn202452c.
67. Abd-Rabou A. A., Shalby A. B., Ahmed H. H. Selenium Nanoparticles Induce the Chemo-Sensitivity of Fluorouracil Nanoparticles in Breast and Colon Cancer Cells. *Biological Trace Element Research*. 2018;187:80–91. DOI: 10.1007/s12011-018-1360-8.
68. Pi J., Jiang J., Cai H., Yang F., Jin H., Yang P., Cai J., Chen Z. W. GE11 peptide conjugated selenium nanoparticles for EGFR targeted oridonin delivery to achieve enhanced anticancer efficacy by inhibiting EGFR-mediated PI3K/AKT and Ras/Raf/MEK/ERK pathways. *Drug Delivery*. 2017;24(1):1549–1564. DOI: 10.1080/10717544.2017.1386729.
69. Gao F., Yuan Q., Gao L., Cai P., Zhu H., Liu R., Wang Y., Wei Y., Huang G., Liang J., Gao X. Cytotoxicity and therapeutic effect of irinotecan combined with selenium nanoparticles. *Biomaterials*. 2014;35:8854–8866. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.004.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-44-54
УДК 615.45:547.822

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Обзор производных пиперидина и морфолина как перспективные источники биологически активных соединений (обзор)

А. Е. Хамитова✉, **Д. А. Берилло**

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова» , 050012, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Толе би, д. 94

✉ **Контактное лицо:** Хамитова Акжонас Ермековна. **E-mail:** khamitova.a@kaznmu.kz

ORCID: А. Е. Хамитова – https://orcid.org/0000-0001-7978-1468; Д. А. Берилло – https://orcid.org/0000-0003-2534-9367.

Статья поступила: 04.05.2022 **Статья принята в печать:** 27.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Поиск новых, эффективных и безопасных фармакологически активных веществ остается актуальной задачей в области фармации. Множество соединений ряда пиперидина, морфолина широко используются в медицинской практике и относятся к важной группе биологически активных соединений. Проведен информационный, литературный поиск по синтезу новых производных пиперидина и морфолина. В статье обобщены результаты исследований новых производных пиперидина и морфолина как потенциальных источников биологически активных веществ.

Текст. Обзор посвящен взаимосвязи между фармакологической активностью N-производных пиперидина и морфолина в отношении различных биологических мишеней и структурой вещества, подчеркивается важность пиперидинового и морфолинового кольца в дизайне и разработке лекарственных препаратов. Пиперидин и морфолин рассматриваются как прерогативные структуры не только для повышения активности, но и для получения биологических веществ с желаемыми терапевтическими свойствами и улучшенной фармакокинетикой.

Заключение. Литературный обзор показывает текущую тенденцию в отношении изучения производных морфолина и пиперидина, раскрывает их высокую фармакофорную активность. Обзор предоставит исследователям необходимую базу знаний для внесения химических структурных изменений в структуры лекарств лидеров для усиления фармакологических активностей.

Ключевые слова: пиперидин, морфолин, гетероциклы, фармакофор, синтез, биологическая активность, разработка

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

Вклад авторов. А. Е. Хамитова – проведение патентно-информационного и литературного поиска по объектам исследования: производные пиперидина, мофролина, анализ и обработка полученных баз данных, написание статьи. Д. А. Берилло – внесение значимых исправлений в содержание работы, поиск и обработка зарубежных научных исследований, окончательное утверждение публикуемой рукописи.

Для цитирования: Хамитова А. Е., Берилло Д. А. Обзор производных пиперидина и морфолина как перспективные источники биологически активных соединений. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):44–54. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-44-54

Overview of Piperidine and Morpholine Derivatives as Promising Sources of Biologically Active Compounds (Review)

Akzhonas E. Khamitova✉, **Dmitry A. Berillo**

Asfendiyarov Kazakh National Medical University, 94, str. Tole bi, Almaty, 050012, Republic of Kazakhstan,

✉ **Corresponding author:** Akzhonas E. Khamitova. **E-mail:** khamitova.a@kaznmu.kz

ORCID: Akzhonas E. Khamitova – https://orcid.org/0000-0001-7978-1468; Dmitry A. Berillo – https://orcid.org/0000-0003-2534-9367.

Received: 04.05.2022 **Revised:** 27.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. The search for new, effective and safe pharmacologically active substances remains an urgent task in the field of pharmacy. Many compounds of the piperidine and morpholine series are widely used in medical practice and belong to an important group of biologically active compounds. An informational, literature search on the synthesis of new derivatives of piperidine and morpholine was carried out. The article summarizes the results of studies of new derivatives of piperidine and morpholine as potential sources of biologically active substances.

Text. The review is devoted to the relationship between the pharmacological activity of the N-derivatives of piperidine and morpholine in relation to various biological targets and the structure of the substance, the importance of the piperidine and morpholine rings in the design and development of drugs is highlighted. Piperidine and morpholine are considered as prerogative structures not only for increasing activity, but also for obtaining biological substances with desired therapeutic properties and improved pharmacokinetics.

© Хамитова А. Е., Берилло Д. А., 2023
© Khamitova A. E., Berillo D. A., 2023

Conclusion. The literature review shows the current trend towards the study of morpholine and piperidine derivatives, reveals their high pharmacophore activity. The review will provide researchers with the necessary knowledge base to make chemical structural changes to the structures of drug leaders to enhance pharmacological activities.

Keywords: piperidine, morpholine, heterocycles, pharmacophore, synthesis, biological activity,development

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. Akzhonas E. Khamitova – conducting patent information and literary searches on the objects of research: derivatives of piperidine, morpholine analysis and processing of the obtained databases, writing an article.Dmitry A. Berillo – making significant corrections to the content of the work, searching and processing scientific research, editing, final approval of the published manuscript.

For citation: Khamitova A. E., Berillo D. A. Overview of piperidine and morpholine derivatives as promising sources of biologically active compounds. *Drug development & registration*. 2023;12(2):44–54. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-44-54

ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач развития фармацевтической промышленности является расширение арсенала соединений, используемых в качестве активных фармацевтических субстанций для создания новых, более эффективных, безопасных лекарственных средств. Среди новых препаратов, одобренных FDA в 2021 году, почти 50 % составляют вещества с азотсодержащими гетероциклами [1]. Гетероциклические соединения морфолина способны усиливать активность молекулы за счет молекулярных взаимодействий с белком-мишенью (киназами), улучшать фармакокинетические свойства [2].

Научными исследователями изучаются и проводятся клинические испытания множества соединений пиперидинового и морфолинового ряда (рисунок 1).

Двадцать три из 200 брэндовых наименований препаратов проявляющие анальгетическую, противодиарейную, антигистаминую, спазмолитическую, цитостатическую и др. активности содержат пиперидиновый фрагмент [3].

Кольцо пиперидина входит в структурную основу ряда соединений, используемые в клинической практике и оказывают анальгетическое («Промедол» **1**, «Фентанил» **2**), противодиарейное («Лоперамид» **3**), антигистаминное («Кетотифен» **4**, «Лоратадин» **5**), спазмолитическое («Но-шпа» **6**), противораковое («Ралоксифен» **7**), антипсихотическое («Рисперидон» **8**, «Пипамперон» **9**) действия (рисунок 2) **[4].** Известен также препарат «Донепезил» **10**, назначаемый для лечения болезни Альцгеймера [5]. «Метилфенидат» **11** используют в медицине как основное средство для лечения синдрома дефицита внимания и гиперактивности, «Тиагабин» **12** – противоэпилептическое с редство с потенциальной противопаркинсонической активностью [6].

Морфолин представляет собой гетероцикл, присутствующий во многих одобренных и применяемых в клинической практике лекарственных препаратах. Морфолиновое кольцо является универсальным и легкодоступным синтетическим строительным блоком [7]. Существует много примеров молекулярных мишеней биоактивного морфолина, в которых был продемонстрирован значительный вклад морфолиновой части, он является неотъемлемым компонентом фармакофора, обеспечивает селективное сродство к широкому спектру рецепторов [8].

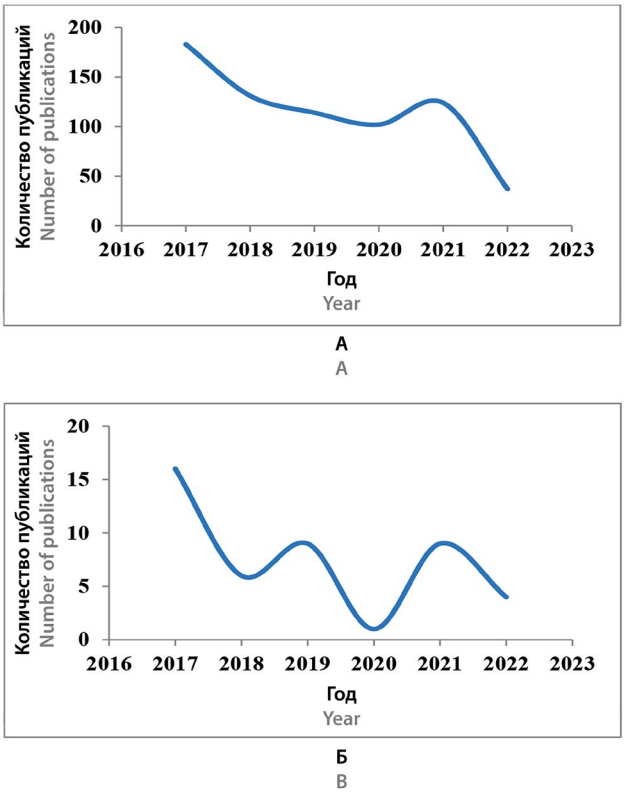


Рисунок 1. Динамика изменения количества публикаций в базе данных Pubmed по ключевым словам пиперидин (А), морфолин (Б) клинические исследования

Figure 1. Dynamics of changes in the number of publications in the Pubmed database by keywords piperidine (A), morpholine (B) clinical trials

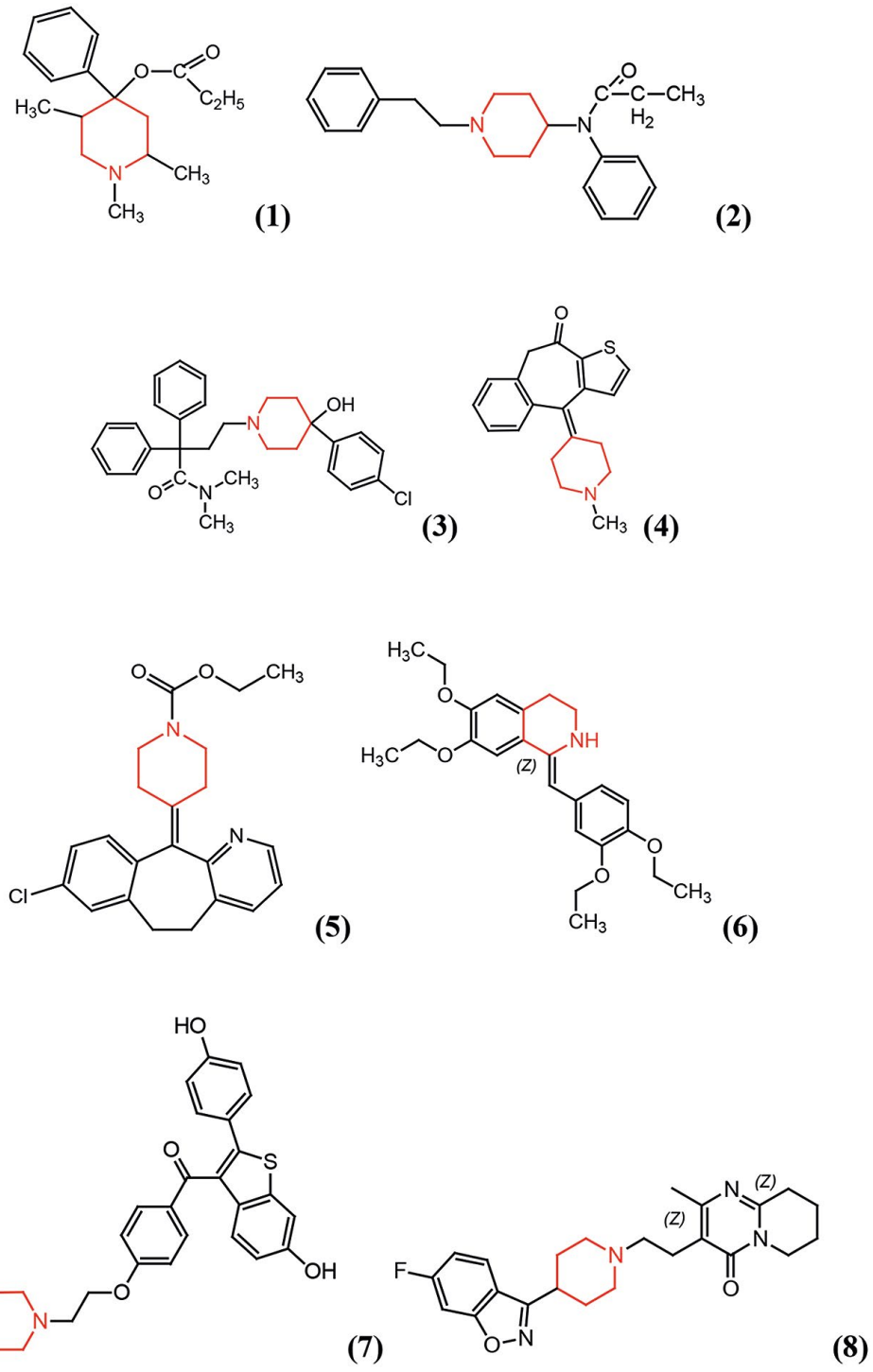
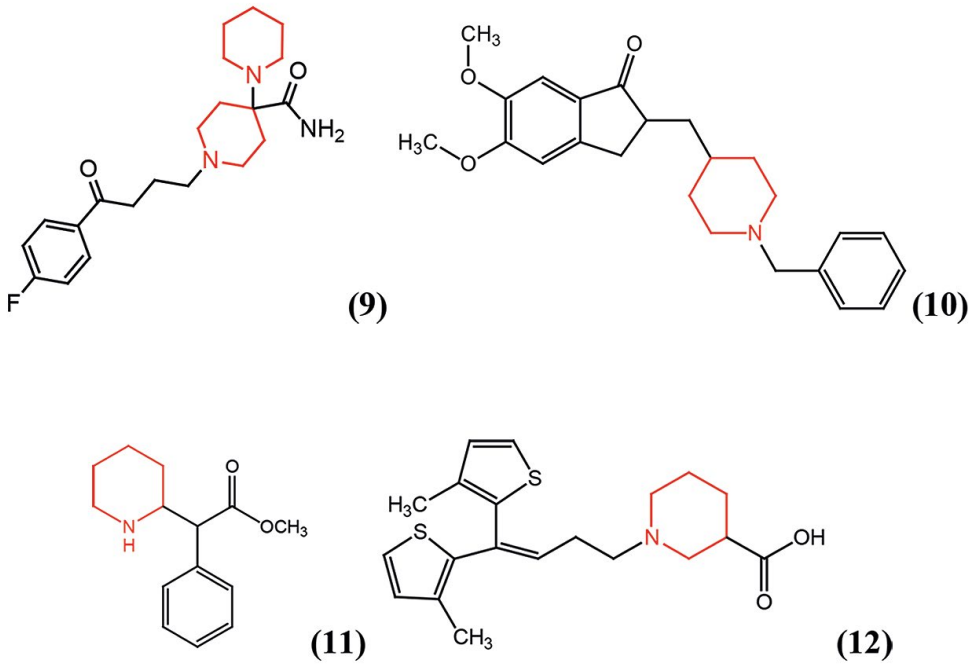


Рисунок 2. **Структурные формулы пиперидинсодержащих лекарственных средств**

Figure 2. **Structural formulas of piperidine-containing drugs**

Широкий спектр фармакологической активности морфолинового кольца включает антимикробное («Линезолид» **13**), антидиабетическое, противорвотное («Апрепитант» **14**), стимулятор («Фторофенметразин» **15**), антидепрессант («Ребоксетин» **16**, «Моклобемид» **17**), бронхорасширяющее, противораковое и противоаритмическое («Этмозин» **18**) действия[1] [9–11]. Морфолинсодержащий противораковый препарат «Гефитиниб» **19**, продаваемый AstraZeneca и Teva, применяется при раке молочной

[1] Drug information, identify pills, check interactions. Available at: https://www.drugs.com/history/iressa.html Accessed: 12.07.2022.



Продолжение рисунка 2

Continuation of Figure 2

железы, легких и других онкологических заболеваниях (рисунок 3) [12].

Большое количество исследований *in vivo* продемонстрировало способность морфолина не только повышать активность, но и обеспечивать соединения с желаемыми лекарственными свойствами и улучшенной фармакокинетикой [13].

Производные пиперидина

Нерибосомальные пептиды, продуцируемые микроорганизмами, характеризуется значительным структурным разнообразием и часто проявляют высокую биологическую активность. Разнообразие структуры этих соединений зависит от состава и последовательности различных аминокислот. Пипеколиновая кислота (пиперидин-2-карбоновая кислота), циклическая непротеиногенная аминокислота с формулой $HNC_5H_9CO_2H$ (рисунок 4) [14, 15]. Бупивакаин производное пипеколиновой кислоты, местный анестетик амидного ряда, обладает высокой активностью, длительностью действия [16]. Среди нерибосомных пептидов, содержащих пипеколиновую кислоту выделяются разветвленные циклические депсипептиды уллеунгамиды. Эти соединения содержат 5-гидрокси-6-метил-2,3-дегидропипеколин и 4,5-дигидрокси-6-метил-2,3-дегидропипеколиновой кислоты. Сангын Сон и его коллегами из почвенной актинобактерии *Streptomyces sp.* получили ранее неизвестный разветвленный циклический депсипептид, богатый пипеколиновой кислотой, новый по структуре уллеунгамид. Полученный уллеунгамид ингибировал пролиферацию клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 [17].

Следует отметить также класс эфрапептинов представляющий собой пептиды содержащие фрагмент пипеколиновой кислоты, продуцируемые грибами рода *Tolypocladium*, обладающие противогрибковым, инсектицидным и ингибирующим действием на митохондриальную АТФазу [17].

А. С. Х. Аль-Самарраи с коллегами изучили ряд новых производных аминопиридиновых, пирролидиновых, пиперидиновых и морфолиновых ацетамидов и определили антибактериальную активность *in vitro* в отношении штаммов *E. coli, P. mirabilis* и *S. pyogenes*. Показано, что наиболее высокой антибактериальной активностью обладают субстанции ((4-хлорфенил)амино)-1-(3-ролидин-1-ил)этан-1-он (диаметр зоны ингибирования 7,7, 14,2, 15 мм) и 1-(пиперидин-1-ил)-2-тозилэтан-1-он (диаметр зоны ингибирования 5,8, 12,9, 13 мм) [19].

Серия новых 2-(N-пирролидино,N-пиперидино или N-морфолино)-7-фенил(α-фуроил или α-тиенил)-[1,3]тиазоло[4,5-d]пиридазинонов была синтезирована при взаимодействии метил-5-бензоил(α-фуроил или α-тиенил)-2-аминозамещенных тиазол-4-карбоксилатов с гидразином. Эти новые производные проявили анальгетическую и противовоспалительную активности *in vivo*. 7-фенил-2-(пиперидин-1-ил)[1,3]тиазоло[4,5-d]пиридазин-4(5H) -он и 2-(морфолин-4-ил)-7-фенил[1,3]тиазоло[4,5-d]пиридазин-4(5H)-он показали хорошую анальгетическую активность с латентными

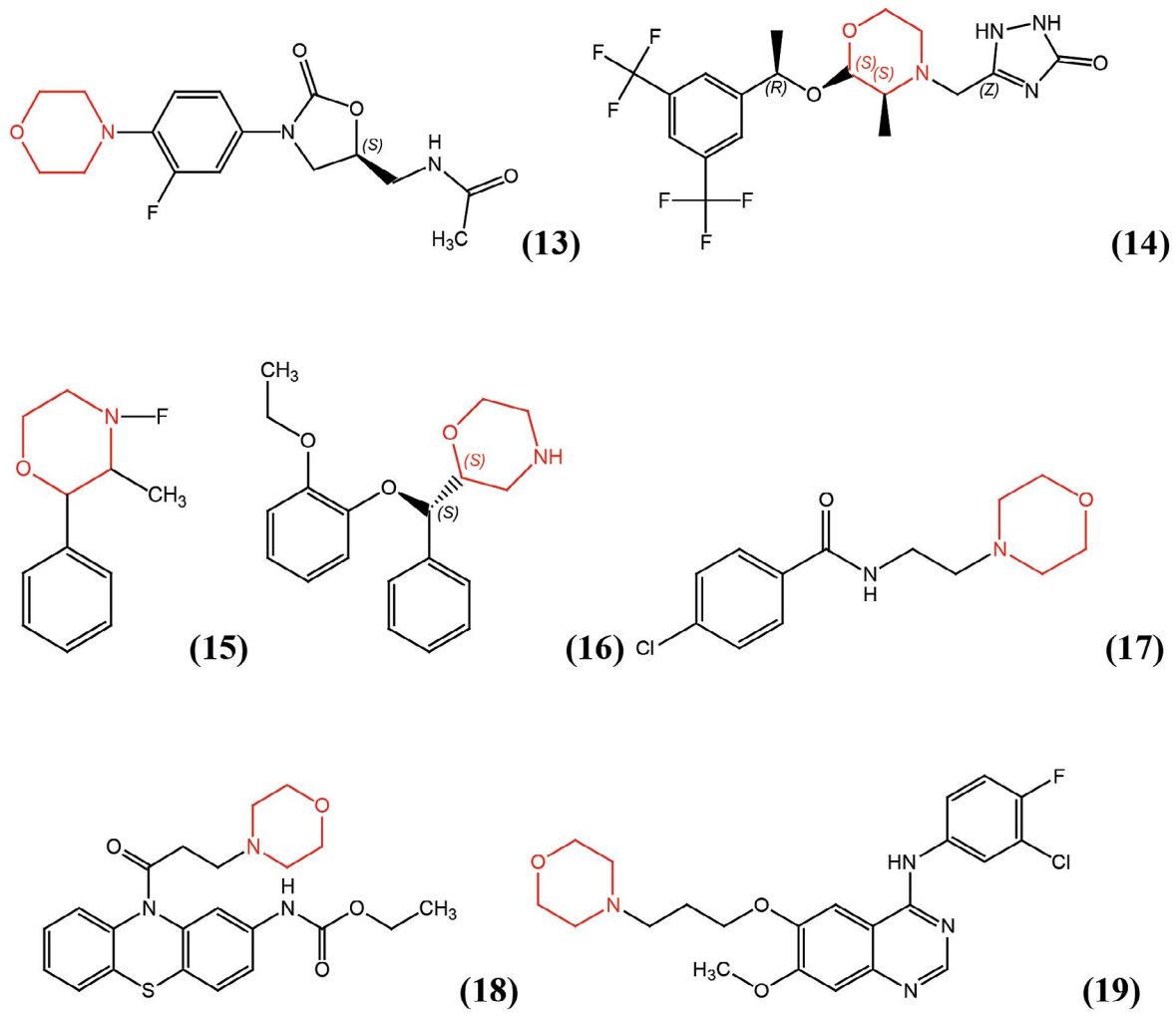


Рисунок 3. **Структурные формулы морфолинсодержащих лекарственных средств**

Figure 3. **Structural formulas of morpholine-containing drugs**

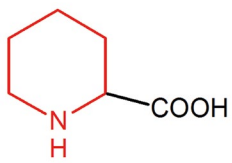


Рисунок 4. **Структурная формула пипеколиновой кислоты**

Figure 4. **Structural formulas of pipecolic acid**

периодами 105, 110,6 % соответственно, сравнимую с контрольным препаратом кеторолак (латентный период 100,25 %). Было замечено, что 7-(фуран-2-ил)-2-(морфолин-4-ил)[1,3]тиазоло[4,5-d]пиридазин-4(5H)-он показал более выраженную противовоспалительную активность, снижал отек на 34,8 %, в то время как модельный препарат кеторолак на 41,1 %. [20].

Анна Вечорек-Блауз и др. с помощью реакции раскрытия цикла оксазолона с различными первичными и вторичными аминами синтезировали новые 3-ферроценилпропенамиды. Антипролиферативная активность полученных соединений была протестирована на линиях опухолевых клеток человека (HCT116, SW620, Colo 205, MCF-7, HepG2 и A549). Было обнаружено, что наиболее эффективным соединением было пиперидиновое производное 2-(2,5-диметилоксазол-4-карбоксамидо)-3-ферроценил-1-(пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он, его IC_{50} составило 8,1 мкМ (MCF-7), 9,6 мкМ (SW620) и 13,2 мкМ (Colo 205) [21].

Маниканта Мурахари и др. синтезировали новый ряд 2,4-диметил-акридонов с пропильной и бутильной боковой цепью, содержащих замещенные третичные амины, определяли их противоопухолевую активность. Продемонстрировали хорошую цитотоксичность соединения 10-(4-[N-диэтаноламино] бутил)-2,4-диметилакридон с $IC_{50} = 4 \pm 0{,}05$ нМ против MCF7 и $5{,}2 \pm 0{,}13$ нМ против клеточных линий MCF7/ADR и 10-(4-N-[(β-гидроксиэтил)пиперазино]бутил)-2,4-диметилакридон со значением $IC_{50} = 2 \pm$

0,03 нМ против MCF7 и 2,56 ± 0,05 нМ против клеточных линий MCF7/ADR [22].

Соединение 8-метил-6-фенил-4-(пиперидин-1-ил)-6H-пиразоло[4′,3′:4,5]тиено[3,2-d][1,2,3]триазин, содержащий пиперидиновый цикл оказывает противогрибковую активность по отношению *Geotrichum candidum* и *Syncephalastrum racemosum* (зона ингибирования 16–17 мм) в сравнении со стандартом кетоконазолом (зона ингибирования 18–19 мм [23].

В исследовании, связанном с влиянием различных заместителей на производные пиперидина, отмечается их действие на различные дофаминовые и серотониновые рецепторы, изучаются и предлагаются как соединения с избирательной антипсихотической активностью [24].

В работе Туран Назлы и его коллег сообщается о синтезе 2-(4-замещенного фенил)-1-[2-(пиперидин-1-ил)этил]-1H-бензимидазола и определение его антидепрессантого эффекта. По результатам исследования новое соединение показал высокую антидепрессантную активность (10 мг/кг) по сравнению с эталонным препаратом флуоксетин (20 мг/кг) [25].

Донг и др. получили ряд новых производных пиперидина. Эти соединения оценивались на предмет их противораковой активности. Соединение 2-(2,6-диоксопиперидин-1-ил)-N-(4-метоксибензил)-N-(3,4,5-триметоксифенил)ацетамид показало сильную антипролиферативную активность со значением IC_{50} = 0,81 мкМ сопоставимой с эталонным препаратом 5-фторурацил [26].

Шамим и др. синтезировали ряд новых N-замещенных производных фенацилпиперидина, которые проявляли умеренную антигипертензивную активность [27].

Сюйдун с коллегами разработали и синтезировали ряд производных пиперидина. Среди них соединение 8-(5-(4-(6-фторбензо[d]изоксазол-3-ил)пиперидин-1-ил)-пентаноил)-5,6-дигидро-1H-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-4(2H)-он проявляло прокогнитивные свойства в концентрации IC_{50} = 366 нМ. Считается, что данное соединение может составлять новый класс атипичных нейролептиков для лечения шизофрении [28].

Сотрудниками КазГУ им.аль-Фараби были синтезированы гидрохлорид 1-(4′-метил-4′-оксибутин-2′-ил)-морфолина, гидрохлорид 1-(4′-метил-4′-бензоилоксипентин-2′-ил)-пиперидина, гидрохлорид 1-(4′-метил-4′-бензоил-оксипентин-2′-ил)-морфолина. Данные соединения испытывались на наличие антибактериальной активности по способности влиять на рост грам-положительных (стафилококки) и грамотрицательных (*E. coli* и сальмонеллы) микроорганизмов, спазмолитической активности. По результатам исследований соединения гидрохлорид 1-(4′-метил-4′-оксибутин-2′-ил)-морфолина, гидро-хлорид 1-(4′-метил-4′-бензоилоксипентин-2′-ил)-пиперидина показали анти-бактериальную активность, сопоставимой с данными стрептомицина, и спазмолитическую активность, сопоставимой с показателями эталонного препарата но-шпы [29].

Гидразиды 2-(N-пиперидинил)уксусной кислоты и 2-метил-3-N-пиперидинил)пропановой кислоты (рисунок 5) показали антибактериальную активность в отношении грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli* и *S. choleraesuis*) штаммов бактерий и спазмолитическую активность, сравнимую с модельными препаратами (Но-шпа) в исследовании *in vitro*. Синтезированные соединения в эксперименте *in vivo* показали значительно низкую острую токсичность ($ЛД_{50}$ = 520–575 мг/кг) по сравнению с коммерчески доступными препаратами (стрептомицин, ципрофлоксацин и дротаверин $ЛД_{50}$ 100–215 мг/кг) [30].

Производные пиперидина изучались как жаропонижающие средства. Исследовательской группой А. А. Василюк были синтезированы семь новых производных пиперидина с функциональными заместителями в 1-м и 4-м положениях. Из полученных соединений три соединения в дозе 20 мг/кг продемонстрировали высокую жаропонижающую активность на модели дрожжи-индуцированной лихорадки [31].

В поисках потенциально новых фармакологических свойств кроме синтеза, проводят модификации уже имеющихся соединений. Так, группой исследователей [32] проведены различные структурные модификации донепезила **10**. Бензилпиперидиновая часть донепезила была замещена на бензилпиридин, пиридилметилпиперидин, бензилпиперазин, пиримидилпиперазин. Эти производные показали многообещающую активность в качестве субстанций против болезни Альцгеймера. Установлено, что реактиваторами антихолинэстеразы (АХЭ) являются производные оксима 3-гидрокси-6-(пиперидин-1-илметил)пиколинальдегида [32].

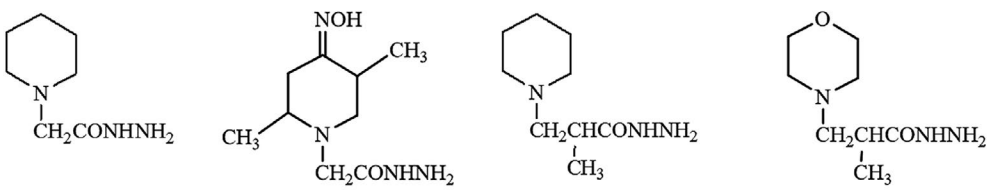


Рисунок 5. Гидразиды 2-(N-пиперидинил)уксусной кислоты и 2-метил-3-N-пиперидинил)пропановой кислоты

Figure 5. Hydrazides of 2-(N-piperidinyl)acetic acid and 2-methyl-3-N-piperidinyl)propane acid

Из вышеприведенных данных можно сделать вывод, что пиперидиновое кольцо является эффективным фармакофором, входящее в состав многих известных и применяемых в клинической практике лекарственных средств, а также представляет большой интерес среди исследователей при разработке новых биологически активных соединений.

Производные морфолина

В исследовании Джоти Сингх и др. сообщается о синтезе и фармакологической оценке новых серий 2-замещенных-6-(морфолинил/пиперидинил) производных пиридазин-3(2H)-она. Субстанции 2-(метоксикарбонилметил)-6-(морфолин-4-ил)пиридазин-3(2H)-он, 2-(2-(3,4-диметоксифенетиламино)-2-оксоэтил)-6-(морфолин-4-ил)пиридазин-3(2H)-он и 2-(2-(4-(4-нитрофенил))пиперазин-1-ил)-2-оксоэтил)-6-(морфолин-4-ил)пиридазин-3(2H)-он оказали сильное противовоспалительное и обезболивающее действие. При оценке ульцерогенного действия, который характерен для многих нестероидных противовоспалительных лекарственных препаратов, новые соединения показали хорошую безопасность для желудочно-кишечного тракта по сравнению со стандартным препаратом индометацин [33].

В исследованиях Ахмед Рагаб и его коллег сообщается о дизайне, синтезе и антимикробной оценке новой структуры, включающих производные 6-(морфолиносульфонил)хиноксалина с гидразином, гидразоном и пиразолом. Антимикробную активность определяли *in vitro* с использованием грамотрицательных (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *S. typhi* ATCC 6539) и грамположительных штаммов (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 29213 и *E. faecalis* ATCC 29212). Среди полученных соединений, соединения 3-(2-((1,3-дифенил-1H-пиразол-4-ил)метилен)гидразинил)-6-(морфолиносульфонил)хиноксалин-2(1H)-он, 3-(2-(1-(4-бромфенил)этилиден)-гидразинил)-6-(морфолиносульфонил)хиноксалин-2(1H)-он, 6-(морфолино-сульфонил)-3-(2-(2-оксо-5-(пиперидин-1-илсульфонил)индолин-3-илиден)-гидразинил)-хиноксалин-2(1H)-он и 4-(2-(7-(морфолиносульфонил)-3-оксо-3,4-дигидрохиноксалин-2-ил)гидразинил)-4-оксобутановая кислота показали зоны ингибирования в диапазоне от (23 ± 0,65 до 32 ± 0,22) мм для грамположительных бактерий и (20 ± 0,16 до 30 ± 0,29) мм для грамотрицательных бактерий по сравнению с тетрациклином (от 22 ± 0,25 до 25 ± 0,22 мм) и (20 ± 0,50–23 ± 0,20 мм) для грамположительных и грамотрицательных бактерий соответственно [34].

Производное 2,3-дихлор-6-морфолиносульфонил-хиноксалина подвергалось химическим модификациям с образованием ряда 6-морфолино-2,3-дизамещенных хиноксалинов, которые впоследствии проявили антибактериальную и иммуномодулирующую активность. Согласно результатам исследования, 3-хлор-6-морфолиносульфонил-2-(пиперидин-1-ил)хиноксалин (МИК 4,91–9,82 мкМ) показал сравнимую с норфлоксацином (МИК 2,44–9,80 мкМ) антибактериальную активность [35].

Ряд 2-(4-морфолинил/1-пиперидинил/1-пирролидинил)-4,6-диарилпири-мидины были получены путем конденсацией 1,3-диарилпропенонов с дициандиамидом в присутствии гетероциклических вторичных аминов, как морфолин, пиперидин и пирролидин. Все синтезированные соединения были оценены на антибактериальную активность. Среди них 2-(4-морфолинил)-4-(4-хлорфенил)-6-(4-диметиламинофенил)пиримидин (зона ингибирования 19 мм) показал хорошую активность в отношении кишечной палочки, сопоставимую с активностью стандарта стрептомицин (зона ингибирования 20 мм) [36].

Самрин Гюль и его коллегами были получены новые серии 2-[[5-алкил/аралкил-1,3,4-оксадиазол-2-ил]тио]-N-[4-(4-морфолинил)фенил] ацетамидов и оценены на антимикробную активность. Субстанция 2-[[5-(4-хлорфенил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил]тио]-N-[4-(4-морфолинил)фенил]ацетамид проявила высокую противомикробную активность (зона ингибирования 23–25 мм) по сравнению со стрептомицином (зона ингибирования 24–28 мм) [37].

Три метиловых эфира мелфалана, в структуре которых амидиновые фрагменты замещены тиоморфолином, индолином или 4-(4-морфолинил) и пиперидином тестировали на цитотоксическую активность в отношении клеток THP1, HL60 и RPMI8226 *in vitro*. Соединение гидрохлорид метилового эфира 2-(тиоморфолинметилиденамино)-3-[4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил]пропановой кислоты обладало наибольшей биологической активностью, проявляя более высокие цитотоксические и генотоксические свойства, также показало высокую способность индуцировать апоптоз в протестированных линиях раковых клеток [38].

В недавнем исследовании Актар с коллегами [40] провели синтез производных морфолина, замещенных халконом, новую серию производных (E)-3-(4-замещенного фенил)-1-(4'-морфолинофенил)проп-2-ен-1-она, и дальнейшую оценку биологической активности в отношении клеточных линий стволовых раковых клеток (C6) и HeLa. По результатам исследования структура-активность пришли к выводу о роли незамещенного морфолина в мощной антипролиферативной активности. Синтезированное соединение (2E)-1-[4-(морфолин-4-ил)фенил]-3-фенилпроп-2-ен-1-он показало наиболее выраженную противораковую активность с IC_{50} 7,3 мкМ и 68,2 мкМ для клеточных линий C6 и HeLa соответственно, почти эквивалентную стандартному препарату 5-фторурацилу (IC_{50} 5,8 мкМ и 16,3 мкМ) [39].

В исследовании Р. Хейран с сотрудниками сообщается о синтезе трех серий новых моноциклических производных β-лактама, содержащих морфолиновый заместитель в кольце азота, которые были оценены на противовоспалительную активность. 3-(2,4-дихлорфенокси)-1-(3-морфолинопропил)-4-(4-нит-

рофенил)азетидин-2-он и 1-(3-морфолинопропил)-3-(нафталин-2-илокси)-4-(4-нитрофенил)азетидин-2-он показали более выраженный противовоспалительный эффект с IC_{50} 4,14 ± 0,63 мкМ и 5,06 ± 0,94 мкМ соответственно по сравнению с препаратом стероидного ряда дексаметазоном (IC_{50} 5,02 ± 1,34) [40].

Согласно результатам исследований Матралис и Курунакис, были получены сопряженные нафталин-морфолины как антигиперлипидемические агенты. По результатам исследования, замена морфолинового кольца приводило к значительному уменьшению антиоксидантной активности (примерно в 3,5 раза). Так, при замене морфолинового кольца соединения 2-([1,1-дифенил]-4-ил)-4-метилморфолин (IC_{50} 86,8 мкМ) на его изостер тиоморфолин (соединение 2-([1,1-дифенил]-4-ил)-4-метилтиоморфолин) значение IC50 повышается и составляет 299 мкМ [41].

Группой О. А. Нуркенова [42] синтезированы и изучены антиоксидантная активность 2-морфолино-N-(пропан-2-илиден)-ацетогидразида и гидрохлорида 2-(2-морфолиноацетил)-N-фенилгидразинокарботиоамида. Антиоксидантная активность изучалась путем определения влияния синтезированых соединений на процесс электровосстановления кислорода в различных концентрациях. Определение антиоксидантной активности отражало количество активных форм кислорода, нейтрализованных антиоксидантом за определенное время. Было установлено, что водный раствор изученных производных морфолина 2-морфолино-N-(пропан-2-илиден)-ацетогидразида и гидрохлорида 2-(2-морфолиноацетил)-N-фенилгидразинокарботиоамида проявляют высокую антиоксидантную активность [42].

Так же представляют определенный интерес новые N-гетероциклические комплексы палладия (II) с лигандом морфолина. Были установлены их ингибирующие эффекты в отношении α-гликозидазы, изоферментов цитозольной карбоангидразы I и II, ацетилхолинэстеразы и фермента бутирилхолинэстеразы. Все соединения показали избирательное ингибирование этих метаболических ферментов, можно предполагать, что они могут быть использованы в качестве одной из эффективных биологически активных соединений при лечении болезни Альцгеймера [43].

Наличие у производных морфолина высокой активности в отношении множества биологических мишеней делает их перспективной группой для лечения многих заболеваний. Исследователями В. А. Приходько и др. [44] на моделях различных неврологических заболеваний *in vitro* и *in vivo* было установлено, что ряд производных морфолина обладают выраженной нейропротекторной активностью. У экспериментальных животных соединения данной группы снижали степень двигательных и когнитивных нарушений, замедляли процесс нейродегенерации, смягчали течение ишемического инсульта. Наиболее высокую активность сразу при нескольких различных патологиях проявили (R)-(+)-[2,3-дигидро-5-метил-3-(4-морфолинилметил)-пирроло[1,2,3-de]-1,4-бензоксазин-6-ил]-1-нафталинилметанон и 4-гидрокси-4-метилпиперидин-1-карбоновой кислоты (4-метокси-7-морфолин-4-ил-бензотиазол-2-ил)амид [44].

Группой Л. А. Каюковой изучены новые производные β-аминопропиоамидоксимов, содержащие морфолиновое кольцо. Согласно результатам исследования, соединения О-*n*-анизоил-β-(морфолин-1-ил)-пропиоамидоксима и йодметилат О-*n*-толуоил-β-(морфолин-1-ил)пропио-амидоксима показали β-глюкозидазную активность, сопоставимую с эталонным препаратом акарбозой, что делает их кандидатом для лечения сахарного диабета [45].

Некоторые соединения, содержащие морфолиновый цикл, проявляют противотуберкулезную и антимикробную активности. С. В. Мамата с сотрудниками синтезировали 4-{2-[5-(4-фторфенил)-[1,3,4]оксадиазол-2-илсульфанил]этил} морфолин путем кипячения 1,3,4-оксадиазол-2-тиола с гидрохлоридом 4-(2-хлорэтил) морфолина, полученная субстанция проявила противотуберкулезную активность с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) 3,12 мкг/мл и высокую антимикробную активность, его значение МИК ниже модельного коммерческого препарата (6,5 ± 0,33 мкг/мл) [46]. Высокая антимикробная активность обусловлена строением химической структуры синтезированного соединения. Новое соединение богато гетероатомами из-за присутствия морфолина и оксадиазола. Гетероатомы, такие как азот и кислород могут образовывать водородные связи с различными белками гликопротеинов микробов, что может ингибировать рост микроорганизмов [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Статья обобщает недавние прикладные исследования в области органического синтеза биологически активных веществ, показывая потенциал пиперидинового и морфолинового фрагментов в сочетании с другими фармакофорными фрагментами для усиления той или иной активности. Синтетические производные пиперидина, представленные во многих исследованиях, иллюстрируют потенциальную эффективность в качестве противораковых, противомикробных, антигипертензивных, анальгезирующих, противовоспалительных и антидепрессивных субстанций. Аналогично производные морфолина в комбинации с гидразидной, тиосемикарбазидной, тиодиалольной, триалольной и другими функциональными группами оказывают фармакологическую эффективность в качестве антиоксидантных, противомикробных, противовоспалительных, антигиперлипидемических и противораковых средств. Пиперидиновое и морфолиновое кольца являются важнейшими фармакофорами при разработке и модификации как природных, так и синтетических лекарственных субстанций.

ЛИТЕРАТУРА

1. De la Torre B. G., Albericio F. The Pharmaceutical Industry in 2021. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules*. 2022;27(3):1075. DOI: 10.3390/molecules27031075.
2. Kumari A., Singh R. K. Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). *Bioorganic Chemistry*. 2020;96:103578. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103578.
3. Vitaku E., Smith D. T., Njardarson J. T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among US FDA approved pharmaceuticals: miniperspective. *J. Med. Chem*. 2014;57:10257–10274. DOI: 10.1021/jm501100b.
4. Gao F., Wang P., Yang H., Miao Q., Ma L., Lu G. Recent developments of quinolone-based derivatives and their activities against Escherichia coli. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;157:1223–1248. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.08.095.
5. Bari A., Iqbal A., Khan Z. A., Shahzad S. A., Yar M. Synthetic approaches toward piperidine related structures: A review. *Synthetic Communications*. 2020;50(17):2572–2589. DOI: 10.1080/00397911.2020.1776878.
6. Василюк А. А., Козловский В. И. Перспективные направления применения производных пиперидина в качестве структурных компонентов нейротропных лекарственных средств. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2021;20(2):8–17. DOI: 10.22263/2312-4156.2021.2.8.
7. Соколов Д. Н., Борисова М. С., Жукова Н. А., Толстикова Т. Г., Салахутдинов Н. Ф. 3-[3-(Морфолин-4-ил)пропил]-2-[(2,2,3-триметилциклопент-3-ен-1-ил)метил]-1,3-тиазолидин-4-он, обладающий противоязвенной и противовоспалительной активностью. Патент РФ на изобретение № RU 2643669 C1. 05.02.2018. Доступно по: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=39264050. Ссылка активна на 11.07.2022.
8. Kourounakis A. P., Xanthopoulos D., Tzara A. Morpholine as a privileged structure: a review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Medicinal Research Reviews*. 2020;40(2):709–752. DOI: 10.1002/med.21634.
9. Fatima A., Mohemmed F. Kh., Wasim A., Mohammad M. A., Lalit M. N., Sumit K. K., Mymoona A., Suhel P., Syed M. H., Mohammad S., Revealing quinquennial anticancer journey of morpholine: A SAR based review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;167:324–356. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.02.015.
10. Попова Е. П. Сравнение эффектов антиаритмиков I класса этмозина и этацизина на спектральные показатели вариабельности сердечного ритма у крыс. *Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний*. 2018;6(17):46–51.
11. Han C., Wirianto M., Kim E., Burish M. J., Yoo S. H., Chen Z. Clock-modulating activities of the anti-arrhythmic drug moricizine. *Clocks & sleep*. 2021;3(3):351–365. DOI: 10.3390/clockssleep3030022.
12. Aziz M. N., Panda S. S., Shalaby E. M., Fawzy N. G., Girgis A. S. Facile synthetic approach towards vasorelaxant active 4-hydroxyquinazoline-4-carboxamides. *RSC Advances*. 2019;9(49):28534–28540. DOI: 10.1039/C9RA04321G.
13. Pourshojaei Y., Abiri, A., Eskandari K., Haghighijoo Z., Edraki N., Asadipour A. Phenoxyethyl piperidine/morpholine Derivatives as pAS and cAS inhibitors of cholinesterases: insights for future Drug Design. *Scientific reports*. 2019;9(1):1–19. DOI: 10.1038/s41598-019-56463-2.
14. Ying H., Tao S., Wang J., Ma W., Chen K., Wang X., Ouyang P. Expanding metabolic pathway for de novo biosynthesis of the chiral pharmaceutical intermediate L-pipecolic acid in Escherichia coli. *Microb Cell Fact*. 2017;16(1):1–11. DOI: 10.1186/s12934-017-0666-0.
15. Рязанова О. В., Александрович Ю. С. Применение левобупивакаина для регионарной анестезии/анальгезии в акушерской и гинекологической практике. Обзор литературы. *Анестезиология и реаниматология*. 2018;63(1):16–20.
16. Hussain N., Brull R., Sheehy B., Essandoh M. K., Stahl D. L., Weaver T. E., Abdallah F. W. Perineural Liposomal Bupivacaine Is Not Superior to Nonliposomal Bupivacaine for Peripheral Nerve Block Analgesia. *Anesthesiology*. 2021;134(2):147–164. DOI: 10.1097/ALN.0000000000003651.
17. Son S., Jang M., Lee B., Jang J. P., Hong Y. S., Kim B. Y., Ahn J. S. A pipecolic acid-rich branched cyclic depsipeptide ulleungamide C from a Streptomyces species induces G0/G1 cell cycle arrest in promyelocytic leukemia cells. *The Journal of Antibiotics*. 2021:74(3);181–189. DOI: 10.1038/s41429-020-00385-z.
18. Brückner H., Degenkolb T. Sequences of Tolypins, Insecticidal Efrapeptin-Type Peptaibiotics from Species of the Fungal Genus Tolypocladium. *Chemistry & Biodiversity*. 2020;17(7):e2000276. DOI: 10.1002/cbdv.202000276.
19. Alsamarrai A. S., Abdulghani S. S. Microwave-assisted synthesis, structural characterization and assessment of the antibacterial activity of some new aminopyridine, pyrrolidine, piperidine and morpholine acetamides. *Molecules*. 2021;26(3):533. DOI: 10.3390/molecules26030533.
20. Demchenko A., Bobkova L., Yadlovskiy O., Buchtiarova T., Demchenko S. Synthesis and Biological Activity of New [1, 3] Thiazolo [4, 5-d] pyridazin-4 (5H)-ones. *Scientia Pharmaceutica*. 2016;84(2):255–268. DOI: 10.3797/scipharm.1505-16.
21. Wieczorek-Błauż A., Błauż A., Rychlik B., Plażuk D. The synthesis and biological activity of the 3-ferrocenylpropenamides derived from 5 (4H)-oxazolones. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2021;953:122026. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2021.122026.
22. Murahari M., Kharkar P. S., Lonikar N., Mayur Y. C. Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking and QSAR studies of 2, 4-dimethylacridones as anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2017;130:154–170. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.02.022.
23. Zaki R. M., El-Dean A. M. K., Radwan S. M., Saber A. F. A Convenient Synthesis, Reactions and Biological Activity of Some New 6H-Pyrazolo[4',3':4,5]thieno[3,2-d][1,2,3]triazine Compounds as Antibacterial, Anti-Fungal and Anti-Inflammatory Agents. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2018;29:2482–2495. DOI: 10.21577/0103-5053.20180127.
24. Rathore A., Asati V., Kashaw S. K., Agarwal S., Parwani D., Bhattacharya S., Mallick C. The Recent Development of Piperazine and Piperidine Derivatives as Antipsychotic Agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2021;21(3):362–379. DOI: 10.2174/1389557520666200910092327.
25. Turan N., Özkay Ü. D., Can N. Ö., Can Ö. D. Investigating the antidepressant-like effects of some benzimidazole-piperidine derivatives by in-vivo experimental methods. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2019;15(3):341–346. DOI: 10.2174/1570180815666181004103112.
26. Fu D. J., Liu S. M., Yang J. J., Li J. Novel piperidine derivatives as colchicine binding site inhibitors induce apoptosis and inhibit epithelial-mesenchymal transition against prostate cancer PC3 cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2020;35(1):1403–1413. DOI: 10.1080/14756366.2020.1783664.
27. Abdelshaheed M. M., Fawzy I. M., El-Subbagh H. I., Youssef K. M. Piperidine nucleus in the field of drug discovery. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;7(1):1–11. DOI: 10.1186/s43094-021-00335-y.
28. Cao X., Zhang Y., Chen Y., Qiu Y., Yu M., Xu X., Zhang G. Synthesis and biological evaluation of fused tricyclic heterocycle piperazine (piperidine) derivatives as potential multireceptor atypical antipsychotics. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;61(22):10017–10039. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01096.
29. Дюсебаева М. А., Женис Ж., Ахмедова Ш. А. Синтез ацетиленовых спиртов гетероциклического ряда и их ацильных производных. *Вестник КазНУ. Серия химическая*. 2015;1(77):37–41. DOI: https://doi.org/10.15328/cb490.
30. Berillo A. D., Dyusebaeva A. M. Synthesis of hydrazides of heterocyclic amines and their antimicrobial and spasmolitic activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2022;30(7):1036–1043. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.04.009.
31. Василюк А. А. Исследование жаропонижающей активности новых производных пиперидина на модели дрожжи-индуцированной лихорадки. *Фундаментальная наука в современной медицине*. 2021;365–368.
32. Ul Amin Mohsin N., Ahmad M. Donepezil: A review of the recent structural modifications and their impact on anti-Alzheimer activity. *Braz. J. Pharm Sci*. 2020;56. DOI: 10.1590/s2175-97902019000418325.

33. Singh J., Sharma D., Bansal R. Synthesis and Biological Evaluation of 2-substituted-6-(morpholinyl/piperidinyl)pyridazin-3(2H)-ones as Potent and Safer Anti-inflammatory and Analgesic Agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2017;54(5):2935–2945. DOI: 10.1002/jhet.2905.
34. Ragab A., Elsisi D. M., Ali O. A. A., Abusaif M. S., Askar A. A., Farag A. A., Ammar Y. A. Design, synthesis of new novel quinoxalin-2(1H)-one derivatives incorporating hydrazone, hydrazine, and pyrazole moieties as antimicrobial potential with *in-silico* ADME and molecular docking simulation. *Arabian Journal of Chemistry*. 2022;15(1):103497. DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103497.
35. Ammar Y. A., Farag A. A., Ali A. M., Ragab A., Askar A. A., Elsisi D. M., Belal A. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular docking studies of some novel di-substituted sulfonylquinoxaline derivatives. *Bioorganic Chemistry*. 2020;104:104164. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104164.
36. Sharma L., Choudhary P. C. Environmentally Benign Synthesis of 2-Substituted-4,6-Diaryl Pyrimidines Using Inorganic Solid Supports and their Biological Screening. *Int. j. innov. res. sci. eng. technol*. 2021;6(8):1152–1158.
37. Gul S., Abbasi M. A., Khan K. M., Nafeesa K., Siddiqa A., Akhtar M. N., Subhani, Z. Synthesis, antimicrobial evaluation and hemolytic activity of 2-[[5-alkyl/aralkyl substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl]thio]-*N*-[4-(4-morpholinyl)phenyl]acetamide derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2017;21:425–433. DOI: 10.1016/j.jscs.2014.04.005.
38. Poczta A., Krzeczyński P., Tobiasz J., Rogalska A., Gajek A., Marczak A. Synthesis and In Vitro Activity of Novel Melphalan Analogs in Hematological Malignancy Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(3):1760. DOI: 10.3390/ijms23031760.
39. Aktar B. S. K., Oruç-Emre E. E., Demirtaş İ., Yağlioğlu A. Ş., İyidoğan A. K., Güler Ç., Adem Ş. Synthesis and biological evaluation of novel chalcones bearing morpholine moiety as antiproliferative agents. *Turkish Journal of Chemistry*. 2018;42(2):482–492. DOI: 10.3906/kim-1705-28.
40. Heiran R., Sepehri S., Jarrahpour A., Digiorgio C., Douafer H., Brunel J. M., Turos E. Synthesis, docking and evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of novel morpholine capped β-lactam derivatives. *Bioorganic Chemistry*. 2020;102:104091. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104091.
41. Matralis A. N, Kourounakis A. P. Optimizing the Pharmacological Profile of New Bifunctional Antihyperlipidemic/Antioxidant Morpholine Derivatives. *ACS Med Chem Lett*. 2018;10(1):98–104. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00469.
42. Nurkenov O. A., Ibrayev M. K., Satpaeva Zh. B., Dauletzhanova Zh. T., Seilkhanov T. M. Synthesis and study of antioxidant activity of hydrazone and thiosemicarbazidebased on N-morpholinoacetic acid hydrazide. *Bulletin of the Karaganda University. Chemistry series*. 2018;1(89):22–26.
43. Aydın A., Duygu B. C., Ruya K., Parham T., Yetkin G., Muhittin A., İlhami G. Novel morpholine liganded Pd-based N-heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization, crystal structure, antidiabetic and anticholinergic properties. *Polyhedron*. 2019;159:345–354. DOI: 10.1016/j.poly.2018.11.048.
44. Prikhodko V. A., Sysoev Y. I., Okovityi S. V. Morpholine derivatives as potential agents for neurological manifestations of nervous system diseases. *Pharmacy Formulas*. 2020;2(1):16–35. DOI: 10.17816/phf21381.
45. Каюкова Л. А., Узакова А. Б., Байтурсынова Г. П., Дюсембаева Г. Т., Шульгау З. Т., Гуляев А. Е., Сергазы Ш. Д. Ингибирование α-амилазы и α-глюкозидазы новыми производными β-аминопропиоамидоксимов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(2):37–41. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-2-37-41.
46. Mamatha S. V., Mahesh B., Sagar B. K., Meenakshi S. K., Synthesis, characterization, crystal structure biological activity of 4-{2-[5-(4-fluoro-phenyl)-[1,3,4]oxadiazol-2-ylsulfanyl]-ethyl}-morpholine. *Journal of Molecular Structur*. 2019;1196:186–193. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.06.065.
47. Bhat M., Belagali S. L., Guanidinyl benzothiazole derivatives: synthesis and structure activity relationship studies of a novel series of potential antimicrobial and antioxidants. *Res. Chem. Intermed*. 2016;42(7):6195e6208. DOI: 10.1007/s11164-016-2454-6.

REFERENCES

1. De la Torre B. G., Albericio F. The Pharmaceutical Industry in 2021. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules*. 2022;27(3):1075. DOI: 10.3390/molecules27031075.
2. Kumari A., Singh R. K. Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). *Bioorganic Chemistry*. 2020;96:103578. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103578.
3. Vitaku E., Smith D. T., Njardarson J. T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among US FDA approved pharmaceuticals: miniperspective. *J. Med. Chem*. 2014;57:10257–10274. DOI: 10.1021/jm501100b.
4. Gao F., Wang P., Yang H., Miao Q., Ma L., Lu G. Recent developments of quinolone-based derivatives and their activities against Escherichia coli. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;157:1223–1248. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.08.095.
5. Bari A., Iqbal A., Khan Z. A., Shahzad S. A., Yar M. Synthetic approaches toward piperidine related structures: A review. *Synthetic Communications*. 2020;50(17):2572–2589. DOI: 10.1080/00397911.2020.1776878.
6. Vasilyuk A. A., Kozlovsky V. I. Promising directions for the application of piperidine derivatives as structural components of neurotropic drugs. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2021;20(2):8–17. (In Russ.) DOI: 10.22263/2312-4156.2021.2.8.
7. Sokolov D. N., Borisova M. S., Zhukova N. A., Tolstikova T. G., Salakhutdinov N. F. 3-[3-(Morpholin-4-yl)propyl]-2-[(2,2,3-trimethylcyclopent-3-en-1-yl)methyl]-1,3-thiazolidin-4-one, which has antiulcer and anti-inflammatory activity. Patent RUS № 2643669 C1. 05.02.2018. Available at: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=39264050. Accessed: 11.07.2022. (In Russ.)
8. Kourounakis A. P., Xanthopoulos D., Tzara A. Morpholine as a privileged structure: a review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Medicinal Research Reviews*. 2020;40(2):709–752. DOI: 10.1002/med.21634.
9. Fatima A., Mohemmed F. Kh., Wasim A., Mohammad M. A., Lalit M. N., Sumit K. K., Mymoona A., Suhel P., Syed M. H., Mohammad S., Revealing quinquennial anticancer journey of morpholine: A SAR based review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;167:324–356. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.02.015.
10. Popova E. P. Comparison of the effects of I class antiarrythmics Ethmozine, Ethacizin on spectral characteristics of cardiac rhythm variability in rats. *International Heart and Vascular Disease Journal*. 2018;6(17):46–51. (In Russ.)
11. Han C., Wirianto M., Kim E., Burish M. J., Yoo S. H., Chen Z. Clock-modulating activities of the anti-arrhythmic drug moricizine. *Clocks & sleep*. 2021;3(3):351–365. DOI: 10.3390/clockssleep3030022.
12. Aziz M. N., Panda S. S., Shalaby E. M., Fawzy N. G., Girgis A. S. Facile synthetic approach towards vasorelaxant active 4-hydroxyquinazoline-4-carboxamides. *RSC Advances*. 2019;9(49):28534–28540. DOI: 10.1039/C9RA04321G.
13. Pourshojaei Y., Abiri, A., Eskandari K., Haghighijoo Z., Edraki N., Asadipour A. Phenoxyethyl piperidine/морpholine Derivatives as pAS and cAS inhibitors of cholinesterases: insights for future Drug Design. *Scientific reports*. 2019;9(1):1–19. DOI: 10.1038/s41598-019-56463-2.
14. Ying H., Tao S., Wang J., Ma W., Chen K., Wang X., Ouyang P. Expanding metabolic pathway for de novo biosynthesis of the chiral pharmaceutical intermediate L-pipecolic acid in Escherichia coli. *Microb Cell Fact*. 2017;16(1):1–11. DOI: 10.1186/s12934-017-0666-0.
15. Riazanova O. V., Aleksandrovich Yu. S. The Use of Levobupivacaine for the Regional Anesthesia/Analgesia in the Obstetrical and Gynecological Practice. Literature Review. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology*. 2018;63(1):16–20. (In Russ.)
16. Hussain N., Brull R., Sheehy B., Essandoh M. K., Stahl D. L., Weaver T. E., Abdallah F. W. Perineural Liposomal Bupivacaine Is Not Superior to Nonliposomal Bupivacaine for Peripheral Nerve Block Analgesia. *Anesthesiology*. 2021;134(2):147–164. DOI: 10.1097/ALN.0000000000003651.

17. Son S., Jang M., Lee B., Jang J. P., Hong Y. S., Kim B. Y., Ahn J. S. A pipecolic acid-rich branched cyclic depsipeptide ulleungamide C from a Streptomyces species induces G0/G1 cell cycle arrest in promyelocytic leukemia cells. *The Journal of Antibiotics*. 2021:74(3);181–189. DOI: 10.1038/s41429-020-00385-z.
18. Brückner H., Degenkolb T. Sequences of Tolypins, Insecticidal Efrapeptin-Type Peptaibiotics from Species of the Fungal Genus Tolypocladium. *Chemistry & Biodiversity.* 2020;17(7):e2000276. DOI: 10.1002/cbdv.202000276.
19. Alsamarrai A. S., Abdulghani S. S. Microwave-assisted synthesis, structural characterization and assessment of the antibacterial activity of some new aminopyridine, pyrrolidine, piperidine and morpholine acetamides. *Molecules.* 2021;26(3):533. DOI: 10.3390/molecules26030533.
20. Demchenko A., Bobkova L., Yadlovskiy O., Buchtiarova T., Demchenko S. Synthesis and Biological Activity of New [1, 3] Thiazolo [4, 5-d] pyridazin-4 (5H)-ones. *Scientia Pharmaceutica*. 2016;84(2):255–268. DOI: 10.3797/scipharm.1505-16.
21. Wieczorek-Błauż A., Błauż A., Rychlik B., Plażuk D. The synthesis and biological activity of the 3-ferrocenylpropenamides derived from 5 (4H)-oxazolones. *Journal of Organometallic Chemistry.* 2021;953:122026. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2021.122026.
22. Murahari M., Kharkar P. S., Lonikar N., Mayur Y. C. Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking and QSAR studies of 2, 4-dimethylacridones as anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry.* 2017;130:154–170. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.02.022.
23. Zaki R. M., El-Dean A. M. K., Radwan S. M., Saber A. F. A Convenient Synthesis, Reactions and Biological Activity of Some New 6H-Pyrazolo[4′,3′:4,5]thieno[3,2-d][1,2,3]triazine Compounds as Antibacterial, Anti-Fungal and Anti-Inflammatory Agents. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 2018;29:2482–2495. DOI: 10.21577/0103-5053.20180127.
24. Rathore A., Asati V., Kashaw S. K., Agarwal S., Parwani D., Bhattacharya S., Mallick C. The Recent Development of Piperazine and Piperidine Derivatives as Antipsychotic Agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry.* 2021;21(3):362–379. DOI: 10.2174/1389557520666200910092327.
25. Turan N., Özkay Ü. D., Can N. Ö., Can Ö. D. Investigating the antidepressant-like effects of some benzimidazole-piperidine derivatives by in-vivo experimental methods. *Letters in Drug Design & Discovery.* 2019;15(3):341–346. DOI: 10.2174/1570180815666181004103112.
26. Fu D. J., Liu S. M., Yang J. J., Li J. Novel piperidine derivatives as colchicine binding site inhibitors induce apoptosis and inhibit epithelial-mesenchymal transition against prostate cancer PC3 cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry.* 2020;35(1):1403–1413. DOI: 10.1080/14756366.2020.1783664.
27. Abdelshaheed M. M., Fawzy I. M., El-Subbagh H. I., Youssef K. M. Piperidine nucleus in the field of drug discovery. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;7(1):1–11. DOI: 10.1186/s43094-021-00335-y.
28. Cao X., Zhang Y., Chen Y., Qiu Y., Yu M., Xu X., Zhang G. Synthesis and biological evaluation of fused tricyclic heterocycle piperazine (piperidine) derivatives as potential multireceptor atypical antipsychotics. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2018;61(22):10017–10039. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01096.
29. Dyusebaeva M. A., Zhenis Zh., Akhmedova Sh. S. Synthesis of acetylene alcohols of heterocyclic type and the acyl derivatives. *Chemical Bulletin of Kazakh National University.* 2015;1(77):37–41. (In Russ.) DOI: https://doi.org/10.15328/cb490.
30. Berillo A. D., Dyusebaeva A. M. Synthesis of hydrazides of heterocyclic amines and their antimicrobial and spasmolitic activity. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2022;30(7):1036–1043. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.04.009.
31. Vasilyuk A. A. Study of the antipyretic activity of new piperidine derivatives in a model of yeast-induced fever. *Fundamental'naja nauka v sovremennoj medicine.* 2021;365–368. (In Russ.)
32. Ul Amin Mohsin N., Ahmad M. Donepezil: A review of the recent structural modifications and their impact on anti-Alzheimer activity. *Braz. J. Pharm Sci.* 2020;56. DOI: 10.1590/s2175-97902019000418325.
33. Singh J., Sharma D., Bansal R. Synthesis and Biological Evaluation of 2-substituted-6-(morpholinyl/piperidinyl)pyridazin-3(2H)-ones as Potent and Safer Anti-inflammatory and Analgesic Agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry.* 2017;54(5):2935–2945. DOI: 10.1002/jhet.2905.
34. Ragab A., Elsisi D. M., Ali O. A. A., Abusaif M. S., Askar A. A., Farag A. A., Ammar Y. A. Design, synthesis of new novel quinoxalin-2(1H)-one derivatives incorporating hydrazone, hydrazine, and pyrazole moieties as antimicrobial potential with *in-silico* ADME and molecular docking simulation. *Arabian Journal of Chemistry.* 2022;15(1):103497. DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103497.
35. Ammar Y. A., Farag A. A., Ali A. M., Ragab A., Askar A. A., Elsisi D. M., Belal A. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular docking studies of some novel di-substituted sulfonylquinoxaline derivatives. *Bioorganic Chemistry.* 2020;104:104164. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104164.
36. Sharma L., Choudhary P. C. Environmentally Benign Synthesis of 2-Substituted-4,6-Diaryl Pyrimidines Using Inorganic Solid Supports and their Biological Screening. *Int. j. innov. res. sci. eng. technol.* 2021;6(8):1152–1158.
37. Gul S., Abbasi M. A., Khan K. M., Nafeesa K., Siddiqa A., Akhtar M. N., Subhani, Z. Synthesis, antimicrobial evaluation and hemolytic activity of 2-[[5-alkyl/aralkyl substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl]thio]-*N*-[4-(4-morpholinyl)phenyl]acetamide derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society.* 2017;21:425–433. DOI: 10.1016/j.jscs.2014.04.005.
38. Poczta A., Krzeczyński P., Tobiasz J., Rogalska A., Gajek A., Marczak A. Synthesis and In Vitro Activity of Novel Melphalan Analogs in Hematological Malignancy Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(3):1760. DOI: 10.3390/ijms23031760.
39. Aktar B. S. K., Oruç-Emre E. E., Demirtaş İ., Yağlioğlu A. Ş., İyidoğan A. K., Güler Ç., Adem Ş. Synthesis and biological evaluation of novel chalcones bearing morpholine moiety as antiproliferative agents. *Turkish Journal of Chemistry.* 2018;42(2):482–492. DOI: 10.3906/kim-1705-28.
40. Heiran R., Sepehri S., Jarrahpour A., Digiorgio C., Douafer H., Brunel J. M., Turos E. Synthesis, docking and evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of novel morpholine capped β-lactam derivatives. *Bioorganic Chemistry.* 2020;102:104091. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104091.
41. Matralis A. N, Kourounakis A. P. Optimizing the Pharmacological Profile of New Bifunctional Antihyperlipidemic/Antioxidant Morpholine Derivatives. *ACS Med Chem Lett*. 2018;10(1):98–104. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00469.
42. Nurkenov O. A., Ibrayev M. K., Satpaeva Zh. B., Dauletzhanova Zh. T., Seilkhanov T. M. Synthesis and study of antioxidant activity of hydrazone and thiosemicarbazidebased on N-morpholinoacetic acid hydrazide. *Bulletin of the Karaganda University. Chemistry series.* 2018;1(89):22–26.
43. Aydın A., Duygu B. C., Ruya K., Parham T., Yetkin G., Muhittin A., İlhami G. Novel morpholine liganded Pd-based N-heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization, crystal structure, antidiabetic and anticholinergic properties. *Polyhedron*. 2019;159:345–354. DOI: 10.1016/j.poly.2018.11.048.
44. Prikhodko V. A., Sysoev Y. I., Okovityi S. V. Morpholine derivatives as potential agents for neurological manifestations of nervous system diseases. *Pharmacy Formulas*. 2020;2(1):16–35. DOI: 10.17816/phf21381.
45. Kajukova L. A., Uzakova A. B., Baitursynova G. P., Dyusembayeva G. T., Shulgau Z. T., Gulyaev A. E., Sergazy Sh. D. Inhibition of α-Amylase and α-Glucosidase by New Derivatives of β-aminopropioamidoximes. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 2019;53(2):37–41. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-2-37-41.
46. Mamatha S. V., Mahesh B., Sagar B. K., Meenakshi S. K., Synthesis, characterization, crystal structure biological activity of 4-{2-[5-(4-fluoro-phenyl)-[1,3,4]oxadiazol-2-ylsulfanyl]-ethyl}-morpholine. *Journal of Molecular Structur.* 2019;1196:186–193. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.06.065.
47. Bhat M., Belagali S. L., Guanidinyl benzothiazole derivatives: synthesis and structure activity relationship studies of a novel series of potential antimicrobial and antioxidants. *Res. Chem. Intermed.* 2016;42(7):6195e6208. DOI: 10.1007/s11164-016-2454-6.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-55-60
УДК 615.014.21

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Влияние вспомогательных веществ и усилия прессования на содержание примеси N-(4-аминобензоил)-L-глутаминовой кислоты в препарате фолиевой кислоты в процессе хранения

Н. А. Образцова✉, **А. А. Самсонов, М. А. Ковтуненко, В. Н. Шмелева, Н. А. Голубева**

Научно-производственный комплекс АО «Валента Фарм», 141108, Россия, г. Щелково, Московская область, ул. Фабричная, д. 2

✉ **Контактное лицо:** Образцова Надежда Александровна. **E-mail:** Nadezhda.Obraztsova@valentapharm.com

ORCID: Н. А. Образцова – https://orcid.org/0000-0002-3239-9613; А. А. Самсонов – https://orcid.org/0000-0002-3557-3824;
М. А. Ковтуненко – https://orcid.org/0000-0002-1035-8239; В. Н. Шмелева – https://orcid.org/0000-0001-6973-0405; Н. А. Голубева – https://orcid.org/0000-0002-4065-8494.

Статья поступила: 09.03.2022 **Статья принята в печать:** 23.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Вспомогательные вещества (ВВ) – неотъемлемый компонент лекарственных препаратов (ЛП). В тоже время ВВ, содержащиеся в них примеси и сорбированная вода являются одной из причин деградации активной фармацевтической субстанции (АФС). Такое влияние ВВ особенно важно оценивать для склонных к гидролизу АФС. Фолиевая кислота (ФК) гидролизуется под действием УФ-облучения и основным продуктом разложения является N-(*n*-аминобензоил)глутаминовая кислота (примесь А). При разработке ЛП «Фолиевая кислота таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 1,0 мг» в процессе хранения нами было обнаружено увеличение содержания примеси А. Поскольку таблетки хранились в контурной ячейковой упаковке, состоящей из поливинилхлоридной пленки и алюминиевой фольги, в отсутствии УФ-облучения, причиной гидролиза ФК является состав таблеток и/или параметры процесса их получения.

Цель. Исследовать влияние ВВ, входящих в состав таблеток, и параметры технологического процесса их получения на содержание примеси А в процессе хранения ЛП фолиевой кислоты.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись таблетки ФК, содержащие 1,0 мг АФС. Таблетки ФК наработаны по технологии прямого прессования. Усилие прессования варьировали в диапазоне 5–15 кН.

Результаты и обсуждение. Установлено, что при хранении в течении 300 суток таблеток ФК, содержащих 93,0 % моногидрата лактозы, и полученных при усилии прессования выше 10 кН, содержание примеси А в них становится выше предельно допустимого. Возможно, лактоза одновременно выступает как в роли источника свободной воды, так и является катализатором реакции гидролиза ФК. Поскольку взаимодействие лактозы и ФК протекает в твердой фазе, рост давления прессования ускоряет гидролиз АФС за счет увеличения площади контакта частиц и их подвижности. Анализ бинарных смесей ФК с крахмалом, лактозой, микрокристаллической целлюлозой и коповидоном подтвердил, что наибольшее влияние на скорость гидролиза АФС оказывает лактоза.

Заключение. Вероятно, моногидрат лактозы, является основной причиной гидролиза ФК в исследуемых смесях. Независимо от механизма его действия увеличение усилия прессования выше 10 кН приводит к росту скорости гидролиза ФК. Нами был подобран оптимальный диапазон усилия прессования (5–10 кН) для таблеточных смесей, содержащих моногидрат лактозы и ФК.

Ключевые слова: фолиевая кислота, вспомогательные вещества, гидролиз, лактоза, усилие прессования, примесь

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

Вклад авторов. Н. А. Образцова – написание текста статьи. А. А. Самсонов, М. А. Ковтуненко – планирование и осуществление эксперимента. В. Н. Шмелева, Н. А. Голубева – постановка задачи. Все авторы участвовали в анализе полученных данных и обсуждении результатов.

Для цитирования: Образцова Н. А., Самсонов А. А., Ковтуненко М. А., Шмелева В. Н., Голубева Н. А. Влияние вспомогательных веществ и усилия прессования на содержание примеси N-(4-аминобензоил)-L-глутаминовой кислоты в препарате фолиевой кислоты в процессе хранения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):55–60. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-55-60

Influence of Excipients and Pressing Force on the Impurity Content of N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamic Acid in Folic Acid Drugs During Storage

Nadezhda A. Obraztsova✉, **Aleksey A. Samsonov, Maksim A. Kovtunenko, Varvara N. Shmeleva, Natalia A. Golubeva**

Scientific and production complex JSC "Valenta Pharm", 2, Fabrichnaya str., Schelkovo, Moscow region, 141108, Russia

✉ **Corresponding author:** Nadezhda A. Obraztsova. **E-mail:** Nadezhda.Obraztsova@valentapharm.com

ORCID: Nadezhda A. Obraztsova – https://orcid.org/0000-0002-3239-9613; Aleksey A. Samsonov – https://orcid.org/0000-0002-3557-3824;
Maksim A. Kovtunenko – https://orcid.org/0000-0002-1035-8239; Varvara N. Shmeleva – https://orcid.org/0000-0001-6973-0405;
Natalia A. Golubeva – https://orcid.org/0000-0002-4065-8494.

Received: 09.03.2022 **Revised:** 23.03.2023 **Published:** 25.05.2023

© Образцова Н. А., Самсонов А. А., Ковтуненко М. А., Шмелева В. Н., Голубева Н. А., 2023
© Obraztsova N. A., Samsonov A. A., Kovtunenko M. A., Shmeleva V. N., Golubeva N. A., 2023

Abstract
Introduction. Excipients, impurities contained in them, and sorbed water are one of the reasons for degradation of the active pharmaceutical substance (API). Excipients effect should be especially evaluated for moisture-sensitive APIs. Folic acid (FA) is an important vitamin for humans. It hydrolyze in water under the action of UV irradiation and main decomposition product is N-(p-aminobenzoyl)glutamic acid (impurity A). We found an increase in the content of impurity A during FA film-coated tablets storage in PVC-film and aluminum foil packaging in the absence of UV irradiation.
Aim. Investigate the effect of excipients and parameters of the production process on the content of impurity A during storage of FA drugs.
Materials and methods. The FA tablets containing 1.0 mg of API produced by direct compression technology were the objects of study. The pressing force (PF) was varied from 5 to 15 kN.
Results and discussion. We found that content of impurity A in tablets containing 93.0 % lactose monohydrate and obtained with PF above 10 kN exceeded limit value during storage for 300 days. Probably lactose simultaneously acts both as a source of free water and as a catalyst for FA hydrolysis. Since the interaction of lactose and FA occurs in the solid phase, pressing accelerates hydrolysis by increasing the contact area of substances and the mobility of water molecules.
Conclusion. We found that lactose monohydrate probably is the main cause of FA hydrolysis in drugs. Independently of the mechanism of its action, an increase in the PF above 10 kN leads to an increase in the rate of FA hydrolysis. This is due to an increase in the mobility of water molecules and the contact area between the excipient and API. We have selected the optimum pressure range (5–10 kN) for tablet mix containing lactose monohydrate and FA.

Keywords: folic acid, excipients, hydrolysis, lactose, pressing force, impurity

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. N. A. Obraztsova – writing the text of the article. A. A. Samsonov, M. A. Kovtunenko - planning and conduction an experiment. V. N. Shmeleva, N. A. Golubeva – statement of the problem. All authors participated in the analysis of the obtained data and discussion of the results.

For citation: Obraztsova N. A., Samsonov A. A., Kovtunenko M. A., Shmeleva V. N., Golubeva N. A. Influence of excipients and pressing force on the impurity content of N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamic acid in folic acid drugs during storage. *Drug development & registration*. 2023;12(2):55–60. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-55-60

ВВЕДЕНИЕ

Существует множество различных вспомогательных веществ (ВВ), которые используются для придания таблеточным смесям необходимых технологических характеристик [1]. В качестве индивидуальных химических соединений все ВВ достаточно хорошо изучены. Однако при разработке лекарственных препаратов (ЛП) необходимо проанализировать взаимодействие используемых ВВ между собой и с активной фармацевтической субстанцией (АФС). Учитывая, что ВВ могут составлять большую часть от всей таблеточной смеси, их влияние на характеристики ЛП будет значительным. Поэтому выбор ВВ является одним из важных этапов фармацевтической разработки.

Сами ВВ и реакционноспособные примеси, которые содержатся в них, могут способствовать разложению АФС. Наиболее распространенными соединениями, которые вызывают деградацию АФС, являются восстанавливающие сахара, альдегиды, гидропероксиды, органические кислоты и сложные эфиры, следовые количества металлов, нитраты/нитриты и свободные радикалы [2].

Лактоза широко используется как наполнитель при таблетировании. Она улучшает прессуемость и увеличивает прочность таблеток на раздавливание. Однако ее применение ограничено тем, что лактоза является восстанавливающим дисахаридом и вступает в реакцию Майяра с АФС, содержащими аминогруппу [3]. При этом, как отмечают авторы статьи [4], взаимодействие между АФС и ВВ может иметь сравнительно невысокую скорость. Так в ЛП, содержащем менее 75,0 % лактозы и АФС, которая является первичным амином, продукты реакции Майяра не были обнаружены в течение всего срока хранения (24 месяца) в условиях окружающей среды. В аналогичном ЛП, содержащем более 95,0 % лактозы, через 12 месяцев так же не фиксировали роста примесей. При этом к концу второго года их содержание было близко к предельно допустимому. Таким образом, краткосрочные исследования совместимости ВВ и АФС не всегда являются исчерпывающими и необходимы долгосрочные исследования.

В статье [5] была проанализирована несовместимость бисопролола фумарата и различных восстанавливающих углеводов, используемых в качестве наполнителей для таблеток. Наибольшую скорость реакции Майяра наблюдали в присутствии глюкозы. При этом магния стеарат, который широко применяется в качестве лубриканта, усиливал это взаимодействие. Комплекс ионов магния ускоряет перегруппировку Амадори. Наиболее подходящим наполнителем для таблеток, содержащих бисопролол фумарат, авторами работы [5] был выбран гидрофосфат кальция, который не вступает в реакцию Майяра.

Помимо ВВ, значительное влияние на стабильность АФС оказывает вода, которая в той или иной форме присутствует на всех этапах производства

и хранения ЛП [6]. Она может выступать в качестве участника реакций разложения (например, гидролиз АФС), в этом случае ее концентрация значительно влияет на стабильность и эффективность ЛП. В работе [7] оценивали степень гидролиза трихлорметиазида (ТХМ) в его бинарных смесях с различными ВВ (15 наиболее часто используемых). Было обнаружено, что содержание активного вещества больше всего снизилось в бинарной смеси с гидроксипропилцеллюлозой (ГПЦ). Однако, как отмечают авторы статьи, прямой зависимости между количеством воды, адсорбированной ВВ, и степенью гидролиза ТХМ не наблюдается. Более значимой является доступность сорбированной влаги, так как не вся вода, содержащаяся во ВВ, способна участвовать в реакциях гидролиза [8]. Методами ЯМР, ЭПР и спектроскопии диэлектрической релаксации в работе [7] определяли подвижность и количество связанной воды. На основе этих данных авторами было установлено, что скорость гидролиза ТХМ зависит от количества свободной воды, доступной для реакции.

Многие АФС склонны к гидролизу [9]. Среди них фолиевая кислота (ФК), которая является важным витамином для человека, а также применяется в составе таргетных систем доставки противоопухолевых препаратов [10–12]. Известно, что под действием УФ-облучения ФК склонна к гидролизу, при этом основным продуктом ее разложения является N-(*n*-аминобензоил)глутаминовая кислота (примесь А) [13].

При хранении ЛП «Фолиевая кислота таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 1,0 мг» нами было обнаружено увеличение содержания примеси А. Поскольку таблетки хранились в контурной ячейковой упаковке (КЯУ), состоящей из поливинилхлоридной пленки и алюминиевой фольги, в условиях отсутствия УФ-облучения, причиной гидролиза ФК является состав таблеток и/или параметры процесса их получения.

Цель данной работы исследовать влияние ВВ, входящих в состав таблеток, и параметры технологического процесса их получения на содержание примеси А в процессе хранения ЛП фолиевой кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись таблетки ФК, содержащие 1,0 мг АФС (таблица 1). Субстанция ФК была получена от производителя DSM Nutritional Products Ltd. (Швейцария). В качестве ВВ использовали: лактозы моногидрат (ALPAVIT Käserei Champignon Hofmeister GmbH & Co. KG, Германия), коповидон (Kollidon® VA 64, BASF, Германия), микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) (Heweten® 101, JRS Pharma GMbH & Co. KG, Германия), крахмал кукурузный прежелатинизированный (Крахмал 1500®, Colorcon Ltd., Англия), крахмал картофельный (Roquette Freres, Франция), двухосновный безводный фосфат кальция (EMCOMPRESS® Anhydrous, JRS Pharma GMbH & Co. KG, Германия), кремния диоксид коллоидный (AEROSIL® A 200, Evonik Operations GmbH, Германия), магния стеарат (Faci Metalest S.L.U., Испания). В сериях 3 и 4 использовали композитный наполнитель PROSOLV® EASYtab SP (JRS Pharma GMbH & Co. KG, Канада), который состоит из: МКЦ (95,0–98,0 %); коллоидного диоксида кремния (1,5–2,5 %); натрия крахмал гликолята (0,5–2,0 %); натрия стеарил фумарата (0,3–1,0 %).

Таблица 1. Составы таблеток, содержащих 1 мг фолиевой кислоты, и потеря в массе при высушивании для используемых вспомогательных веществ

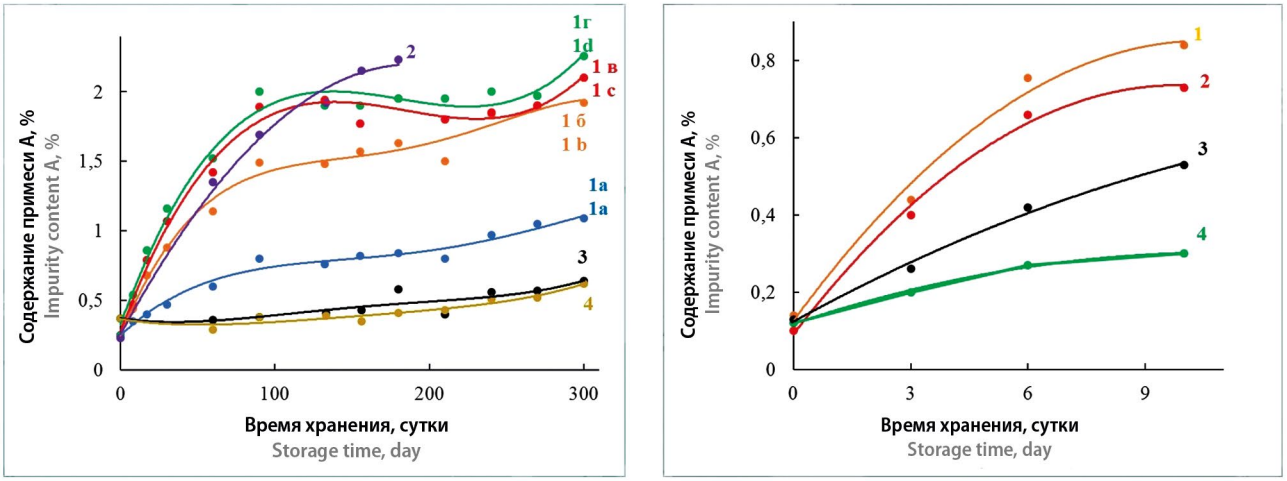
Table 1. Compositions of tablet containing 1 mg of folic acid, weight loss on drying for used excipients

Вспомогательное вещество Excipient	Содержание вспомогательного вещества на таблетку, % Excipient content per tablet, %				Потеря в массе при высушивании, % Weight loss on drying, %
	Серия 1 Series 1	Серия 2 Series 2	Серия 3 Series 3	Серия 4 Series 4	
PROSOLV® EASYtab SP	–	–	89,0	99,0	4,0
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	93,0	–	–	–	5,2
Крахмал прежелатинизированный Pregelatinized strach	–	21,0	10,0	–	9,5
Микрокристаллическая целлюлоза Microcrystall celulose	–	9,0	–	–	3,7
Двухосновный безводный фосфат кальция Dibasic anhydrous calcium phosphate	–	67,5	–	–	1,7
Коповидон Copovidone	5,0	–	–	–	2,0
Кремния диоксид коллоидный Silicon dioxide colloidal	0,5	0,5	–	–	–
Магния стеарат Magnesium stearate	0,5	1,0	–	–	–
Крахмал картофельный Potato starch	–	–	–	–	5,0

Таблетки ФК наработаны по технологии прямого прессования на таблетпрессе KORSCH XL 100 Pro (KORSCH AG, Германия). Усилие прессования варьировали в диапазоне 5–15 кН. Описанные выше образцы хранили в КЯУ при $T = 25 \pm 2$ °С и влажности 60 ± 5 %. Содержание примеси А определяли по методике из монографии Британской фармакопеи «Folic acid tablets»[1] на хроматографе Waters Alliance (Waters Corporation, США).

Для оценки взаимодействия АФС с отдельными ВВ были приготовлены бинарные смеси ФК с крахма-

[1] The British Pharmacopoeia. 2020. Available at: https://www.pharmacopoeia.com/ Accessed: 25.02.2022.



А
A

Б
B

Рисунок 1. Зависимости содержания примеси А от времени хранения:
А – для таблеток серии 1–4; Б – для бинарных смесей фолиевой кислоты с (1) лактозой, (2) картофельным крахмалом, (3) МКЦ, (4) коповидоном

Figure 1. Dependences of the impurity A content on the storage time:
A – for tablets of series 1 – 4; B – for binary mixtures of folic acid with (1) lactose, (2) potato starch, (3) MCC, (4) copovidone

Таблица 2. Значения усилия прессования для серий 1–4 и содержание примеси А в них

Table 2. Pressing force values for series 1–4 and impurity A content in them

Серия Series		1а 1a	1б 1b	1в 1c	1г 1d	2	3	4
Значение усилия прессования, кН Pressing force values, kN		5,0	10,0	13,0	15,0	15,0	15,0	13,0
Содержание примеси А через N суток, % Impurity A content after N days, %	90 суток 90 days	0,8	1,5	1,9	2,0	1,7	0,4	0,4
	300 суток 300 days	1,1	1,9	2,1	2,3	2,3	0,6	0,4

лом картофельным, лактозой, МКЦ и коповидоном в соотношении 1:1 (м/м). Смеси хранили при $T = 40 \pm 2$ °С и влажности 75 ± 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Таблетки ФК содержат только 1,0 % действующего вещества, поэтому основную массу таких таблеток составляют ВВ. Их выбор осложняется склонностью ФК к гидролизу. При разработке таблеток ФК состава, соответствующего серии 1, мы обнаружили, что увеличение силы прессования способствует росту содержания примеси А. В соответствии с Британской фармакопеей[1] 2020 ее содержание должно быть не более 2,0 %. Однако в ряде серий оно достигало (и даже превышало) предельно допустимое значение.

[1] The British Pharmacopoeia. 2020. Available at: https://www.pharmacopoeia.com/ Accessed: 25.02.2022.

Влияние состава и усилия прессования на увеличение содержания примеси А в таблетках фолиевой кислоты. Серия 1

Для серии 1 варьировали усилие прессования в диапазоне 5–15 кН (таблица 2). Анализ зависимостей содержания примеси А в таблетках, полученных при разных усилиях прессования, от времени хранения (рисунок 1) указывает на то, что сила прессования выше 10 кН является неподходящей. В этом случае содержание примеси достигает значения близкого к предельному уже в течение первых 90 суток. В то же время применение усилия прессования 5–10 кН позволяет получить ЛП, содержание примеси А в которых остается в рамках допустимого значения в течение 300 суток.

Обращает на себя внимание тот факт, что основной рост содержания примеси фиксировали в течение первых трех месяцев вне зависимости от величины усилия прессования (см. таблица 2). Вероятно,

гидролиз протекает за счет влаги, которая была привнесена со ВВ и/или адсорбирована таблетками в процессе их изготовления. По мере расходования имеющейся свободной воды скорость процесса гидролиза постепенно снижается, в результате чего мы фиксируем заметно меньший рост содержания примеси в следующие 210 суток.

Анализируя состав таблеток серии 1 (см. таблица 1), можно предположить, что моногидрат лактозы, преобладающий по процентному содержанию, является основной причиной роста примеси А. Возможны несколько механизмов влияния лактозы на гидролиз ФК.

Во-первых, лактоза может выступать в качестве катализатора этого процесса. Из литературы известно, что лактоза катализирует гидролиз роксифибана [14]. В работе [15] было показано, что нуклеофильная атака гидроксильными группами лактозы приводит к увеличению скорости гидролиза. Увеличение скорости гидролиза роксифибана с ростом концентрации лактозы указывает на ее каталитическое действие. При этом концентрация воды не оказывала заметного влияния на скорость процесса. При исследовании реакции гидролиза роксифибана в твердой фазе, было отмечено, что таблетирование усиливает химическое взаимодействие между лактозой и АФС. Увеличение взаимодействия в точках контакта частиц для фармацевтических препаратов было описано в работах [16, 17]. В случае с роксифибаном и лактозой в результате прессования наблюдали рост концентрации продуктов гидролиза в 4 раза, по сравнению с механической смесью этих веществ [14]. Вероятно, для таблеток ФК увеличение силы прессования также приводит к большему взаимодействию лактозы и ФК, что, в свою очередь, способствует гидролизу АФС.

Во-вторых, лактоза содержит адсорбированную воду (см. таблица 1), которая так же может вступать в реакцию с ФК. При этом процентное содержание лактозы значительно превышает содержание АФС. Следовательно, влаги, адсорбированной лактозой, вполне достаточно для гидролиза ФК. Увеличение давления прессования в этом случае так же будет способствовать реакции гидролиза. Разрушение части кристаллов ВВ и возникновение дефектов в них, в результате механического воздействия, увеличивает подвижность связанной воды. Аналогичное влияние подвижности молекул воды на скорость гидролиза ацетилсалициловой кислоты (АСК) было описано в статье [18]. Авторами было замечено, что несмотря на большее содержание воды в смесях АСК с лактозой, скорость гидролиза была выше в ее смесях с дигидратом двухосновного фосфата кальция, в котором молекулы воды имеют большую подвижность. Таким образом, в анализируемых таблетках ФК лактоза может одновременно выступать в роли источника свободной воды и катализатора реакции гидролиза, что приводит к значительному росту содержания примеси А в них.

Помимо этого, нужно учитывать влияние других ВВ, которые содержат влагу. Например, дезинтегранты являются гигроскопичными веществами. В работе [19] исследовали таблетки АСК, содержащие 50,0 % АФС и 5,0 % дезинтегранта (15 наименований). Установили, что наибольшая деградация характерна для таблеток, содержащих коповидон. Методом твердотельной спектроскопии ЯМР показано, что молекулярная подвижность воды, адсорбированной коповидонами, значительно выше, чем в других дезинтегрантах (например, низкозамещенной ГПЦ или кроскармелозе натрия).

В рассматриваемых таблетках ФК содержание коповидона также составляло 5,0 %. Поскольку данный дезинтегрант характеризуется высокой молекулярной подвижностью воды, следует учитывать, что он, возможно, способствует гидролизу ФК в ЛП наряду с лактозой.

Влияние состава на содержание примеси А в безлактозных таблетках фолиевой кислоты. Серии 2–4

Далее мы исследовали серии (2–4), в составе которых отсутствует моногидрат лактозы. Прессование проводили при усилии (см. таблица 2), которое было определено как неподходящее для смесей с лактозой. Это было сделано, чтобы оценить скорость накопления примеси А в безлактозных смесях в наихудших условиях. В серии 2 содержание примеси А росло достаточно быстро и уже через 180 суток оно превысило допустимое значение (2,23 %). В рассматриваемом составе основным источником влаги являлся частично прежелатинизированный крахмал (см. таблица 1). Из литературы [20] известно, что такой крахмал содержит большое количество свободной воды. По-видимому, этой влаги достаточно для гидролиза ФК при выбранных условиях.

Серии 3 и 4 содержали 89,0 и 99,0 % композитного наполнителя PROSOLV® (см. таблица 1). Для них был характерен незначительный рост содержания примеси А в течение 300 суток (см. рисунок 1, А). Вероятно, состав наполнителя и размер частиц в нем подобраны таким образом, что в данных условиях гидролиз ФК протекает медленно. Большую часть PROSOLV® составляет МКЦ (95,0–98,0 %), содержание воды в которой сильно зависит от степени кристаллличности. Возможно, размер частиц МКЦ в композите таков, что основная доля воды связана с молекулами целлюлозы и, как следствие, она не участвует в гидролизе ФК. В результате, несмотря на высокое содержание МКЦ относительно ФК, содержание примеси А в сериях 3 и 4 незначительно.

Исследование скорости гидролиза фолиевой кислоты в ее бинарных смесях с различными вспомогательными веществами

Для лучшего понимания процессов взаимодействия ФК со ВВ были проведены исследования на бинарных смесях. Из анализа приведенных на рисунке 1, Б зависимостей можно составить следующий ряд, в котором ВВ приведены в порядке уменьшения скорости гидролиза ФК в их присутствии: лактоза > крахмал > коповидон > МКЦ. По данным таблицы 1 составлен ряд, в котором аналогичные ВВ приведены в порядке уменьшения содержания воды в них: лактоза ~ крахмал > МКЦ > коповидон. Из представленных данных видно, что для лактозы и крахмала содержание воды в них коррелирует с их влиянием на скорость разложения ФК. В тоже время для МКЦ и коповидона не наблюдается такая зависимость. Вероятно, в коповидоне, как уже было отмечено ранее, молекулы воды обладают большей подвижностью, чем в МКЦ, что приводит к большему увеличению содержания примеси А.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассматривая взаимодействие ВВ и АФС, мы имеем дело с твердофазными реакциями. Как известно [21], для протекания таких реакций необходима подвижность элементов кристаллической решетки и возможность диффузии, которая увеличивается с ростом дефектов в кристаллах. Поэтому любое механическое воздействие будет способствовать взаимодействию твердых частиц друг с другом. Прессование таблеточной смеси приводит к частичному разрушению кристаллической структуры веществ. При этом, чем больше приложенное усилие, тем значительнее увеличивается подвижность частиц и площадь контакта между ними. Вероятно, поэтому увеличение силы прессования приводит к росту содержания примеси А в таблетках ФК.

Таким образом, в исследуемых таблеточных смесях основной причиной гидролиза ФК, вероятно, является моногидрат лактозы. При этом, независимо от механизма его действия, увеличение усилия прессования выше 10 кН приводит к росту скорости гидролиза ФК. Нами был подобран оптимальный диапазон усилия прессования (5–10 кН) для таблеточных смесей, содержащих моногидрат лактозы и ФК, при котором содержание примеси А в течение всего срока хранения будет оставаться в пределах допустимых значений.

Таким образом, при разработке ЛП, в состав которого входит АФС склонная к гидролизу, важно оценить влияние ВВ и технологических параметров получения ЛП на его стабильность в процессе хранения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kasymov I. D., Basevich A. V. Study of the technological properties of excipients in the development of the composition of orally dispersible tablets. *Drug development & registration*. 2021;10(4):46–53. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-46-53.
2. Zhang K., Pellett J. D., Narang A. S., Wang Y. J., Zhang Y. T. Reactive impurities in large and small molecule pharmaceutical excipients–A review. *Trends in Anal. Chem.* 2018;101:34–42. DOI: 10.1016/j.trac.2017.11.003.
3. Ghaderi F., Monajjemzadeh F. Review of the physicochemical methods applied in the investigation of the Maillard reaction in pharmaceutical preparations. *J. Drug Deliv. Sci. and Technol.* 2020;55:1–34. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.101362.
4. Chowdhury D. K., Sarker H., Schwartz P. Regulatory notes on impact of excipients on drug products and the Maillard reaction. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2018;19:965–969. DOI: 10.1208/s12249-017-0878-y.
5. Szalka M., Lubczak J., Naróg D., Laskowski M., Kaczmarski K. The Maillard reaction of bisoprolol fumarate with various reducing carbohydrates. *Eur J. Pharm. Sci.* 2014;59:1–11. DOI: 10.1016/j.ejps.2014.04.005.
6. Thakur T. S., Thakuria R. Crystalline multicomponent solids: An alternative for addressing the hygroscopicity issue in pharmaceutical materials. *Crystal Growth & Design*. 2020;20(9):6245–6265. DOI: 10.1021/acs.cgd.0c00654.
7. Teraoka R., Matsushima Y., Sugimoto I., Inoue K., Morita S., Kitagawa S. Effect of pharmaceutical excipients on the stability of trichlormethiazide tablets under humid conditions. *Chem. Pharm. Bull.* 2009;57(12):1343–1347. DOI: 10.1248/cpb.57.1343.
8. Chakravarty P., Nagapudi K. The importance of water-solid interactions in small molecule drug development: An industry perspective. *Trends in Anal. Chem.* 2021;140:165–181. DOI: 10.1016/j.trac.2021.116276.
9. Bhaskar R., Ola M., Agnihotri V., Chavan A., Girase H. Current trend in performance of forced degradation studies for drug substance and drug product's. *J. Drug Deliv. and Therap*. 2020;10(2-s):149–155. DOI: 10.22270/jddt.v10i2-s.4040.
10. Dcona M. M., Sheldon J. E., Mitra D., Hartman M. C. Light induced drug release from a folic acid-drug conjugate. *Bioorg. & Med. Chem. Letters*. 2017;27(3):466–469. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.12.036.
11. Krajcovicova S., Gucky T., Hendrychova D., Krystof V., Soural M. A Stepwise approach for the synthesis of folic acid conjugates with protein kinase inhibitors. *J. Org. Chem*. 2017;82(24):13530–13541 DOI: 10.1021/acs.joc.7b02650.
12. Wang D., Fan Z., Zhang X., Li H., Sun Y., Cao M., Wei G., Wang J. pH-Responsive self-assemblies from the designed folic acid-modified peptide drug for dual-targeting delivery. *Langmuir* 2021; 37(1):339–347. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c02930.
13. Attaf S. E., Hasan H. M. A. Effect of UV irradiation on folic acid drug. *J. Pharmacy and Pharm. Sci.* 2019;8(8):103–114. DOI: 10.20959/wjpps20198-14336.
14. Badawy S. I., Williams R. C., Gilbert D. L. Effect of different acids on solid-state stability of an ester prodrug of a IIb/IIIa glycoprotein receptor antagonist. *Pharm. Dev. Technol.* 1999;4(3):325–331. DOI: 10.1081/PDT-100101368.
15. Kallion R. B., Stella V. J. The nucleophilicity of dextrose, sucrose, sorbitol and mannitol with p-nitrophenyl esters in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 1990;66:149–155. DOI: 10.1016/0378-5173(90)90394-J.
16. Usui F., Carstensen J. T. Interactions in the solid state I: interactions of sodium bicarbonate and tartaric acid under compressed conditions. *J. Pharm. Sci.* 1985;74(12):1293–1297. DOI: 10.1002/jps.2600741209.
17. Schamme B., Couvrat N., Tognetti V., Delbreilh L., Dupray V., Dargent E., Coquerel G. Investigation of drug–excipient interactions in biclotymol amorphous solid dispersions. *Molec. Pharm.* 2018;15(3):1112–1125. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00993.
18. Ahlneck C., Lundgren P. Methods for the evaluation of solid state stability and compatibility between drug and excipient. *Act. Pharm. Suec.* 1986;22(5):305–314.
19. Ougia K., Okadaa K., Leongb K. H., Hayashic Y., Kumadac S., Onuki Y. Effect of the molecular mobility of water adsorbed by disintegrants on storage-induced hydrolytic degradation of acetylsalicylic acid incorporated into tablets under humid conditions. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2020;154:2–12. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105502.
20. Airaksinen S., Karjalainen M., Shevchenko A., Westermarck S., Leppänen E., Rantanen J., Yliruusi J. Role of water in the physical stability of solid dosage formulations. *J. Pharm. Sci.* 2005;94:2147–2165. DOI: 10.1002/jps.20411.
21. Gressl C., Brunsteiner M., Davis A., Landis M., Pencheva K., Scrivens G., Sluggett G., Wood G., Gruber-Woelfler H., Khinast J., Paudel A. Drug–excipient interactions in the solid state: The role of different stress factors. *Molec. Pharm.* 2017;14(12):4560–4571. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00677.

ФАРМА
КАЗАХСТАН И ЦЕНТРАЛЬНАЯ АЗИЯ

13–14 ИЮНЯ 2023
АСТАНА, КАЗАХСТАН

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС И ВЫСТАВКА

СТРОИТЕЛЬСТВО И МОДЕРНИЗАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЗАВОДОВ

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ:

Министерство Здравоохранения Казахстана

VOSTOCK CAPITAL
— 20 лет успеха —

+7 495 109 9 509 (Москва)
events@vostockcapital.com

WWW.PHARMAQAZAQSTAN.COM

КЛЮЧЕВЫЕ МОМЕНТЫ КОНГРЕССА

200+ РУКОВОДИТЕЛЕЙ КРУПНЕЙШИХ КОМПАНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ соберутся вместе на одной площадке для обсуждения наиболее острых вопросов в индустрии!

20+ ДОКЛАДОВ с уникальной информацией от руководителей ключевых компаний отрасли

20+ КРУПНЕЙШИХ ПРОЕКТОВ ЛИДЕРОВ ИНДУСТРИИ. Демонстрация развития фармацевтических предприятий, планы и проекты возведения новых мощностей в Казахстане

СТРОИТЕЛЬСТВО И МОДЕРНИЗАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЗАВОДОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ: меры государственной поддержки, иностранные инвестиции, новые и существующие проекты

ТЕХНОЛОГИИ. Новейшие технологии для строительства, модернизации и оснащения фармацевтических мощностей. Каковы основные этапы и задачи в оснащении фармацевтического производства?

CASE STUDIES: Развитие фармацевтических предприятий, планы и проекты возведения новых мощностей в Казахстане

СПЕЦИАЛЬНЫЙ ФОКУС! Технический круглый стол: современное оборудование и его внедрение, организация эффективного производства

ОПЫТ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ: ключевые особенности регистрации препаратов, вывод на рынок, правовые аспекты. С какими нюансами придется столкнуться при выводе нового препарата на рынок Казахстана? Наиболее значимые правовые аспекты в реализации нового препарата.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ И НОРМАТИВНЫЕ АСПЕКТЫ. На какие документы и акты необходимо обратить внимание при проектировании, планировке и строительстве фармацевтических мощностей? Как создать производство, соответствующее локальным и международным стандартам?

ВАЖНО! Экспертная дискуссия: возможность реализации полного цикла производства в Казахстане, необходимые меры для поддержки производителей

МЕЖДУНАРОДНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО. Какие перспективы и стратегии сотрудничества существуют для Казахстана в фармацевтической сфере? Реальные кейсы получения международных сертификатов, поиска дистрибьютеров и взаимодействия с ними

ЭКСКЛЮЗИВНАЯ ВЫСТАВКА И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕЗЕНТАЦИИ. Технологические презентации, роуд-шоу, специализированная выставка технологий, оборудования и услуг от мировых лидеров

30+ ЧАСОВ ДЕЛОВОГО И НЕФОРМАЛЬНОГО ОБЩЕНИЯ! Встречи один-на-один, деловые обеды, кофе-брейки, приветственный коктейль и многое другое

СРЕДИ ПОДТВЕРЖДЕННЫХ УЧАСТНИКОВ

СК-ФАРМАЦИЯ · DOLCE-PHARM · INTAS · DANHSON · ЗЕРДЕ ФИТО
ФКФК · ЗЕРДЕ GROUP · kyzylmay · PHYTO APIPHARM · GEDEON RICHTER
RADIKS · Remedy Group · MERRYMED FARM · NIKAPHARM качество стало доступным · belpharm Effectiveness and quality accessible

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72
УДК 615.074

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения

А. М. Полуянов[1, 2]✉, А. Кочуг[3], Л. С. Митрофанова[3], И. Д. Никитин[2], О. Ю. Вергасов[2], И. Е. Шохин[1], Е. Н. Фишер[2, 3]

[1] ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[3] ООО «Лаборатория фармацевтических исследований», 121205, г. Москва, тер. Сколково Инновационного Центра, Большой б-р, д. 42, стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Полуянов Андрей Михайлович. **E-mail:** a.poluyanov@cpha.ru

ORCID: А. М. Полуянов – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; А. Кочуг – https://orcid.org/0000-0003-1370-5846; Л. С. Митрофанова – https://orcid.org/0000-0002-1844-1344; И. Д. Никитин – https://orcid.org/0000-0001-8044-0548; О. Ю. Вергасов – https://orcid.org/0000-0003-2511-3418; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630; Е. Н. Фишер – https://orcid.org/0000-0002-6456-7669.

Статья поступила: 01.02.2023 **Статья принята в печать:** 02.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Таурин является непротеиногенной аминокислотой. Молекула участвует в липидном обмене, адсорбирует жирорастворимые витамины, а его конъюгаты с желчными кислотами способствуют эмульгированию жиров в кишечнике. Лекарственные препараты, в состав которых входит молекула таурина обладают антикатарактным, кардиотоническим, метаболическим действием, а также стимулируют регенерацию. Среди лекарственных форм, где в качестве действующего вещества выступает таурин есть твердая лекарственная форма – таблетки, покрытые пленочной оболочкой. Одним из методов оценки качества твердых лекарственных форм является тест сравнительной кинетики растворения. Широко распространенным методом количественно определения в рамках теста растворения является высокоэффективная хроматография с ультрафиолетовым детектированием, однако для таурина, не содержащего хромофорных групп в своей структуре, этот метод на прямую не применим. Для решения данной проблемы можно применить метод предколоночной дериватизации, в результате которой в структуру вводится фрагмент, обеспечивающий батохромный сдвиг в УФ-спектре исходного соединения.

Цель. Разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом высокоэффективной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения таблеток таурина дозировкой 250 и 500 мг.

Материалы и методы. Для анализа использовались препараты: таурин таблетки, покрытые пленочной оболочкой 250 мг и 500 мг, отечественного производства с действующим сроком годности. Тест сравнительной кинетики растворения проводили на приборе для теста «Растворение» DT 126 Light (ERWEKA GmbH, Германия). Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Детектирование проводилось при длине волны 254 нм после дериватизации молекулы таурина 4-толуолсульфонилхлоридом. Использовали колонку Shim-pack Velox C18 5 μm 4.6 × 150 мм (Shimadzu Corporation, Япония) и предколонку Shim-pack Velox C18 EXP Guard Column Cartridge 5 μm 4.6 × 5 мм (Shimadzu Corporation, Япония). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония).

Результаты и обсуждение. Подобраны оптимальные условия дериватизации таурина, разработана и валидирована методика количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках теста сравнительной кинетики растворения в трёх средах растворения: 0,1М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. При проведении валидации разработанной методики установлено, что валидационные характеристики находятся в пределах критериев приемлемости во всех средах растворения. Аналитический диапазон методики составил 0,05–1,2 мг/мл и позволяет применять разработанную методику для количественного определения в рамках теста сравнительной кинетики растворения таблеток с дозировкой 250 мг и 500 мг.

Заключение. Методика была апробирована в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. Во всех средах наблюдалось полное высвобождение у обеих дозировок (более 85 % к 30 минуте).

Ключевые слова: тест сравнительной кинетики растворения, ВЭЖХ-УФ, таурин, 4-толуолсульфонилхлорид, дериватизация, валидация

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

Вклад авторов. А. М. Полуянов и И. Е. Шохин придумали и разработали эксперимент. А. М. Полуянов, А. Кочуг и Л. С. Митрофанова провели исследование методом ВЭЖХ-УФ. А. М. Полуянов, А. Кочуг и Л. С. Митрофанова провели тест сравнительной кинетики растворения. А. М Полуянов, О. Ю. Вергасов, И. Д. Никитин участвовали в обработке данных. А. М. Полуянов, И. Д. Никитин и О. Ю. Вергасов участвовали в написании текста статьи. Е. Н. Фишер была руководителем данного исследования. В обсуждении результатов участвовали все авторы.

Для цитирования: Полуянов А. М., Кочуг А., Митрофанова Л. С., Никитин И. Д., Вергасов О. Ю., Шохин И. Е., Фишер Е. Н. Разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):62–72. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72

© Полуянов А. М., Кочуг А., Митрофанова Л. С., Никитин И. Д., Вергасов О. Ю., Шохин И. Е., Фишер Е. Н., 2023
© Poluyanov A. M., Kochug A., Mitrofanova L. S., Nikitin I. D., Vergasov O. Yu., Shohin I. E., Fisher E. N., 2023

Development, Validation and Approbation Analytical Method for the Quantitative Determination of Taurine by HPLC-UV Method in the Test of Comparative Dissolution Kinetics

Andrey M. Poluyanov[1,2]✉, Adrian Kochug[3], Lidia S. Mitrofanova[3], Ilya D. Nikitin[2], Oleg Yu. Vergasov[2], Igor E. Shohin[1], Elizaveta N. Fisher[2, 3]

[1] LLC "CPHA", 8, Simferopolskiy bulv., Moscow, 117638, Russia
[2] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[3] LLC "Laboratory of Pharmaceutical Research", 42/1, Bolshoi Boulevard, ter. Skolkovo Innovation Center, Moscow, 121205, Russia

✉ **Corresponding author:** Andrey M. Poluyanov. **E-mail:** a.poluyanov@cpha.ru

ORCID: Andrey M. Poluyanov – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; Adrian Kochug – https://orcid.org/0000-0003-1370-5846; Lidia S. Mitrofanova – https://orcid.org/0000-0002-1844-1344; Ilya D. Nikitin – https://orcid.org/0000-0001-8044-0548; Oleg Yu. Vergasov – https://orcid.org/0000-0003-2511-3418; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630; Elizaveta N. Fisher – https://orcid.org/0000-0002-6456-7669.

Received: 01.02.2023 **Revised:** 02.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Taurine is a non-proteinogenic amino acid. The molecule is involved in lipid metabolism, adsorbs fat-soluble vitamins, and its conjugates with bile acids contribute to the emulsification of fats in the intestine. Drugs, which include a taurine molecule, have anti-cataract, cardiotonic, metabolic effects, and also stimulate regeneration. Among the dosage forms, where taurine acts as an active substance, there is a solid dosage form – film-coated tablets. One of the methods for assessing the quality of solid dosage forms is a comparative dissolution kinetics test. High-performance chromatography with ultraviolet detection is a widely used method for quantification within the dissolution test, however, for taurine, which does not contain chromophore groups in its structure, this method is not directly applicable. To solve this problem, one can apply the method of pre-column derivatization, because of which an fragment is introduced into the structure, providing a bathochromic shift in the UV spectrum of the starting compound.

Aim. Development, validation and approbation analytical method for the quantitative determination of taurine by high-performance chromatography with ultraviolet detection as part of a test comparative kinetics dissolution of taurine tablets with a dosage of 250 and 500 mg.

Materials and methods. The following preparations were used for the analysis: taurine tablets, film-coated 250 mg and 500 mg, domestic production with a valid expiration date. The comparative dissolution kinetics test was carried out on a DT 126 Light instrument for the "Dissolution" test (ERWEKA GmbH, Germany). Chromatographic separation and detection were performed on a Nexera-i LC-2040 high-performance liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan) equipped with a column and sample thermostat, a degasser, an autosampler, and an ultraviolet detector. Detection was carried out at a wavelength of 254 nm after derivatization of the taurine molecule with 4-toluenesulfonyl chloride. Were used a Shim-pack Velox C18 5 µm 4.6 × 150 mm column (Shimadzu Corporation, Japan) and a Shim-pack Velox C18 EXP Guard Column Cartridge 5 µm 4.6 × 5 mm (Shimadzu Corporation, Japan). Primary data were processed using LabSolutions Single LC software (Shimadzu Corporation, Japan).

Results and discussion. The optimal conditions for taurine derivatization have been selected, and a method for the quantitative determination of taurine by HPLC-UV in test comparative kinetics dissolution in three dissolution media: 0.1M hydrochloric acid solution with pH 1.2, acetate buffer solution with pH 4.5, phosphate buffer solution with pH 6.8, as well as in the quality control medium – purified water has been developed and validated. During the validation of the developed methodology, it was found that the validation characteristics are within the acceptance criteria in 4 dissolution media. The analytical range of the method was 0.05–1.2 mg/mL and allows the developed method to be used for the quantitative determination of tablets with a dosage of 250 mg and 500 mg as part of the test comparative kinetics dissolution. The method was tested in 4 dissolution media, in all media, there was a complete release in both dosages (more than 85 % by 30 minutes).

Conclusion. The method was tested in three dissolution media: 0.1 M hydrochloric acid solution with pH 1.2, acetate buffer solution with pH 4.5, phosphate buffer solution with pH 6.8, as well as in the quality control medium – purified water. In all media, there was a complete release in both dosages (more than 85 % by 30 minutes).

Keywords: comparative dissolution kinetics test, HPLC-UV, taurine, 4-toluenesulfonyl chloride, derivatization, 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. Andrey M. Poluyanov and Igor E. Shohin invented and designed the experiment. Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug andLidia S. Mitrofanova analyze on HPLC-UV. Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug and Lidia S. Mitrofanova performed a comparative dissolution kinetics test. Andrey M. Poluyanov, Oleg Yu. Vergasov, Ilya D. Nikitin participated in data processing. Andrey M. Poluyanov, Ilya D. Nikitin and Oleg Yu. Vergasov participated in writing the text of the article. Elizaveta N. Fisher was the leader of this study. All authors participated in discussion of the results.

For citation: Poluyanov A. M., Kochug A., Mitrofanova L. S., Nikitin I. D., Vergasov O. Yu., Shohin I. E., Fisher E. N. Development, validation and approbation analytical method for the quantitative determination of taurine by HPLC-UV method in the test of comparative dissolution kinetics. *Drug development & registration*. 2023;12(2):62–72. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время лекарственные препараты на основе аминокислот и их производных имеют большую распространенность, что связано с их широким диапазоном фармакологической активности. В клинической практике препараты данной группы назначаются при комплексной терапии атеросклероза (гистидин), цирроза печени (метионин), инфаркта миокарда и инсульта (L–аргинин), болезни Паркинсона (бенсаразид, L-DOPA) и ряде других патологических состояний[1].

[1] Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/ Ссылка активна на 21.02.2023.

Одним из представителей упомянутого класса является таурин – β-аминосульфоновая кислота (рисунок 1). Данное вещество участвует в ряде физиологических процессов в организме человека: от регуляции пищеварения до передачи нервного импульса. Таурин участвует в липидном обмене, адсорбирует жирорастворимые витамины, входит в состав парных желчных кислот (таурохолевой, тауродезоксихолевой), способствующих эмульгированию жиров в кишечнике [1]. Отмечено действие таурина на нервную систему. Являясь агонистом глицина таурин снижает судорожную активность, связываясь с глициновыми рецепторами, т.е. является потенциальным антиконвульсантом [2]. В период развития мозга таурин влияет на клеточную миграцию, модулирует нейропередачу в синапсах и может ускорять развитие мозга, в противоположность глутаминовой кислоте, ГАМК и аспарагиновой кислоте, повышенные уровни которых замедляют развитие мозга [3, 4]. На данный момент обсуждаемая аминосульфоновая кислота применяется в терапии сахарного диабета 1-го и 2-го типов, сердечной недостаточности, катаракте и прочих заболеваниях.

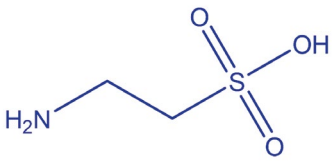


Рисунок 1. Структурная формула таурина

Figure 1. Structural formula of taurine

На российском рынке представлены лекарственные препараты в пяти лекарственных формах, действующим веществом которых является таурин. Одной из них является твердая лекарственная форма: таблетки, покрытые пленочной оболочкой. В число испытаний контроля качества данной лекарственной формы входит тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР), позволяющий оценить качество производимых серий лекарственных препаратов. В соответствии с нормативной документацией[1] количественное определение субстанции таурина проводится алкалиметрическим титрованием, однако этот метод неприменим для ТСКР по ряду причин. Во-первых, растворение проводится в средах, значение pH которых смещено от нейтрального. Во-вторых, титрование не поддается автоматизации и масштабированию в промышленных условиях.

Современным методом количественного определения малых молекул является ВЭЖХ-УФ, однако УФ-детектирование возможно только для молекул, содержащие хромофорные группы. Таурин не относится к их числу, однако это проблема может быть решена путем дериватизации исходного вещества. Для молекул, содержащих аминогруппу, возможна реакция тозилирования, при которой в структуру вводится арилсульфоновый фрагмент, обеспечивающий батохромный сдвиг в УФ-спектре исходного соединения (рисунок 2).

Целью исследование является разработка, валидация и апробация аналитической методики количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках проведения теста сравнительной кинетики растворения таблеток таурина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: хлористоводородная кислота концентрированная, класс «х.ч.» (ООО «Сигма Тек», Россия); уксусная кислота ледяная, класс «RFE, USP, BP, Ph. Eur.» (PanReac AppliChem, США); ортофосфорная кислота концентрированная, класс «х.ч.» (ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия гидроксид, класс «ч.д.а.» (ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия ацетат тригидрат, класс «х.ч.» (АО «ЛенРеактив», Россия); ацетонитрил, класс «HPLC-S gradient grade» (Biosolve Chimie, Франция); калия дигидрофосфат б/в, класс «ч.д.а.» (ООО «Компонент-Реактив», Россия); натрия дигидрофосфат моногидрат, класс «х.ч.» (Scharlab, Испания); натрия гидрофосфат б/в, класс «ч.д.а.» (АО «ЛенРеактив», Россия); борная кислота, класс «х.ч.» (АО «ЛенРеактив», Россия).

Вспомогательные вещества для приготовления раствора плацебо были предоставлены производителем таблеток.

Объектами анализа выступали препараты: таурин таблетки, покрытые пленочной оболочкой 250 мг и 500 мг, отечественного производства с действующим сроком годности.

В качестве стандартного образца использовался таурин, субстанция-порошок, содержание таурина 99,3 %, Россия, серия XP19053171, годен до 07.05.2022.

Дериватизатором выступал 4-толуосульфонилхлорид, субстанция-порошок, содержание 4-толуосульфонилхлорида 99,9 % (ООО «МНПК «Биотики», Россия, серия S7240326, годен до 10.10.2023).

Среды растворения готовили согласно Фармакопее Евразийского экономического союза. В качестве среды контроля качества (КК) выступала вода очищенная. Все полученные среды растворения фильтровали с помощью системы вакуумной фильтрации жидкостей и дегазировали с помощью вакуумного насоса.

Оборудование

Тест сравнительной кинетики растворения проводили на приборе для теста «Растворение» DT 126 Light (ERWEKA GmbH, Германия).

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание ФС.2.1.0039.15 «Таурин». Доступно по: https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol3/1593/ Ссылка активна на 21.02.2023.

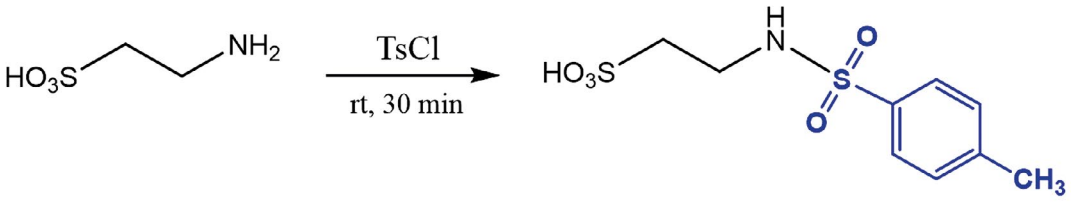


Рисунок 2. **Схема дериватизации таурина 4-толуолсульфонилхлорид**

Figure 2. **Scheme of taurine derivatization with tosyl chloride**

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и ультрафиолетовым детектором. Использовали колонку Shim-pack Velox C18 5 μm 4.6 × 150 мм (Shimadzu Corporation, Япония) и предколонку Shim-pack Velox C18 EXP Guard Column Cartridge 5 μm 4.6 × 5 мм (Shimadzu Corporation, Япония).

Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония).

Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическая колонка: Shim-pack Velox C18 5 μm 4.6 × 150 мм (Shimadzu Corporation, Япония)

Предколонка: Shim-pack Velox C18 EXP Guard Column Cartridge 5 μm 4.6 × 5 мм (Shimadzu Corporation, Япония).

Температура термостата: 40 °C.

Подвижная фаза: буферный раствор pH 5,5 (элюент A); ацетонитрил (элюент B).

Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин.

Градиент состава подвижной среды представлен на рисунке 3.

Объем вводимой пробы: 5 мкл.

Время удерживания деривата таурина: 3,3 мин.

Время регистрации хроматограммы: 7 минут.

Детектирование: УФ-детектор с длиной волны поглощения 254 ± 2 нм

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пробоподготовка

В качестве потенциальных дериватизаторов рассматривались вещества, взаимодействующие с аминокислотами с образованием хромофорсодержащих продуктов. К их числу относятся 4-толуолсульфонилхлорид, *о*-фталевый альдегид и нингидрин (рисунок 4). Применение *о*-фталевого альдегида требует наличия в качестве реагентов также 3-меркаптопропионовой кислоты и дорогостоящего флуоренилметоксикарбонилхлорида [5]. Ключевым минусом использования в качестве дериватизатора нингидрина является длительность протекания процесса. К тому же данную реакцию проводят при нагревании [6]. В данном исследовании дериватизатором был выбран 4-толуолсульфонилхлорид ввиду его высокой реакционной способности, низкой цены и способности образовывать устойчивые комплексы с молекулой таурина [7].

Для поддержания оптимального значения pH использовался боратный буферный раствор с pH 9,0. Экспериментально было подтверждено, что данный буфер сохранял значение pH после добавления каждой из используемых сред растворения.

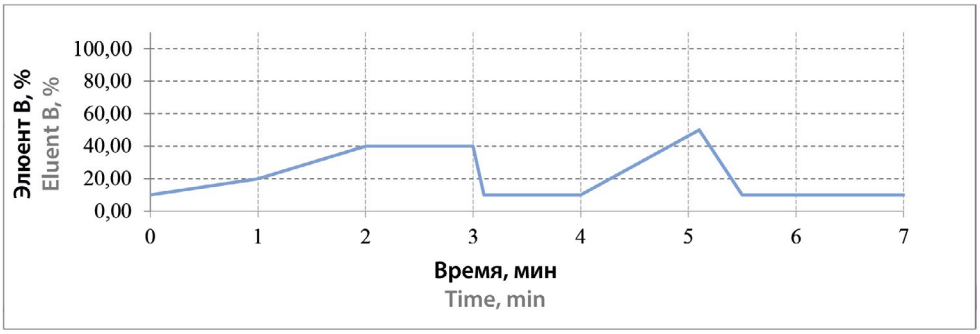
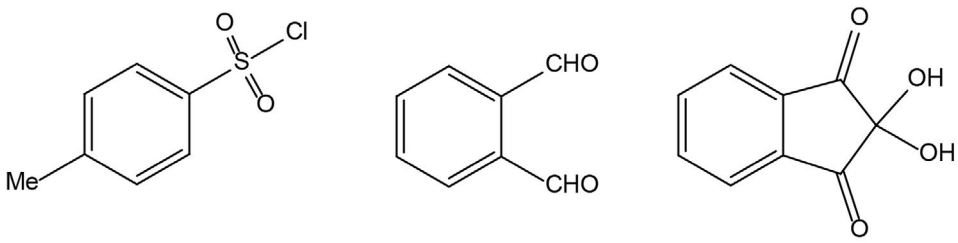


Рисунок 3. **Градиент состава подвижной фазы**

Figure 3. **Gradient of the composition of the mobile phase**



А
A

Б
B

В
C

Рисунок 4. Структурные формулы дериватизаторов.
А – 4-толуолсульфонилхлорид; Б – о-фталевый альдегид; В – нингидрин

Figure 4. Structural formulas of derivatizers.
A – 4-toluenesulfonyl chloride; B – o-phthalaldehyde; C – ninhydrin

В качестве стоп-реактива была выбран 42,5%-й раствор ортофосфорной кислоты, для него подобран оптимальный объем, добавляемый к пробе [8]. Концентрация раствора была выбрана таким образом, что смещение значения pH в кислую сторону до значения pH 2,0 происходило при добавлении в смесь: боратный буферный раствор – любая из используемых сред растворения.

Были определены время и скорость центрифугирования растворов после добавления боратного буферного раствора, после добавления дериватизатора, а также после добавления стоп-реактива [9].

Разработка хроматографической методики

Определения подлинности и количественного содержания осуществлялось метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для детектирования исследуемого вещества применялся ультрафиолетовый детектор с предварительным проведением предколоночной дериватизации, что позволило детектировать пики производного таурина за счет наличия хромофорных групп в строении дериватизатора.

В процессе разработки методики, исходя из физико-химических свойств определяемых веществ, была выбрана хроматографическая колонка Shim-pack Velox C18 5 μm 150 × 4,6 мм (таблица 1).

Условия хроматографического разделения были подобраны экспериментально, опираясь на статьи [10], затем доработаны под необходимые требования, из-за ряда особенностей: низкое разрешение между пиками дериватизатора и деривата из-за близкого значения липофильности, сходные времена удерживания определяемого вещества с несорбируемыми компонентами вспомогательных веществ лекарственной формы, а также низкая элиирующая сила подвижной фазы в изократическом режиме, приводящая к постепенном накоплению вещества в хроматографической колонке, что негативно сказывалось на чувствительности и точности при рутинном анализе большого количества проб в рамках ТСКР.

Таблица 1. Физико-химические свойства

Table 1. Physical and chemical properties

Свойства Properties	**Значения** Values
Растворимость в воде, мг/мл Solubility in water, mg/ml	105
Log P (вода – октанол) Log P (water – octanol)	–3,36
pKa (наиболее выраженного кислотного центра) pKa (the most pronounced acid center)	1,5
pKa (наиболее выраженного основного центра) pKa (the most pronounced main center)	9,34
pI (изоэлектрическая точка в растворе) pI (isoelectric point in solution)	5,12
Значение pH водного раствора таурина The pH value of an aqueous solution of taurine	4,8–6,0

Валидация методики

Валидацию методики проводили согласно Решению Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» приложение 7, раздел 2, пункт 20, валидация методик ТСКР по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, точность и прецизионность, робастность, стабильность; а также Решению Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».

Специфичность

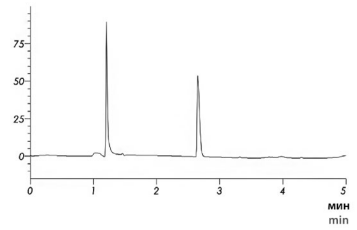
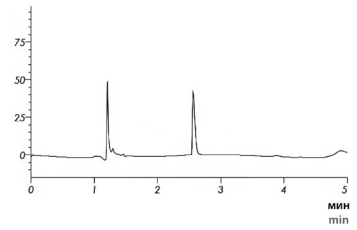
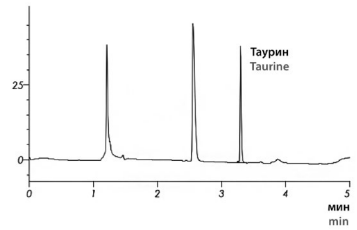
Для оценки специфичности изучали модельные растворы, раствор плацебо, раствор дериватизатора, раствор стоп-реактива, раствор АФИ таурина. Для каждой среды растворения были приготовлены перечисленные растворы.

Было установлено, что на хроматограммах растворов: плацебо, сред растворения, стоп-реактива, дериватизатора и их смеси, а также раствора стандарт-

ного образца таурина отсутствуют пики со временем удерживания продукта дериватизации таурина, и как следствие – методика является специфичной. Полученные хроматограммы представлены в таблице 2.

Таблица 2. Вид хроматограмм стандартных образцов с указанием времени удерживания компонентов

Table 2. Type of chromatogram of standard samples indicating the retention time of components

Образец Sample	Хроматограмма Chromatogramm
Раствор плацебо, дериватизатора и стоп-реактива Solution of placebo, derivatizer and stop reagent	
Раствор дериватизатора и стоп-реактива Solution of derivatizer and stop reagent	
Испытуемый раствор с добавлением дериватизатора и стоп-реактива Test solution with added derivatizer and stop reagent	

Линейность

Калибровочные и тестовые растворы готовили в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной, в трех повторностях для 9 калибровочных уровней, охватывающих диапазон для двух дозировок лекарственных препаратов на уровне 10, 20, 40, 100 и 120 % от номинального содержания таурина в таблетке дозировкой 250 и 500 мг.

В каждый раствор добавлялся боратный буферный раствор, образцы центрифугировали в течение 3 минут при скорости 3000 об/мин, затем вносили дериватизатор в количестве, указанном в таблице 3. Через равные промежутки времени после добавления дериватизатора в каждый образец добавлялся раствор стоп-реактива, чтобы остановить реакцию.

В ходе валидации было выполнено 4 аналитических цикла. В состав аналитического цикла включались калибровочные растворы и исследуемые растворы. Для каждого была построена линейная зависимость (рисунок 5).

Расчет относительной погрешности (*E*, %) проводили при помощи валидированного программного обеспечения для работы на высокоэффективном жидкостном хроматографе Shimadzu LC-2040C Plus с УФ-детектором (Shimadzy OpenLab, Япония). Относительная погрешность (*E*, %) концентраций калибровочных растворов должна укладываться в диапазон от –15 до +15 % на нижнем уровне, в диапазон от –10 до +10 % – для остальных точек. Полученные данные представлены в таблице 4.

Таблица 3. Приготовление калибровочных растворов и тест-растворов таурина

Table 3. Preparation of calibration solutions and test solutions of taurine

Калибровочный уровень Calibration level	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$V_{исх.}$, мл $V_{ref.}$, ml	1	2	4	8	10	12	16	20	24
Концентрация, мг/мл Concentration, mg/ml	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1	1,2
Концентрация, % от номинала дозировки 250 мг Concentration, % of nominal dosage 250 mg	10	20	40	80	100	120	–		
Концентрация, % от номинала дозировки 500 мг Concentration, % of nominal dosage 500 mg	–	10	20	40	50	60	80	100	120
Объем боратного буферного раствора pH 9,0, мкл Volume of borate buffer pH 9.0, µl	900								
Объем модифицирующего раствора, мкл Volume of modifying solution, µl	30								
Оъем стоп-реагента, мкл Stop reagent volume, µl	15								
Масса плацебо, мг Placebo weight, mg	10	–		20	10/20	10	–		20
№ тест раствора № test solution	1	–		2	3/4	5	–		6

Таблица 4. **Калибровочные растворы для оценки линейности**

Table 4. **Calibration solutions for linearity estimation**

Калибровочный уровень Calibration level	% от номинала дозировки 250 мг % of nominal dosage 250 mg	% от номинала дозировки 500 мг % of nominal dosage 500 mg	Концентрация номинальная, мг/мл Nominal concentration, mg/ml	Концентрация рассчитанная, мг/мл Calculated concentration, mg/ml				*E*, %				Критерий приемлемости Acceptability criteria
				КК (QC)	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	КК (QC)	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	
1	10	–	0,05	0,049	0,045	0,047	0,05	–2,7	–9,7	–5,7	–0,2	Не более 15 % No more than 15 %
2	20	10	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	–2,8	0,3	3,6	–4,1	Не более 10 % No more than 10 %
3	40	20	0,2	0,20	0,21	0,20	0,20	1	2,9	1,6	–4,8	
4	80	40	0,4	0,42	0,41	0,41	0,41	4,7	2	2,7	3,4	
5	100	–	0,5	0,48	0,51	0,52	0,51	–4,8	2	4,1	1,7	
6	120	–	0,6	0,62	0,58	0,56	0,57	4	–3,6	–0,5	–4,5	
7	–	80	0,8	0,79	0,82	0,78	0,83	–1,1	2,3	–2,9	3,3	
8	–	100	1	0,98	0,96	0,98	1,02	–3,3	–4,1	–2	1,7	
9	–	120	1,2	1,23	1,23	1,22	1,18	2,1	2,1	1,8	–2	Не более 15 % No more than 15 %

Примечание. *E*, % – относительная ошибка определения. *E*, % – relative error of determination.

Note. *E*, % – relative error of determination. *E*, % – relative error of determination.

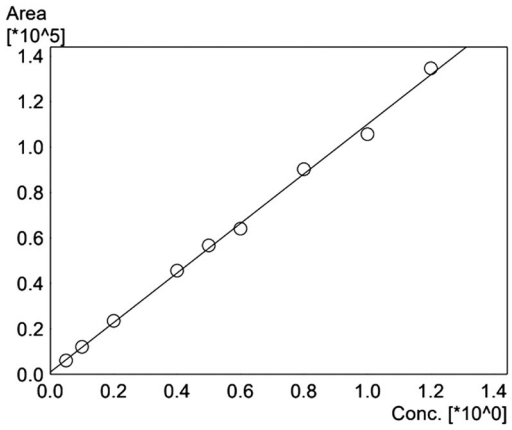


Рисунок 5. **Калибровочный график зависимости отношения площади пика таурина к концентрации**

Figure 5. **Calibration graph of the ratio of the area of the taurine peak to the concentration**

Дополнительно были рассчитаны концентрации таурина в калибровочных растворах при помощи таблиц Excel, построены уравнения линейных зависимостей площадей пика таурина от концентрации его растворов, определены значения коэффициентов корреляции этих зависимостей, тангенса угла наклона градуировочной кривой, длина отрезка по оси y, а также отклонения рассчитанных по уравнениям значений концентраций от введенных в эти растворы, проведенные расчеты приведены в таблице 5.

Для всех изученных циклов линейность методики является удовлетворительной, так как величина коэффициента корреляции полученных зависимостей больше 0,99, а рассчитанные по уравнениям количества таурина отличаются от введенных менее, чем на 10 % (менее, чем на 15 % для нижнего предела линейности).

Точность и прецизионность

Точность методики оценивали по результатам анализа тест-растворов, содержащих определенные (введенные) количества таурина и плацебо препарата.

В каждый тест-раствор добавляли одинаковое количество плацебо, в расчете на номинальную концентрацию таурина в 1 таблетке. Плацебо таблеток готовили в соответствии с составом препарата, растирая смесь вспомогательных компонентов в указанном в таблице 6 соотношении в фарфоровой ступке.

Готовили по три серии тест-растворов для каждой дозировки, последовательно используя в качестве растворителя одну из 4 сред растворения.

Анализ валидационных образцов проводили в рамках 4 последовательностей по 6 образцов для каждого уровня. Точность и прецизионность были оценены внутри цикла (последовательность 1) и между двумя циклами (последовательности 1 и 2). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклоне-

Таблица 5. **Оценка линейности**

Table 5. **Linearity estimation**

Среда растворения Dissolution medium		Коэффициент корреляции (R) Correlation coefficient (R)	Тангенс угла наклона градуировочной кривой (k) Tangent of the slope of the calibration curve (k)	Длина отрезка по оси y (b) The length of the segment along the y-axis (b)	Уравнение линейной зависимости $y = kx + b$ Linear equation $y = kx + b$
КК QC	Среднее значение Average value	0,9987	96121	5377	$y = 96121x + 5377$
	Калибровочная кривая № 1 Calibration curve № 1	0,9986	95557	5595	$y = 95557x + 5595$
	Калибровочная кривая № 2 Calibration curve № 2	0,9985	96425	5107	$y = 96425x + 5107$
	Калибровочная кривая № 3 Calibration curve № 3	0,9985	96380	5429	$y = 96380x + 5429$
pH 1,2	Среднее значение Average value	0,9988	102339	–476	$y = 102339x - 476$
	Калибровочная кривая № 1 Calibration curve № 1	0,9970	101448	–441	$y = 101448x - 476$
	Калибровочная кривая № 2 Calibration curve № 2	0,9994	100992	–211	$y = 100992x - 211$
	Калибровочная кривая № 3 Calibration curve № 3	0,9983	104577	–777	$y = 102339x - 777$
pH 4,5	Среднее значение Average value	0,9997	89172	3946	$y = 89172x + 3946$
	Калибровочная кривая № 1 Calibration curve № 1	0,9994	88570	4351	$y = 88570x + 4351$
	Калибровочная кривая № 2 Calibration curve № 2	0,9998	89017	3868	$y = 89017x + 3868$
	Калибровочная кривая № 3 Calibration curve № 3	0,9996	89931	3618	$y = 89931x + 3618$
pH 6,8	Среднее значение Average value	0,9992	99698	4438	$y = 99698x + 4438$
	Калибровочная кривая № 1 Calibration curve № 1	0,9989	99140	4483	$y = 99140x + 4483$
	Калибровочная кривая № 2 Calibration curve № 2	0,9991	100008	4540	$y = 100008x + 4540$
	Калибровочная кривая № 3 Calibration curve № 3	0,9994	99945	4291	$y = 99945x + 4291$

ния (RSD, %) и средний процент открываемости методики ($Z_{ср.}$, %), приведенные в таблице 7.

Полученные результаты позволяют судить, что прецизионность и точность методики анализа удовлетворительна, поскольку относительное стандартное отклонение для каждой из изученных концентраций таурина не превышает установленное значение 4 %, а открываемость содержания деривата таурина не выходит за пределы интервала 98,0–102,0 %.

Робастность

Робастность аналитической методики оценивается путем сравнения растворов известной концентрации, проанализированных при преднамеренном малом изменении трех разных параметров анализа. В таблице 8 представлен расчет влияния колебания таких параметров, как: скорость потока, температура колоночного термостата и длина волны УФ-детектора.

Таблица 6. **Состав таблеток таурина**

Table 6. **Composition of taurine tablets**

Наименование компонента Component name	Количество, мг Quantity, mg	
	На 1 таблетку дозировкой 250 мг For 1 tablet with a dosage of 250 mg	На 1 таблетку дозировкой 500 мг For 1 tablet with a dosage of 500 mg
Таурин Taurine	250	500
Целлюлоза микрокристаллическая Cellulose microcrystalline	23	46
Крахмал картофельный Potato starch	18	36
Желатин Gelatin	6	12
Кремния диоксид коллодный (аэросил) Silicon dioxide colloidal (aerosil)	0,3	0,6
Кальция стеарат calcium stearate	2,7	5,4
Итого, мг Total, mg	300	600
Итого, мг плацебо Total, mg placebo	50	100

Согласно результатам, робастность методики анализа удовлетворительна, поскольку относительное стандартное отклонение для каждого из изученных параметров не превышает установленное значение 4 %.

Стабильность

Стабильность растворов оценивали по изменению концентраций анализируемых растворов (или соответствующих площадей пиков), используя для сравнения образцы 100 % уровня концентрации от номинала для дозировки 250 мг через 24 часа после их приготовления при комнатной температуре и при нагревании при 37 °С в сушильном шкафу, что моделирует условия термостатирования стаканов в тестере растворения. Полученные результаты представлены в таблице 9.

Относительное стандартное отклонение для растворов не превышало 5 %. Согласно полученным результатам, тест-растворы стабильны в течение 24 часов после их приготовления в условиях при комнатной температуре и при температуре 37 °С в сушильном шкафу, что имитирует нагревание в тестере растворения.

Таблица 7. **Точность и прецизионность методики (inter-day, intra-day)**

Table 7. **Accuracy and precision of the methodology (inter-day, intra-day)**

Введено мг/мл Introduced mg/ml	Найдено (мг/мл), среднее значение Found (mg/ml), mean		$Z_{ср.}$, % $Z_{av.}$, %	RSD, %	
	inter-day	intra-day		inter-day	intra-day
Среда контроля качества (вода очищенная) *Quality control medium (purified water)*					
0,05	0,05	0,05	97,87	0,90	0,83
0,40	0,40	0,38	98,42	1,31	1,64
0,50	0,51	0,51	102,13	1,14	0,55
0,50	0,51	0,51	101,93	0,88	0,43
0,60	0,58	0,58	97,33	0,43	1,64
1,20	1,19	1,15	99,36	1,73	2,01
Раствор хлористоводородной кислоты pH 1,2 *Hydrochloric acid solution pH 1.2*					
0,05	0,05	0,05	102,00	0,73	2,90
0,40	0,41	0,42	101,92	0,90	2,03
0,50	0,51	0,51	102,07	0,54	0,24
0,50	0,49	0,47	97,80	0,65	1,85
0,60	0,59	0,58	98,39	2,03	1,81
1,20	1,20	1,19	100,28	0,80	1,54
Ацетатный буферный раствор pH 4,5 *Acetate buffer pH 4.5*					
0,05	0,05	0,05	100,00	0,91	0,15
0,40	0,41	0,39	101,92	2,10	3,53
0,50	0,52	0,50	103,73	2,14	1,34
0,50	0,53	0,49	104,27	2,23	1,05
0,60	0,61	0,59	102,50	1,31	1,57
1,20	1,21	1,20	100,83	1,94	0,98
Фосфатный буферный раствор pH 6,8 *Phosphate buffer solution pH 6.8*					
0,05	0,05	0,05	96,67	1,18	2,01
0,40	0,39	0,38	96,92	1,31	1,60
0,50	0,49	0,50	97,40	1,78	1,97
0,50	0,49	0,49	96,93	1,00	1,22
0,60	0,60	0,59	100,28	0,79	0,73
1,20	1,20	1,20	100,11	0,94	0,30

Примечание. $Z_{ср.}$, % – открываемость. RSD, % – относительное стандартное отклонение.

Note. $Z_{av.}$, % – openness. RSD, % – relative standard deviation.

Таблица 8. **Расчет робастности**

Table 8. **Calculation of robustness**

Параметры анализа Analysis parameters		Концентрация, мг/мл Concentration, mg/ml			
		pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	КК
Скорость потока, мл/мин Flow rate ml/min	0,9	0,511	0,518	0,509	0,510
	1	0,501	0,503	0,507	0,502
	1,1	0,507	0,502	0,509	0,501
RSD, %		0,99	1,77	0,23	0,98
Температура колоночного термостата, °С Column oven temperature, °C	38	0,503	0,506	0,501	0,499
	40	0,507	0,514	0,507	0,502
	41	0,519	0,518	0,509	0,511
RSD, %		1,63	1,19	0,82	1,24
Длина волны детектора, нм Detector wavelength, nm	253	0,511	0,510	0,502	0,502
	254	0,507	0,503	0,501	0,506
	255	0,506	0,502	0,507	0,501
RSD, %		0,52	0,86	0,64	0,53

Таблица 9. **Расчет стабильности**

Table 9. **Stability calculation**

Условия хранения Storage terms	Концентрация, мг/мл Concentration, mg/ml	RSD, %
Среда растворения вода очищенная (среда контроля качества) *Dissolution medium purified water (quality control medium)*		
Хранение при температуре 37 °С Storage at 37 °C	0,515	0,4
	0,515	
Хранение при комнатной температуре Storage at room temperature	0,504	0,6
	0,505	
Среда растворения 0,1 М хлористоводородная кислота pH 1,2 *Dissolution medium 0.1 M hydrochloric acid pH 1.2*		
Хранение при температуре 37 °С Storage at 37 °C	0,518	0,7
	0,507	
Хранение при комнатной температуре Storage at room temperature	0,501	1,0
	0,499	
Среда растворения ацетатный буферный раствор pH 4,5 *Dissolution medium Acetate buffer pH 4.5*		
Хранение при температуре 37 °С Storage at 37 °C	0,493	2,2
	0,499	
Хранение при комнатной температуре Storage at room temperature	0,501	1,6
	0,504	
Среда растворения фосфатный буферный раствор pH 6,8 *Dissolution medium Phosphate buffer pH 6.8*		
Хранение при температуре 37 °С Storage at 37 °C	0,501	2,2
	0,507	
Хранение при комнатной температуре Storage at room temperature	0,489	1,4
	0,49	

Результаты валидации подтверждают пригодность методики для поставленных аналитических задач, а именно: проведение ТСКР в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. Аналитический диапазон методики составил 0,05–1,2 мг/мл.

Применение разработанной методики

На основе разработанной методики был проведен ТСКР таблеток таурина дозировкой 250 и 500 мг. Полученные профили представлены на рисунках 6–9.

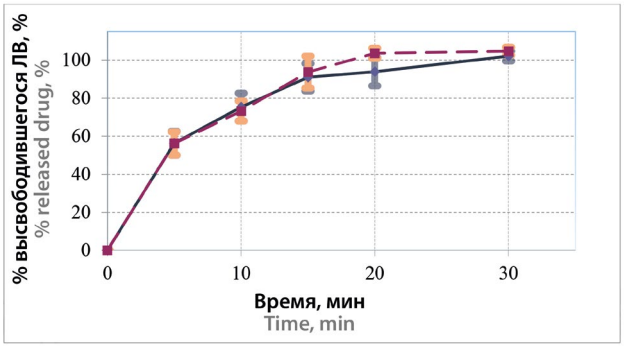


Рисунок 6. **Усредненные профили растворения таурина в лекарственных средствах «Таурин, таблетки, 250 мг» и «Таурин, таблетки, 500 мг» в среде вода очищенная (среда контроля качества).**

На графике отображены стандартные отклонения (SD) значений высвобождения ДВ в каждой временной точке. Синий цвет – дозировка 250 мг, красный цвет – дозировка 500 мг

Figure 6. **Averaged profiles of Taurine dissolution in drug "Taurine, tablets, 250 mg" and "Taurine, tablets, 500 mg" in purified water (quality control medium).**

The graph displays the standard deviations (SD) of the DV release values at each time point. Blue color – dosage of 250 mg, red color – dosage of 500 mg

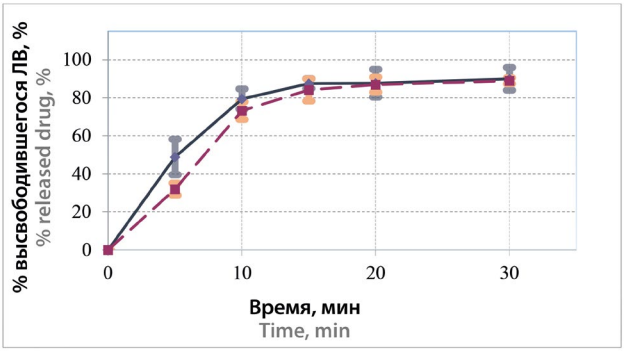


Рисунок 7. **Усредненные профили растворения таурина в лекарственных средствах «Таурин, таблетки, 250 мг» и «Таурин, таблетки, 500 мг» в среде раствора хлористоводородной кислоты pH 1,2.**

На графике отображены стандартные отклонения (SD) значений высвобождения ДВ в каждой временной точке. Синий цвет – дозировка 250 мг, красный цвет – дозировка 500 мг

Figure 7. **Averaged profiles of Taurine dissolution in drug "Taurine, tablets, 250 mg" and "Taurine, tablets, 500 mg" in the medium of hydrochloric acid solution pH 1,2.**

The graph displays the standard deviations (SD) of the DV release values at each time point. Blue color – dosage of 250 mg, red color – dosage of 500 mg

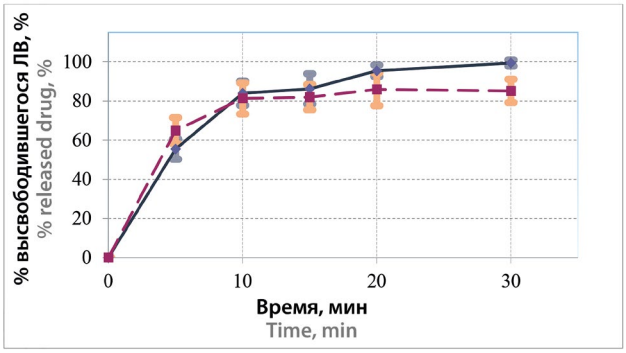


Рисунок 8. Усредненные профили растворения таурина в лекарственных средствах «Таурин, таблетки, 250 мг» и «Таурин, таблетки, 500 мг» в среде ацетатного буферного раствора pH 4,5.

На графике отображены стандартные отклонения (SD) значений высвобождения ДВ в каждой временной точке. Синий цвет – дозировка 250 мг, красный цвет – дозировка 500 мг

Figure 8. Averaged profiles of Taurine dissolution in drug "Taurine, tablets, 250 mg" and "Taurine, tablets, 500 mg" in an acetate buffer solution pH 4.5.

The graph displays the standard deviations (SD) of the DV release values at each time point. Blue color – dosage of 250 mg, red color – dosage of 500 mg

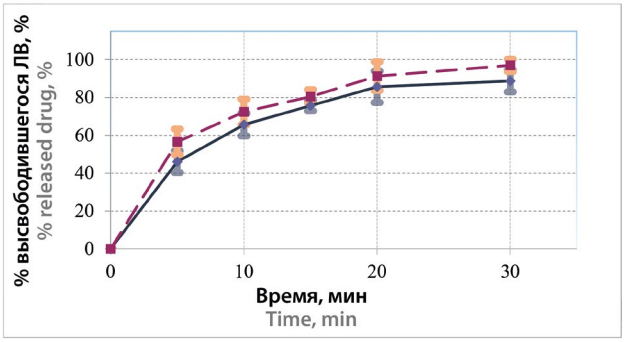


Рисунок 9. Усредненные профили растворения таурина в лекарственных средствах «Таурин, таблетки, 250 мг» и «Таурин, таблетки, 500 мг» в среде фосфатного буферного раствора pH 6,8.

На графике отображены стандартные отклонения (SD) значений высвобождения ДВ в каждой временной точке. Синий цвет – дозировка 250 мг, красный цвет – дозировка 500 мг

Figure 9. Averaged profiles of Taurine dissolution in drug "Taurine, tablets, 250 mg" and "Taurine, tablets, 500 mg" in a medium of phosphate buffer solution pH 6.8.

The graph displays the standard deviations (SD) of the DV release values at each time point. Blue color – dosage of 250 mg, red color – dosage of 500 mg

Во всех средах наблюдалось полное высвобождение у каждой дозировки (более 85 % к 45 минуте). Профили для дозировки 500 мг и 250 мг имели одинаковую форму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подобраны оптимальные условия дериватизации таурина, разработана и валидирована методика количественного определения таурина методом ВЭЖХ-УФ в рамках ТСКР в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. При проведении валидации разработанной методики установлено, что валидационные характеристики находятся в пределах критериев приемлемости в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной. Аналитический диапазон методики составил 0,05–1,2 мг/мл и позволяет применять разработанную методику для количественного определения в рамках ТСКР таблеток с дозировкой 250 и 500 мг.

Методика была апробирована в рамках ТСКР в трёх средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, фосфатный буферный раствор с pH 6,8, а также в среде контроля качества – воде очищенной, наблюдалось полное высвобождение у обеих дозировок (более 85 % к 30 минуте).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gentile C. L., Nivala A. M., Gonzales J. C., Pfaffenbach K. T., Wang D., Wei Y., Jiang H., Orlicky D. J., Petersen D. R., Pagliassotti M. J., Maclean K. N. Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;301(6):1710–1722. DOI: 10.1152/ajpregu.00677.2010.
2. Page L. K., Jeffries O., Waldron M. Acute taurine supplementation enhances thermoregulation and endurance cycling performance in the heat. *European journal of sport science*. 2019;19(8):1101–1109. DOI: 10.1080/17461391.2019.1578417.
3. Jacobsen J. G., Smith L. H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiological Reviews*. 1968;48(2):424–511. DOI: 10.1152/physrev.1968.48.2.424.
4. Xavier J. M., Morgado A. L., Rodrigues C. M., Solá S. Tauroursodeoxycholic acid increases neural stem cell pool and neuronal conversion by regulating mitochondria-cell cycle retrograde signaling. *Cell Cycle*. 2014;13(22):3576–3589. DOI: 10.4161/15384101.2014.962951.
5. Płotka-Wasylka J. M., Morrison C., Biziuk M., Namiesnik J. Chemical derivatization processes applied to amine determination in samples of different matrix composition. *Chemical Reviews*. 2015;115(11):4693–4718. DOI: 10.1021/cr4006999.
6. Zaki M. M., Abdel-Al H., Al-Sawi M. Assessment of plasma amino acid profile in autism using cation-exchange chromatography with postcolumn derivatization by ninhydrin. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2017;47(1):260–267. DOI: 10.3906/sag-1506-105.
7. Önal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry*. 2007;103(4):1475–1486. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028.
8. Lehtonen P., Saarinen M., Vesanto M., Riekkola M. L. Determination of wine amines by HPLC using automated precolumn derivatisation with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1992;194(5):434–437. DOI: 10.1007/BF01197724.
9. Gomes E. P., Borges C. V., Monteiro G. C., Belin M. A. F., Minatel I. O., Junior A. P., Tecchio M. A., Lima G. P. P. Preharvest salicylic acid treatments improve phenolic compounds and biogenic amines in 'Niagara Rosada' table grape. *Postharvest Biol. Technol*. 2021;176:111–505. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2021.111505.
10. Omer M., Omar M., Thiel A., Elbashir A. High Performance Liquid Chromatographic Methods for Analysis of Taurine in Energy Drinks after Pre-column Derivatization. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2018;13(5). DOI: 10.29333/ejac/93422.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-73-78
УДК 615.072:615.322 + 543.421/424

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Фитохимический анализ надземной части щавеля приморского (*Rumex maritimus* L.)

В. В. Подгурская✉, Е. А. Лукша, И. А. Савченко, И. Н. Корнеева, Е. В. Иванова

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ (ФГБОУ ВО «Омский ГМУ» Минздрава России), 644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

✉ **Контактное лицо:** Подгурская Вера Викторовна. **E-mail:** verapodgurskaya@mail.ru

ORCID: В. В. Подгурская – https://orcid.org/0000-0002-2101-0924; Е. А. Лукша – https://orcid.org/0000-0003-4591-2508; И. А. Савченко – https://orcid.org/0000-0002-3283-0872; И. Н. Корнеева – https://orcid.org/0000-0002-9285-2950; Е. В. Иванова – https://orcid.org/0000-0002-9839-1104.

Статья поступила: 26.09.2022 **Статья принята в печать:** 20.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Щавель приморский (*Rumex maritimus* L., *Polygonaceae*) используется как лекарственное и пищевое растение в странах Азии. Растение содержит биологически активные вещества (БАВ) различных классов: флавоноиды, дубильные вещества, антрахиноны и др. Извлечения из растения проявляют антибактериальную, антиоксидантную, противовоспалительную, вяжущую активность, обладают противодиабетическим потенциалом. Растение является однолетником, поэтому большая часть биологически активных веществ накапливается в надземных органах. Важной задачей является стандартизация сырья щ. приморского и разработка нормативной документации для его внедрения в медицинскую практику.

Цель. Провести фитохимический анализ надземной части щ. приморского.

Материалы и методы. Для получения извлечений использовали высушенную надземную часть щ. приморского, а также отдельные высушенные надземные органы (листья, цветки, плоды, стебли). Качественный анализ извлечений проводили с использованием метода обращенно-фазовой ВЭЖХ. Относительное содержание компонентов смеси вычисляли методом простой нормировки. Суммарное содержание свободных антрахинонов и антрагликозидов определяли спектрофотометрическим методом в пересчете на хризофановую кислоту после проведения кислотного гидролиза. Количественное определение танинов проводили титриметрическим методом.

Результаты и обсуждение. В надземной части щ. приморского впервые обнаружены флавоноиды изокверцетин, авикулярин. Доминирующим компонентом сырья является рутин. Среди антраценпроизводных преобладает хризофанол. Наиболее высокая концентрация антрахинонов (2,80 ± 0,04 %) обнаружена в цветках. Дубильные вещества накапливаются преимущественно в листьях (9,97 ± 0,02 %). Значительное количество дубильных веществ (6,60 ± 0,03 %) и антраценпроизводных (1,96 ± 0,03 %) содержится в траве.

Заключение. Фитохимический анализ надземной части щ. приморского показал присутствие значительного количества антрахинонов. В качестве сырья предлагается использовать траву щ. приморского в стадии цветения. Предлагается проводить стандартизацию сырья по антраценпроизводным в пересчете на хризофановую кислоту (не менее 1,5 %).

Ключевые слова: антрахиноны, флавоноиды, дубильные вещества, спектрофотометрия, ВЭЖХ

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

Вклад авторов. В. В. Подгурская и Е. А. Лукша выполнили литературный поиск и провели эксперименты, анализировали и интерпретировали данные, подготовили статью. И. Н. Корнеева, И. А. Савченко, Е. В. Иванова проводили эксперименты, анализировали и интерпретировали данные, редактировали текст. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Подгурская В. В., Лукша Е. А., Савченко И. А., Корнеева И. Н., Иванова Е. В. Фитохимический анализ надземной части щавеля приморского (*Rumex maritimus* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):73–78. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-73-78

Phytochemical Analysis of the Aerial Part of Golden Dock (*Rumex Maritimus* L.)

Vera V. Podgurskaya✉, Elena A. Luksha, Irina A. Savchenko, Irina N. Korneeva, Evgenia V. Ivanova

Omsk State Medical University, 12, Lenina str., Omsk, 644099, Russia

✉ **Corresponding author:** Vera V. Podgurskaya. **E-mail:** verapodgurskaya@mail.ru

ORCID: Vera V. Podgurskaya – https://orcid.org/0000-0002-2101-0924; Elena A. Luksha – https://orcid.org/0000-0003-4591-2508; Irina A. Savchenko – https://orcid.org/0000-0002-3283-0872; Irina N. Korneeva – https://orcid.org/0000-0002-9285-2950; Evgenia V. Ivanova – https://orcid.org/0000-0002-9839-1104.

Received: 26.09.2022 **Revised:** 20.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Golden dock (*Rumex maritimus* L., *Polygonaceae*) is used as a medicinal and food plant in Asian countries. The plant contains phytochemicals of various classes: flavonoids, tannins, anthraquinones etc. Plant extracts exhibit antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, astringent activity, and have antidiabetic potential. The plant is annual, and most of the biologically active substances accumulate in its aboveground organs. An important problem is the standardization of *Rumex maritimus* and the development of regulatory documentation for its the introduction to medical practice.

© Подгурская В. В., Лукша Е. А., Савченко И. А., Корнеева И. Н., Иванова Е. В., 2023
© Podgurskaya V. V., Luksha E. A., Savchenko I. A., Korneeva I. N., Ivanova E. V., 2023

Aim. To conduct phytochemical analysis of the aerial part of golden dock.
Materials and methods. Air-dried aerial part of *Rumex maritimus* collected at flowering and beginning of fruiting stage, as well as individual above-ground organs (leaves, flowers, fruits, stems), were used for obtaining the extracts. Qualitative analysis of the extracts was carried out using reverse phase HPLC. The relative content of the components in the mixture was calculated by the method of simple normalization. Total content of free anthraquinones and anthraglycosides in terms of chrysophanic acid was determined using spectrophotometric method after acid hydrolysis. Total tannin content was calculated by titrimetric method.
Results and discussion. Flavonoids isoquercetin and avicularin were first discovered in the aerial part of *Rumex maritimus*. The dominant component of the plant is rutin. Chrysophanol predominates among anthraquinones. The highest concentration of anthraquinones (2.80 ± 0.04 %) was found in flowers. Tannins accumulate mainly in leaves (9.97 ± 0.02 %). A significant amount of tannins (6.60 ± 0.03 %) and anthracene derivatives (1.96 ± 0.03 %) is contained in the whole aerial part.
Conclusion. Phytochemical analysis of the aerial part of *Rumex maritimus* showed the presence of a significant amount of anthraquinones. As a plant raw material it is proposed to use the herb of *Rumex maritimus*. Standardization is recommended for anthraquinones in terms of chrysophanic acid (at least 1.5 %).

Keywords: anthraquinones, flavonoids, saponins, tannins, spectrophotometry, gravimetry

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. Vera V. Podgurskaya and Elena A. Luksha conducted the literature research and the experiments, analysed and interpreted the data, prepared the article, reviewed the text. Irina N. Korneeva, Irina A. Savchenko, Evgenia V. Ivanova conducted the experiments, analysed and interpreted the data, reviewed the text.

For citation: Podgurskaya V. V., Luksha E. A., Savchenko I. A., Korneeva I. N., Ivanova E. V. Phytochemical analysis of the aerial part of golden dock (*Rumex maritimus* L.). *Drug development & registration*. 2023;12(2):73–78. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-73-78

ВВЕДЕНИЕ

Щавель приморский (*Rumex maritimus* L.) – это прямостоячее травянистое растение семейства гречишные (*Polygonaceae* Juss.), достигающее в высоту от 10 см до 0,8–1,2 м [1]. Произрастает на территории европейской части России, Предкавказье, Западной и Восточной Сибири, на Дальнем Востоке (Приморский край, Камчатка, Амурская область) [1].

В настоящее время растение используется у народов Юго-Восточной Азии в качестве вяжущего, антидиарейного, слабительного, ветрогонного средства и афродизиака [2–5]. Семена используют для лечения вздутия, болей в спине и пояснице [3, 4], а пасту из листьев прикладывают к ожогам и ранам, зудящим областям [5, 6].

Экспериментально установлено наличие у метанольного экстракта щ. приморского вяжущих свойств, антибактериальной, антиоксидантной, нейрофармакологической [2–4, 7], противовоспалительной и анальгетической активности [8]. Этанольный экстракт всего растения обладает антидиабетическим потенциалом благодаря способности ингибировать образование конечных продуктов гликолиза [9].

Щ. приморский является однолетним растением, поэтому большая часть биологически активных веществ (БАВ) накапливаются в надземной части. Растение содержит флавоноиды (румарин, гиперин, рутин), дубильные вещества (ДВ), алкалоиды [2], антрахиноны (хризофанол, эмодин, фисцион), хромоны [3, 4].

Для внедрения растения в медицинскую практику одной из важных задач является разработка нормативной документации на сырье, для чего необходимо провести качественный и количественный анализ надземных органов щ. приморского и установить группы БАВ, по которым следует вести стандартизацию.

Цель работы: провести фитохимический анализ надземной части щ. приморского.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования выступала как вся надземная часть (трава) в стадии цветения (июль 2021 г.), так и отдельные органы: листья, стебли, цветки, собранные в период цветения (июль 2021 г.), плоды, собранные в период полного созревания (август 2021 г.). Сырье собирали на территории Омской области (Любинский р-н, берег р. Авлуха). Сушку сырья проводили воздушно-теневым способом.

Изучение химического состава проводили с использованием метода обращенно-фазовой ВЭЖХ, для чего 2,0 г сырья помещали в круглодонную колбу, прибавляли 50 мл 80%-го этанола и нагревали на кипящей водяной бане в течение 40 мин. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 50 мл и доводили объем 80%-м спиртом до метки.

Условия хроматографирования: прибор LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором; изократический режим; аналитическая колонка 4,6 × 200 мм, заполненная сорбентом PerfectSil Target ODS-3 HD с размером частиц 5 мкм; детектирование при длине волны 254 нм; температура колонки – комнатная; скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин; объем вводимой пробы 20 мкл. В качестве подвижной фазы использовали смеси: ацетонитрил – вода в соотношении 70 : 30 (для анализа

антрахинонов); ацетонитрил – 5%-я уксусная кислота в соотношении 20:80 (для анализа других фенольных соединений).

Идентификацию соединений проводили с использованием стандартных образцов Sigma Aldrich, США: хризофанол, чистота 98 %, годен до 02.2024; фисцион, чистота 98 %, годен до 09.2023; эмодин, чистота 97 %, годен до 09.2023; ванилиновая кислота, чистота 97 %, годен до 06.2026; 2-гидроксикоричная кислота, чистота 97 %, годен до 08.2024; 3-гидроксикоричная кислота, чистота 99 %, годен до 04.2024; хлорогеновая кислота, чистота 95 %, годен до 02.2025; сиреневая кислота, чистота 95 %, годен до 02.2025; *n*-кумаровая кислота, чистота 98 %, годен до 08.2023; феруловая кислота, 99 %, годен до 07.2025; кверцетин, чистота 95 %, годен до 06.2026; авикулярин, чистота 90 %, годен до 03.2025; ресвератрол, чистота 99 %, годен до 08.2025; катехин, чистота 99 %, годен до 11.2023; Supelco Inc., США: кофейная кислота, чистота 99,3 %, годен до 01.2025; изокверцетин, чистота 98 %, годен до 04.2024; галловая кислота, чистота 95 %, годен до 11.2024; (-)-эпигаллокатехин галлат, чистота 98 %, годен до 12.2023; Acros Organics B.V.B.A., Бельгия: рутин, чистота 97 %, годен до 08.2025. Относительное содержание (%) компонентов смеси вычисляли методом простой нормировки из соотношения площадей хроматографических пиков.

Количественное определение дубильных веществ методом перманганатометрического титрования в пересчете на танин в соответствии с указаниями ГФ XIV изд., ОФС.1.5.3.0008.15 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Для количественного определения суммы свободных и связанных в виде гликозидов антраценпроизводных использовали методику, приведенную в [10], основанную на кислотном гидролизе антрагликозидов, извлечении суммы агликонов хлороформом и дальнейшей их реэкстракции щелочно-аммиачным раствором.

Количество БАВ в органах растения рассчитывали в процентах (%) в пересчете на абсолютно сухое сырье. Статистическую обработку результатов количественного определения проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Каждый эксперимент проводили пять раз.

Для полученных данных определяли следующие метрологические характеристики: минимальное значение (x_{min}), максимальное значение (x_{max}), дисперсия (S^2), стандартное отклонение (S), относительное стандартное отклонение (RSD), относительная ошибка среднего. Результаты описывались как среднее ± стандартное отклонение.

Для сравнения концентраций БАВ в различных органах использовали t-критерий для независимых выборок. Уровень значимости был установлен при $p \leq 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ВЭЖХ установлено, что доминирующим БАВ надземной части щ. приморского является рутин, содержание которого в пробе составляет 28,15 % (рисунок 1, таблица 1).

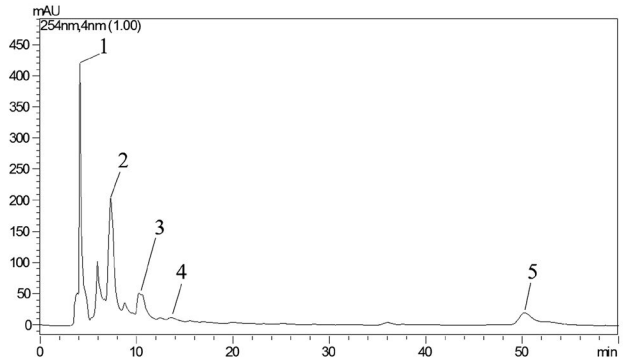


Рисунок 1. ВЭЖХ-хроматограмма спиртового извлечения из надземной части щавеля приморского (подвижная фаза: 20 % ацетонитрил – 80 % уксусная кислота 5%-я).

1 – галловая кислота; 2 – рутин; 3 – изокверцетин; 4 – авикулярин; 5 – кверцетин

Figure 1. HPLC-chromatogram of the extract from the aerial part of Rumex maritimes (mobile phase: 20 % acetonitrile – 80 % acetic acid 5 %).

1 – Gallic acid; 2 – rutin; 3 – isoquercetin; 4 – avicularin; 5 – quercetin

Среди антрахинонов преобладающим компонентом является хризофанол, относительное содержание которого в пробе составило 8,0 % (рисунок 2, таблица 1).

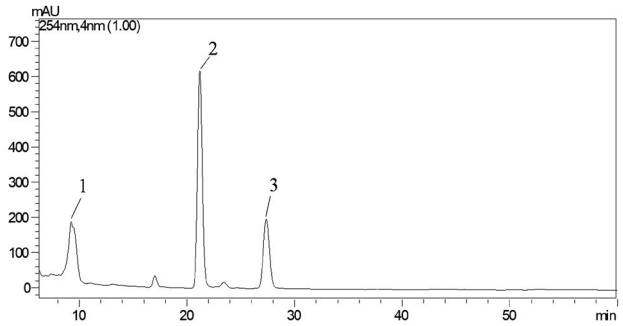


Рисунок 2. ВЭЖХ-хроматограмма спиртового извлечения из надземной части щавеля приморского (подвижная фаза: 70 % ацетонитрил – 30 % вода).

1 – эмодин; 2 – хризофанол; 3 – фисцион

Figure 2. HPLC-chromatogram of the extract from the aerial part of Rumex maritimus (mobile phase: 70 % acetonitrile – 30 % water).

1 – emodin; 2 – chrysophanol; 3 – physcion

Качественный анализ фракций этанольного извлечения из надземной части щ. приморского изучался нами ранее [11]. Кроме перечисленных выше

соединений, в сырье были обнаружены катехины (катехин, эпигаллокатехин-3-галлат, эпикатехин-3-галлат), фенолокислоты (сиреневая, *n*-кумаровая, феруловая, кофейная), стильбены (ресвератрол).

Таблица 1. ВЭЖХ-анализ спиртового извлечения из надземной части щавеля приморского

Table 1. HPLC-analysis of the extract from the aerial part of Rumex maritimis

№ пика Peak #	Вещество Phytochemical	Время удерживания, мин Retention time, min	Спектральные характеристики (λ_{max}), нм Spectral characteristics (λ_{max}), nm	Содержание в пробе, % Content in sample, %
Флавоноиды, фенолокислоты Flavonoids, phenolic acids				
1	Галловая кислота Gallic acid	4,09	239, 279	24,7
2	Рутин Rutin	7,29	254, 354	28,15
3	Изокверцетин Isoquercetin	10,25	255, 263, 352	11,31
4	Авикулярин Avicularin	12,90	239, 265, 341	2,82
5	Кверцетин Quercetin	47,15	253, 368	4,61
Антрахиноны Anthraquinones				
1	Эмодин Emodin	9,23	253, 265, 288, 439	4,96
2	Хризофанол Chrysophanol	21,18	256, 277, 287, 429	7,99
3	Фисцион Physcion	27,36	253, 266, 285, 429	3,29

По результатам спектрофотометрического определения (таблица 2) установлено, что большое количество антраценпроизводных содержится в траве (1,96 ± 0,03 %) щ. приморского, что сопоставимо с сырьем сенны, в котором согласно ФС.2.5.0038.15 должно содержаться не менее 1,35 % суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту. Наивысшая концентрация антраценпроизводных обнаружена в цветках (2,80 ± 0,04 %). Антибактериальная активность щ. приморского может быть обусловлена именно наличием антрахинонов в высоких концентрациях. Кроме того, извлечения и индивидуальные антрахиноны, полученные из данного растения, могут быть перспективны в терапии раковых, воспалительных, грибковых, вирусных (в том числе коронавирусной инфекции) и других заболеваний [12, 13].

В таблице 3 представлены результаты количественного определения дубильных веществ. Дубильные вещества широко распространены в растениях в диапазоне от 5 до 10 % сухой массы растительного сырья [14] и накапливаются в коре, стеблях, плодах и семенах, корнях, бутонах и листьях [15]. В траве щ. приморского нами обнаружено достаточно высокое содержание дубильных веществ (6,60 ± 0,03 %), что может объяснить антидиарейное действие извлечений из этого сырья. Наибольшее количество дубильных веществ обнаружено в листьях (9,97 ± 0,02 %).

Таблица 2. Количественное содержание антраценпроизводных в пересчете на хризофановую кислоту в надземных органах щавеля приморского

Table 2. Total content of anthraquinones in terms of chrysophanic acid in the aerial organs of Rumex maritimus

Органы растения Plant organs	Количественное содержание $\bar{x}$, % Quantitative content $\bar{x}$, %	Метрологические характеристики Metrological characteristics	Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %	Относительная ошибка среднего, % Relative error of the mean, %
Трава Aerial part	1,96	$x_{min} = 1,94$ $x_{max} = 1,99$ $S^2 = 0,0006$ $S = 0,03$	1,28	1,45
Листья Leaves	0,99	$x_{min} = 0,96$ $x_{max} = 1,00$ $S^2 = 0,0004$ $S = 0,02$	2,12	1,20
Цветки Flowers	2,80	$x_{min} = 2,77$ $x_{max} = 2,84$ $S^2 = 0,0012$ $S = 0,04$	1,25	2,03
Плоды Fruits	1,55	$x_{min} = 1,52$ $x_{max} = 1,57$ $S^2 = 0,0006$ $S = 0,03$	1,63	1,45
Стебли Stems	0,67	$x_{min} = 0,65$ $x_{max} = 0,69$ $S^2 = 0,0004$ $S = 0,02$	2,99	1,15

Проведенные исследования показывают, что надземную часть щ. приморского целесообразно рассматривать в качестве источника антраценпроизводных и дубильных веществ. Предлагается проводить стандартизацию сырья по антраценпроизводным в пересчете на хризофановую кислоту (не менее 1,5 %).

В связи с тем, что большое количество антрахинонов накапливается в цветках, заготавливать сырье рекомендуется в стадию цветения. При этом использовать в качестве сырья цветки нецелесообразно, так как их удельная доля в общей массе надземной части составляет менее 3 %.

Стебли исследуемого растения не накапливают значительных количеств БАВ, поэтому на стадии сбора сырья предлагается освобождать надземную часть от крупных стеблей.

Количественное определение доминирующих компонентов (флавоноиды) не проводилось в связи с тем, что в настоящее время отсутствует методика определения флавоноидов в данном сырье.

Таблица 3. Количественное содержание дубильных веществ в пересчете на танин в надземных органах щавеля приморского

Table 3. Total content of tannins in terms of tannic acid in the aerial organs of Rumex maritimus

Органы растения Plant organs	Количественное содержание $\bar{x}$, % Quantitative content $\bar{x}$, %	Метрологические характеристики Metrological characteristics	Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %	Относительная ошибка среднего, % Relative error of the mean, %
Трава Aerial part	6,60	$x_{min} = 6,58$ $x_{max} = 6,64$ $S^2 = 0,0012$ $S = 0,03$	0,52	2,00
Листья Leaves	9,97	$x_{min} = 9,96$ $x_{max} = 9,99$ $S^2 = 0,0002$ $S = 0,02$	0,15	0,88
Цветки Flowers	7,10	$x_{min} = 7,07$ $x_{max} = 7,13$ $S^2 = 0,0009$ $S = 0,03$	0,42	1,73
Плоды Fruits	5,19	$x_{min} = 5,14$ $x_{max} = 5,23$ $S^2 = 0,002$ $S = 0,05$	0,87	2,60
Стебли Stems	0,71	$x_{min} = 0,69$ $x_{max} = 0,72$ $S^2 = 0,0003$ $S = 0,02$	2,44	1,00

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований в спиртовом извлечении из надземной части щ. приморского впервые обнаружены флавоноиды изокверцетин, авикулярин. Установлено, что доминирующим компонентом сырья является рутин. Для количественного определения флавоноидов (в пересчете на рутин) в сырье необходимо предварительно разработать методику.

В траве щ. приморского обнаружено доминирующее присутствие антраценпроизводных (1,96 ± 0,03 %), дубильных веществ (6,60 ± 0,03 %). Таким образом, надземная часть щ. приморского (трава) может служить источником этих групп БАВ.

На основании проведенных исследований предлагается в качестве сырья использовать траву в стадии цветения. Стандартизацию сырья предлагается проводить по антраценпроизводным в пересчете на хризофановую кислоту. Полученные данные будут использованы для разработки нормативной документации «Щавеля приморского трава (*Rumicis maritimi* herba)».

ЛИТЕРАТУРА

1. Ломоносова М. Н., Большаков Н. М., Красноборов И. М., Кашина Л. И., Тупицына Н. Н., Гельтман Д. В., Шемберг М. А. Флора Сибири. *Salicaceae – Amaranthaceae*. Новосибирск: Наука; 1992. 312 с.
2. Hossain M. S., Rashid A. H. M. A., Rahman M. M., Sadhu S. K. Antioxidant, Antimicrobial and Antidiarrhoeal Activity of Methanolic Extract of *Rumex maritimus* L. (Polygonaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5(3):056–060. DOI: 10.7324/JAPS.2015.510.S10.
3. Islam M. S., Iwasaki A., Suenaga K., Kato-Noguchi H. 2-Methoxystypandrone, a potent phytotoxic substance in *Rumex maritimus* L. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 2017;29(4):195–202. DOI: 10.1007/s40626-017-0095-9.
4. Islam M. S., Iwasaki A., Suenaga K., Kato-Noguchi H. Evaluation of phytotoxic potential and identification of phytotoxic compounds in *Rumex maritimus*. *Plant Biosystems*. 2018;152(4):804–809. DOI: 10.1080/11263504.2017.1338630.
5. Li J. J., Li Y. X., Li N., Zhu H. T., Wang D., Zhamg Y. J. The genus *Rumex* (Polygonaceae): an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Natural Products and Bioprospecting*. 2022;12(1):21. DOI: 10.1007/s13659-022-00346-z.
6. Topno S. C., Sinha M. R. Study of medicinal plants used to heal skin diseases by tribes of west Singhbhum district of Jharkhand (India). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;7(1):371–376.
7. El-Amier Y. A., El-Halawany E. F., Soliman H. M., El Hayyany L. Y. Primary GC-MS chemical analysis of alcoholic extract of *Emex spinosa* (L.) Campd. and screening of their antioxidant, antibacterial, and cytotoxic characteristics. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 2023;37(1):101–114. DOI: 10.4314/bcse.v37i1.9.
8. Hinna H., Abdullah S. T., Ansari S. H., Alam M. S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Rumex maritimus*. *Hamdard Medicus*. 2007;50(3):31–33.
9. Thida M., Nyein C. M., Chan K. N., New M. T., Ei S. L., Mya K. M. In Vitro study on Antidiabetic Potential of Crude Plant Extracts by Attenuating Oxidative-Stress and Advanced Glycation End-Product. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;13(2):282–291. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.02.063.
10. Гринкевич Н. И., Сафронич Л. Н. Химический анализ лекарственных растений. М: Высшая школа; 1983. 176 с.
11. Подгурская В. В., Лукша Е. А., Савченко И. А., Корнеева И. Н., Иванова Е. В., Калиниченко А. М. Изучение химического состава надземной части щавеля приморского (*Rumex maritimus* L.) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(1):38–45. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-38-45.
12. Malik E. M., Müller C. E. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal Research Reviews*. 2016;36(4):705–748. DOI: 10.1002/med.21391.
13. Ntemafack A., Singh R. V., Ali S., Kuiate J. R., Hassan Q. P. Antiviral potential of anthraquinones from Polygonaceae, Rubiaceae and Asphodelaceae: potent candidates in the treatment of SARS-COVID-19, A comprehensive review. *South African Journal of Botany*. 2022;151:146–155. DOI: 10.1016/j.sajb.2022.09.043.
14. Barbehenn R. V., Constabel C. P. Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*. 2011;72(13):1551–1565. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040

15. Das A. K., Islam M. N., Faruk M. O., Ashaduzzaman M., Dungani R. Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*. 2020;135:58–70. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.08.008.

REFERENCES

1. Lomonosova M. N., Bolshakov N. M., Krasnoborov I. M., Kashina L. I., Tupitsyna N. N., Geltman D. V., Shemberg M. A. Flora of Siberia. *Salicaceae – Amaranthaceae*. Novosibirsk: Nauka; 1992. 312 p. (In Russ.)
2. Hossain M. S., Rashid A. H. M. A., Rahman M. M., Sadhu S. K. Antioxidant, Antimicrobial and Antidiarrhoeal Activity of Methanolic Extract of *Rumex maritimus* L. (Polygonaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5(3):056–060. DOI: 10.7324/JAPS.2015.510.S10.
3. Islam M. S., Iwasaki A., Suenaga K., Kato-Noguchi H. 2-Methoxystypandrone, a potent phytotoxic substance in *Rumex maritimus* L. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 2017;29(4):195–202. DOI: 10.1007/s40626-017-0095-9.
4. Islam M. S., Iwasaki A., Suenaga K., Kato-Noguchi H. Evaluation of phytotoxic potential and identification of phytotoxic compounds in *Rumex maritimus*. *Plant Biosystems*. 2018;152(4):804–809. DOI: 10.1080/11263504.2017.1338630.
5. Li J. J., Li Y. X., Li N., Zhu H. T., Wang D., Zhamg Y. J. The genus *Rumex* (Polygonaceae): an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Natural Products and Bioprospecting*. 2022;12(1):21. DOI: 10.1007/s13659-022-00346-z.
6. Topno S. C., Sinha M. R. Study of medicinal plants used to heal skin diseases by tribes of west Singhbhum district of Jharkhand (India). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;7(1):371–376.
7. El-Amier Y. A., El-Halawany E. F., Soliman H. M., El Hayyany L. Y. Primary GC-MS chemical analysis of alcoholic extract of *Emex spinosa* (L.) Campd. and screening of their antioxidant, antibacterial, and cytotoxic characteristics. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. 2023;37(1):101–114. DOI: 10.4314/bcse.v37i1.9.
8. Hinna H., Abdullah S. T., Ansari S. H., Alam M. S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Rumex maritimus*. *Hamdard Medicus*. 2007;50(3):31–33.
9. Thida M., Nyein C. M., Chan K. N., New M. T., Ei S. L., Mya K. M. In Vitro study on Antidiabetic Potential of Crude Plant Extracts by Attenuating Oxidative-Stress and Advanced Glycation End-Product. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;13(2): 282–291. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.02.063.
10. Grinkevich N. I., Safronich L. N. The Chemical Analysis of Medicinal Plants. Moscow: Vysshaya Shkola; 1983. 176 p. (In Russ.)
11. Podgurskaya V. V., Luksha E. A., Savchenko I. A., Korneeva I. N., Ivanova E. V., Kalinichenko A. M. The study of the chemical composition of the aerial part of golden dock (*Rumex maritimus* L.) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(1):38–45. (In Russ.) DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-38-45.
12. Malik E. M., Müller C. E. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Medicinal Research Reviews*. 2016;36(4):705–748. DOI: 10.1002/med.21391.
13. Ntemafack A., Singh R. V., Ali S., Kuiate J. R., Hassan Q. P. Antiviral potential of anthraquinones from Polygonaceae, Rubiaceae and Asphodelaceae: potent candidates in the treatment of SARS-COVID-19, A comprehensive review. *South African Journal of Botany*. 2022;151:146–155. DOI: 10.1016/j.sajb.2022.09.043.
14. Barbehenn R. V., Constabel C. P. Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*. 2011;72(13):1551–1565. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040
15. Das A. K., Islam M. N., Faruk M. O., Ashaduzzaman M., Dungani R. Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*. 2020;135:58–70. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.08.008.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86
УДК 615.19.071

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев

Н. А. Ковалёва, 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: Н. А. Ковалёва – https://orcid.org/0000-0002-3507-5665; О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 14.03.2022 **Статья принята в печать:** 27.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Растровая электронная микроскопия – современный метод, позволяющий изучить не только морфологические особенности объектов, но и провести микрорентгеноструктурный анализ. В настоящее время метод активно внедряется в изучение биологических объектов (включая растительные). Облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) листья являются нефармакопейным видом лекарственного растительного сырья. Дальнейшее изучение особенностей морфологии, анатомии и фитохимического состава листьев может способствовать получению новых, в том числе и комбинированных, лекарственных средств, что потребует разработки фармакопейной статьи на данное лекарственное растительное сырье.

Цель. Целью исследования являлось изучение морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев методом растровой электронной микроскопии.

Материалы и методы. Объектом исследования служили высушенные цельные листья облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.), собранные в Воронежской области в 2021 году в период массовой зрелости плодов. Для проведения исследования методом растровой электронной микроскопии кусочки листьев предварительно напыляли золотом на автоматической напылительной установке Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) для повышения проводимости. Микрофотографии получены на электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL Ltd., Япония).

Результаты и их обсуждение. Проведено изучение морфологии, некоторых особенностей анатомического строения облепихи крушиновидной листьев и уточнены основные микродиагностические признаки (характер поверхности, типы трихом, наличие устьиц). Установлено содержание элементов (кремния, калия, алюминия, углерода и кальция) при проведении микрорентгеноструктурного анализа. Получены микрофотографии пыльцевых зерен растения, установлено присутствие в них элемента железа.

Заключение. Впервые использован метод растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев. Уточнены основные диагностические признаки листьев и их расположение. Установлено, что в составе элементов сырья преобладает углерод, а также накапливается кальций. Предположено накопление алюминия, кремния и калия в многочисленных волосках, густо покрывающих верхнюю, и особенно нижнюю, поверхности листовой пластинки. Установлена морфология поверхности пыльцевых зерен облепихи крушиновидной, имеющих шарообразную форму с шиповатой оболочкой. Для пыльцевых зерен, кроме углерода, характерно накопление железа и кремния.

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, *Hippophaë rhamnoides* L., растровая электронная микроскопия, морфология поверхности листа, идентификация, микрорентгенструктурный анализ, элементный анализ

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

Вклад авторов. Н. А. Ковалёва осуществляла заготовку и сушку образцов сырья, совместно с сотрудниками ЦКП ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», проводила пробоподготовку к проведению анализа, им проведены исследования морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной с применением растрового электронного микроскопа и программного обеспечения, а также обозначены все рисунки, отражающие основные результаты работы. Совместно с О. В. Тринеевой написала текст статьи. О. В. Тринеева консультировала по полученным результатам, писала заключение и обсуждение результатов.

Для цитирования: Ковалёва Н. А., Тринеева О. В. Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):79–86. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86

Application of Scanning Electron Microscopy to Study Morphological and Anatomical Features of Sea Buckthorn Leaves

Natalia A. Kovaleva, Olga V. Trineeva✉

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

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

ORCID: Natalia A. Kovaleva – https://orcid.org/0000-0002-3507-5665; Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 14.03.2022 **Revised:** 27.03.2023 **Published:** 25.05.2023

© Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., 2023
© Kovaleva N. A., Trineeva O. V., 2023

Abstract
Introduction. Scanning electron microscopy is a modern method that allows us to study not only the morphological features of objects, but also to conduct micro-X-ray structural analysis. Currently, the method is being actively introduced into the study of biological objects (including plant ones). Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaves are a non-pharmacopoeial type of medicinal plant raw materials. Further study of the morphology, anatomy and phytochemical composition of leaves can contribute to the production of new, including combined, medicines, which will require the development of a pharmacopoeia article for this medicinal plant raw material.
Aim. The aim of the study was to study the morphological and anatomical features of sea buckthorn leaves by scanning electron microscopy.
Materials and methods. The object of the study was dried whole leaves of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.), collected in the Voronezh region in 2021 during the period of mass fruit maturity. To carry out the study by scanning electron microscopy, pieces of leaves were previously sprayed with gold on an automatic spraying unit Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., United Kingdom) to increase conductivity. Micrographs were obtained using an electron microscope JSM-6510LV (JEOL Ltd., Japan).
Results and their discussion. The morphology and some features of the anatomical structure of sea buckthorn leaves were studied and the main microdiagnostic signs (surface character, types of trichomes, the presence of stomata) were clarified. The content of elements (silicon, potassium, aluminum, carbon and calcium) was determined during the microrentgenostructural analysis. Micrographs of pollen grains of the plant were obtained, the presence of the element iron in them was established.
Conclusion. For the first time, the method of scanning electron microscopy was used to study the morphological and anatomical features of sea buckthorn leaves. The main diagnostic signs of leaves and their location have been clarified. It has been established that carbon predominates in the composition of the raw material elements, and calcium also accumulates. The accumulation of aluminum, silicon and potassium in numerous hairs densely covering the upper, and especially the lower, surfaces of the leaf blade is assumed. The morphology of the surface of pollen grains of sea buckthorn, having a spherical shape with a spiny shell, has been established. Pollen grains, in addition to carbon, are characterized by the accumulation of iron and silicon.

Keywords: sea buckthorn, *Hippophaë rhamnoides* L., scanning electron microscopy, morphology of the leaf surface, identification, microrentgenstructural analysis, elemental analysis

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

Contribution of the authors. Natalia A. Kovaleva carried out the preparation and drying of raw material samples, together with the staff of the Central Research Institute of the Voronezh State University, conducted sample preparation for analysis, she conducted studies of morphological signs of sea buckthorn leaves using a scanning electron microscope and software, and also indicated all the drawings reflecting the main results of the work. Together with Olga V. Trineeva wrote the text of the article. Olga V. Trineeva consulted on the results obtained, wrote a conclusion and discussion of the results.

For citation: Kovaleva N. A., Trineeva O. V. Application of scanning electron microscopy to study morphological and anatomical features of sea buckthorn leaves. *Drug development & registration*. 2023;12(2):79–86. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86

ВВЕДЕНИЕ

Растровая электронная микроскопия (РЭМ) – современный оптический метод исследования материалов и структур. В настоящее время метод позволяет получить не только изображения высокого разрешения, но и провести рентгеноспектральный микроанализ [1].

Пробоподготовка биологических образцов (включая растительные объекты) включает в себя вакуумное напыление благородных металлов (золото, серебро, платина) на их поверхность для придания электропроводности, так как объекты органической природы состоят из элементов с низким молекулярным весом и, следовательно, характеризуются малыми значениями данного показателя [2]. После проведения подобной пробоподготовки строение образцов растительного происхождения возможно анализировать методом РЭМ.

Еще одним методом пробоподготовки биологических объектов является сушка в критической точке (универсальный метод). РЭМ проводится в режиме высокого вакуума, что позволяет получать изображения с полной визуализацией всех элементов изучаемого объекта и особенностей их строения [3].

В частности, благодаря методу РЭМ можно изучить морфологию поверхности различных объектов и получить данные о составе их элементов. Несмотря на пока ограниченное применение данного метода в медицине и фармации, заключающегося в оценке строения поверхности технологических полупродуктов (микрокапсул, наночастиц и твердых дисперсий) при создании различных лекарственных форм, РЭМ активно начинает использоваться в анализе морфологии поверхности растительных объектов. Примером может служить РЭМ поверхности различных морфологических органов травы рода горцев (*Persicaria* Mill.) и листьев представителей рода вишни (*Prunus* L.) [4, 5]. Известно также применение метода в изучении морфологии микрокапсул с винпоцетином [6].

В медицине РЭМ применяется в изучении изменения клеток органов и биологических жидкостей при различных видах воспалений и инфекций (патологии суставов, травматическое инфицирование), эритроцитов крови при различных патологиях, а также в исследованиях в области стоматологии [7–14].

В настоящее время облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) листья являются нефармакопейным видом лекарственного растительного сы-

рья (ЛРС). Однако, на основе их полифенольного комплекса разработан и зарегистрирован лекарственный растительный препарат «Гипорамин», что, конечно же, не реализует в полной мере потенциал листьев, являющихся зачастую отходом при заготовке плодов. Иностранные ученые (особенно из Индии, где облепиха крушиновидная имеет обширный ареал распространения) занимаются исследованиями экстрактов из листьев более активно на предмет выявления различных видов фармакологической активности. В частности, доказаны антиоксидантные, иммуномодулирующие, противовирусные, противогрибковые, гипогликемические и антипролиферативные свойства на модели экспериментального артрита [15–30]. Дальнейшее изучение особенностей морфологии, анатомии и фитохимического состава листьев может способствовать получению новых, в том числе и комбинированных, лекарственных средств, что потребует разработки фармакопейной статьи (ФС) на данное ЛРС, и также обусловливает актуальность проводимых нами исследований. Использование РЭМ в изучении микродиагностических признаков позволит, наряду с другими известными методами микроскопических исследований [31], сформировать раздел ФС «Микроскопия».

Целью исследования являлось изучение морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев методом растровой электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили высушенные цельные листья облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.), собранные в Воронежской области в 2021 году в период массовой зрелости плодов. Сырье было высушено методом воздушно-теневой сушки.

Для проведения исследования методом РЭМ кусочки листьев предварительно напыляли золотом на автоматической напылительной установке Q150R ES (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) для повышения проводимости. Микрофотографии получены на электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL Ltd., Япония). Обработка результатов проведена при помощи программного обеспечения ESPRIT 1.9. Исследования проведены в ЦКП научным оборудованием ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получены микрофотографии, отражающие основные диагностические признаки верхней и нижней поверхностей листовой пластины. В процессе сушки на листе образовались складки, которые помешали визуализации некоторых микродиагностических признаков.

Лист сверху рыхло покрыт щитковидными и щитковидно-звездчатыми волосками. Часть трихом имеют воронковидное углубляющееся основание, а часть – пикообразное, выступающее над поверхностью (рисунок 1, А, Б). Щитковидно-звездчатые волоски имеют лучи различной длины. Клетки многоугольные, с утолщенными стенками (рисунок 1, А). Край листовой пластины завернут книзу (рисунок 1, Е). Центральная жилка погруженная, покрыта звездчатыми трихомами с длинными, переплетающимися между собой лучами (рисунки 1, В, Г). Визуализируются округлые пыльцевые зерна растения с шиповатой поверхностью (рисунок 1, Д). Сохранение пыльцы на листьях связано с тем, что облепиха – ветроопыляемый двудомный кустарник и мужские и женские деревья могут находиться на достаточно далеком расстоянии друг от друга. При попадании пыльцы на лист, она задерживается лучами звездчатых волосков, что является приспособлением к размножению. Устьица на верхней стороне отсутствуют.

Нижняя поверхность листовой пластины, включая выступающую центральную жилку (рисунок 2, А), плотно покрыта щитковидно-звездчатыми и щитковидными трихомами (рисунок 2, Б). Звездчатые трихомы встречаются реже, в основном по жилке. Сплошное покрытие поверхности листа волосками затрудняет визуализацию других диагностических признаков (формы клеток, наличие устьиц и их тип). При снятии верхнего слоя трихом (рисунок 2, В) определяется сетчатое жилкование листовой пластины. Частицы поврежденных волосков и клеток не позволяют идентифицировать тип устьичного аппарата, но сами устьица отчетливо визуализируются (рисунок 2, Г).

В работе также проведен микрорентгеноструктурный анализ и получены рентгеновские спектры (рисунок 3). В результате методом РЭМ установлено наличие некоторых элементов, содержащихся во фрагменте листовой пластины, пыльцевом зерне, а также фрагменте листа после удаления слоя волосков. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание элементов в листе облепихи крушиновидной

Table 1. The content of elements in the Sea buckthorn leaf

Элемент Element	Содержание элементов, % Content of elements, %					
	Лист Leaf		Лист без слоя волосков Leaf without layer of hairs		Пыльца Pollen	
	Вес The weight	Атом Atom	Вес The weight	Атом Atom	Вес The weight	Атом Atom
C	78,8	91,7	68,7	88,0	93,0	97,5
Al	1,3	0,7	–	–	–	–
Si	4,5	2,3	–	–	3,4	1,5
K	1,5	0,5	–	–	–	–
Ca	13,9	4,9	31,3	12,0	2,2	0,7
Fe	–	–	–	–	1,3	0,3

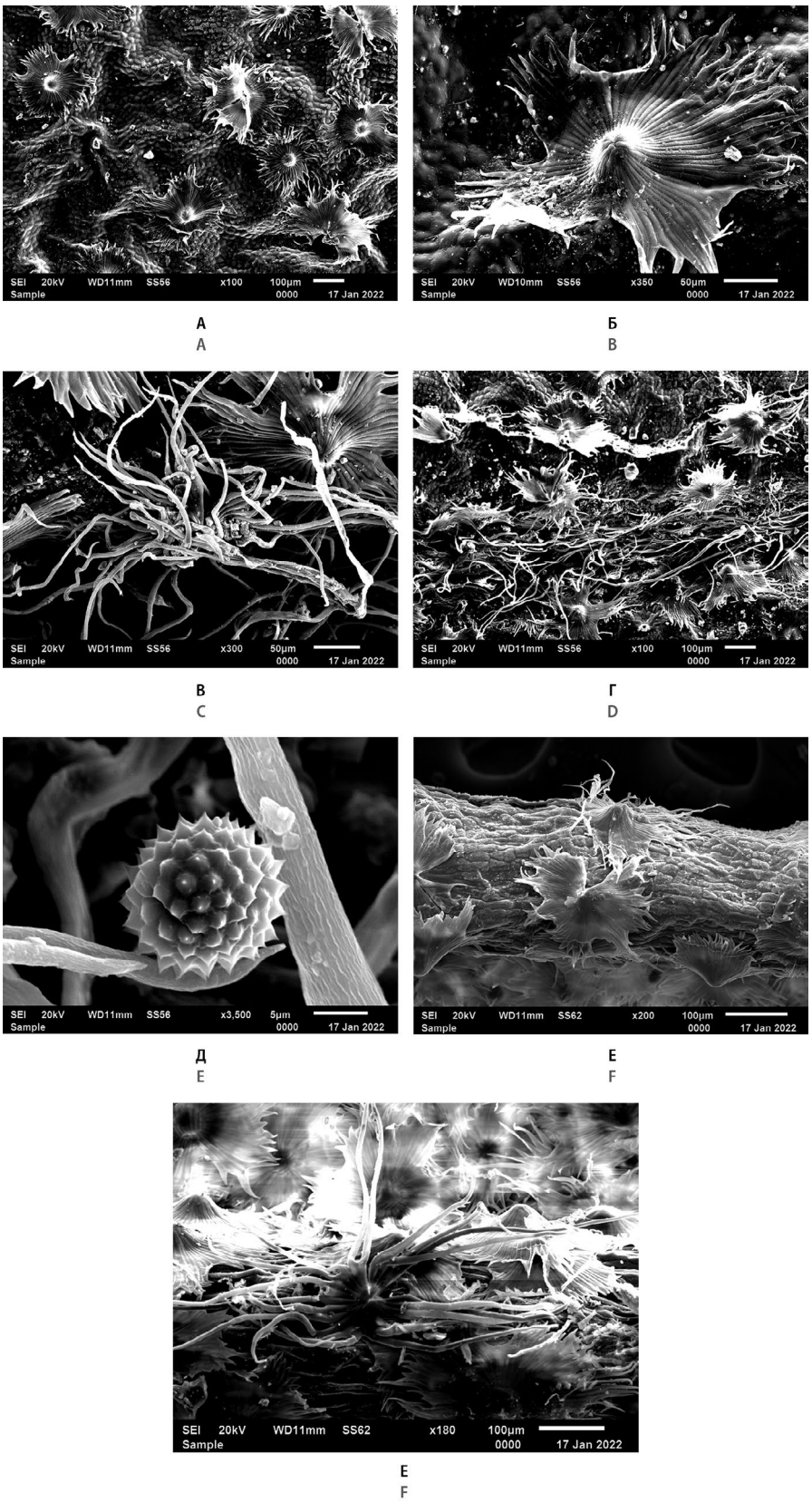


Рисунок 1. Микрофотографии верхней поверхности листа, полученные методом РЭМ.

А × 100, Б × 350 – щитковидные волоски; В × 300 – звездчатый волосок; Г × 100 – центральная жилка; Д × 3500 – пыльцевое зерно; Е × 200 – край листовой пластины; Ж × 180 – щитковидно-звездчатый волосок

Figure 1. Micrographs of the upper surface of the leaf obtained by the SEM method.

A × 100, B × 350 – corymbose hairs; C × 300 – stellate hair; D × 100 – central vein; E × 3500 – pollen grain; F × 200 – edge of the leaf plate; G × 180 – corymbose-stellate hair

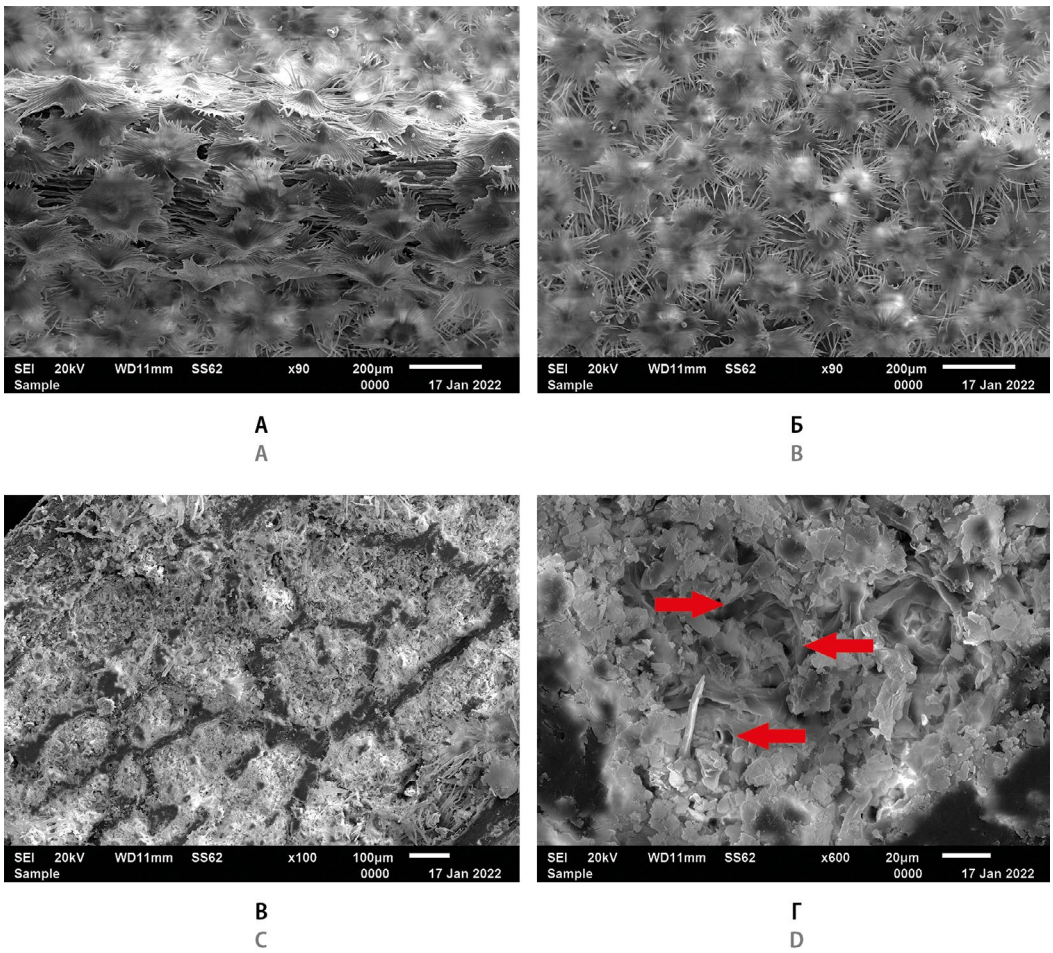


Рисунок 2. Микрофотографии нижней поверхности листа.

А – центральная жилка; Б – щитковидные и щитковидно-звездчатые трихомы; В – поверхность без слоя волосков; Г – устьица

Figure 2. Micrographs of the lower surface of the leaf.

A – central vein; B – corymbose and corymbose-stellate trichomes; C – surface without a layer of hairs; D – stomata

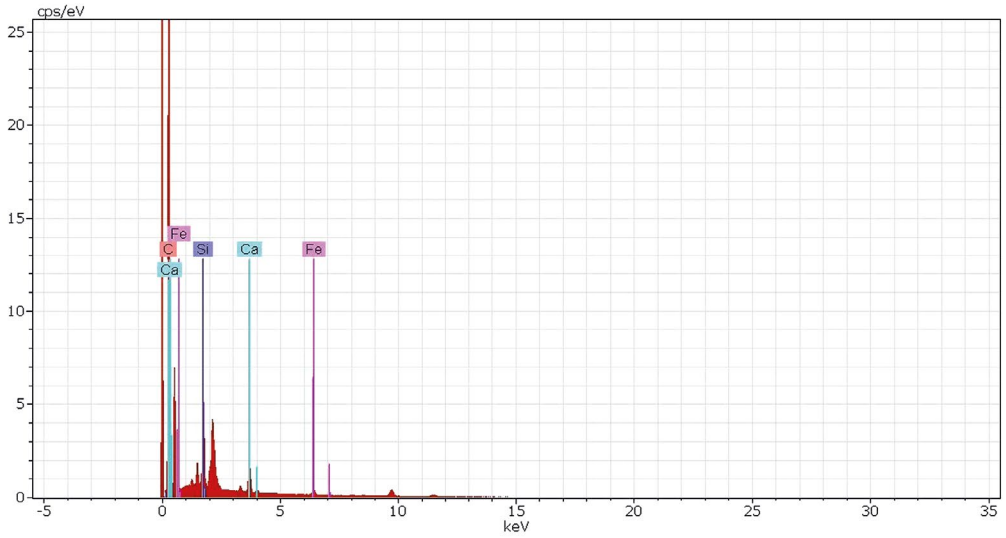
Согласно полученным данным, наибольшую долю в составе элементов занимает углерод, что и следовало ожидать. Это связано с органической природой изучаемого объекта. Отмечено значительное содержание кальция. Отсутствие алюминия, кремния и калия во фрагменте листа, очищенном от трихом, может свидетельствовать о накоплении данных элементов именно в волосках. При анализе пыльцы, кроме преобладающего содержания углерода, отмечается накопление кремния и кальция, а также железа, что объясняется защитной функцией прочной шиповатой оболочки пыльцевого зерна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами впервые использован метод РЭМ для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев. Уточнены основные диагностические признаки листьев и их расположение. Установлено, что в составе элементов сырья преобладает углерод, а также накапливается кальций. Предположено накопление алюминия, кремния и калия в многочисленных волосках, густо покрывающих верхнюю, и особенно нижнюю, поверхности листовой пластинки. Установлена морфология поверхности пыльцевых зерен облепихи крушиновидной, имеющих шарообразную форму с шиповатой оболочкой. Для пыльцевых зерен, кроме углерода, характерно накопление железа и кремния.

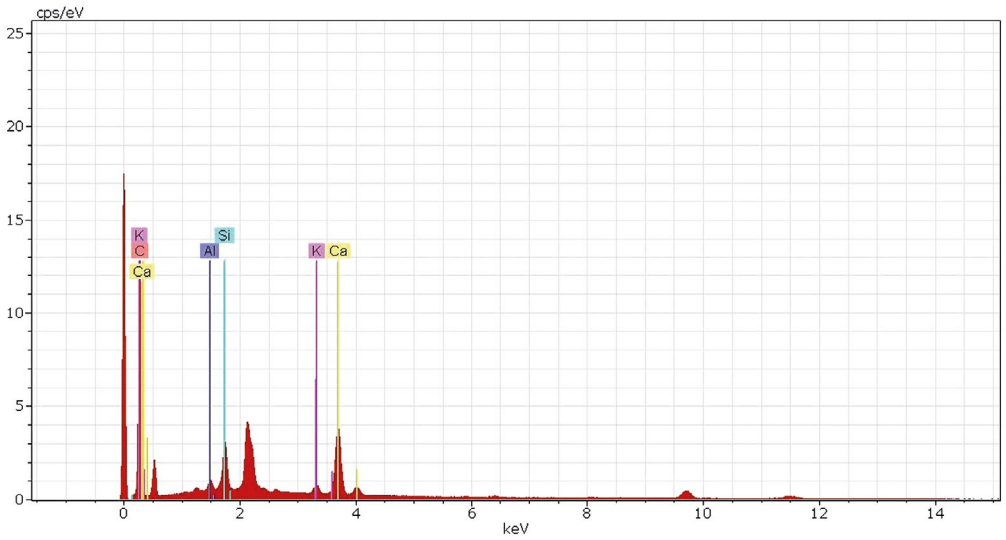
ЛИТЕРАТУРА

1. Конников С. Г. Количественная растровая электронная микроскопия материалов и структур твердотельной электроники. *Научное приборостроение*. 2000;1:3–13.
2. Лунев А. А. Основы растровой электронной микроскопии и подготовка образцов. *Молодой ученый*. 2021;21(363):98–101.
3. Камышинский Р. А., Орехов А. С., Григорьев Т. Е., Куевда Е. В., Губарева Е. А., Токаев К. В., Чвалун С. Н., Васильев А. Л. Сравнительный анализ различных методов растровой электронной микроскопии и пробоподготовки в исследованиях биологических тканей. *Кристаллография*. 2019;64(3):438–441. DOI: 10.1134/S0023476119030135.
4. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Синецкая Д. А., Сливкин А. И., Болгов А. С., Болгова М. А. Растровая электронная микроскопия в анализе видов рода *Persicaria* Mill. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):99–105. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105.



А

А



Б

В

Рисунок 3. Рентгеновские спектры листа облепихи крушиновидной, полученные методом РЭМ.
А – состав элементов пыльцевого зерна; Б – состав элементов листа, покрытого трихомами

Figure 3. X-ray spectra of a sea buckthorn leaf, obtained by scanning electron microscopy.
A – composition of pollen grain elements; B – composition of leaf elements covered with trichomes

5. Мотылева С. М. Сравнительные исследования морфолого-анатомических признаков листьев представителей рода *Prunus* L. s. l. методом растровой электронной микроскопии. *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии*. 2017;16: 135–138.
6. Северинова Н. А. Изучение особенностей поверхности альгинат-хитозановых микрокапсул с винпоцетином методом растровой электронной микроскопии. В сб.: Теоретические и практические аспекты современной медицины: Материалы 91-й международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых; 18 апреля 2019 года; Симферополь, Медицинская академия им. С. И. Георгиевского; 2019. 444 с. Доступно по: https://ma.cfuv.ru/page/show/docid/240454?locale=en. Ссылка активна на 05.09.2022.
7. Ярмамедов Д. М., Липатов В. А., Медведева М. В., Захарова К. В. Исследование динамики изменений площади клеток роговицы после инфицированного травматического поражения методом растровой электронной микроскопии. *Вестник Башкирского государственного медицинского университета*. 2019;3:157–163.
8. Алексеев Р. З., Гольдерова А. С., Маркова О. Г., Мамаева С. Н., Николаева Н. А., Крылова Т. А., Дьяконов А. А. Характеристика микрокристаллов синовиальной жидкости при патологии суставов методом растровой электронной микроскопии. В сб.: III Международный конгресс ассоциации ревмоортопедов; 20–21 сентября 2019 года; Москва; 2019. 136 с. Доступно по: https://elibrary.ru/download/elibrary_41504349_23188760.pdf. Ссылка активна на 05.09.2022.

9. Мамаева С. Н., Мунхалова Я. А., Конова И. В., Дьяконов А. А., Корякина В. Н., Шутова В. В., Максимов Г. В. Исследование эритроцитов крови методом растровой электронной микроскопии. *Вестник Мордовского университета*. 2016;26(3):381–390. DOI: 10.15507/0236-2910.026.201603.381-390.
10. Мамаева С. Н., Максимов Г. В., Антонов С. Р., Мунхалова Я. А., Дьяконов А. А., Винокуров П. В. Исследование эритроцитов крови детей с заболеваниями почек с синдромом гематурии с использованием растровой электронной и атомно-силовой микроскопии. *Медицинская физика*. 2017;1(73):58–63.
11. Гольдерова А. С., Платонова В. А., Алексеев Р. З., Гоголева Т. Е., Трифонова Л. Ю., Григорьева Л. В., Мамаева С. Н. Оценка изменений эритроцитов с помощью атомно-силовой и растровой электронной микроскопии (смерть от переохлаждения). *Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М. К. Аммосова. Серия: Медицинские науки*. 2019;2(15):8–17. DOI: 10.25587/SVFU.2019.2(15).31306.
12. Алексеев Р. З., Гольдерова А. С., Мамаева С. Н., Николаева Н. А., Бузинаева М. Т. Оценка изменения эритроцитов методом растровой электронной микроскопии у лиц, умерших от переохлаждения. *Якутский медицинский журнал*. 2018;4(64):18–21. DOI: 10.25789/YMJ.2018.64.05.
13. Бессуднова Н. О., Биленко Д. И., Вениг С. Б., Аткин В. С., Галушка В. В., Захаревич А. М. Экспериментальное исследование кристаллических образований, обнаруженных на поверхности дентина, методами растровой электронной микроскопии. *Молекулярная медицина*. 2012;5:55–61.
14. Бессуднова Н. О., Вениг С. Б., Ревзина Е. М., Шляпникова О. А., Грибов А. Н. Применение методов атомно-силовой и растровой электронной микроскопии с целью визуальной диагностики состояния адгезивных соединений твердых тканей зуба и композиционных полимерных материалов при ударных циклических термонагрузках. *Вестник новых медицинских технологий*. 2017;4:244–251. DOI: 10.12737/article_5a0589ffd7f1c7.76704976.
15. Arimboor R., Kumar K. S., Arumughan C. Simultaneous estimation of phenolic acids in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;47(1):31–38. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.11.045.
16. Begaa S., Messaoudi M. Toxicological aspect of some selected medicinal plant samples collected from Djelfa, Algeria Region. *Biological trace element research*. 2019;187(1):301–306. DOI: 10.1007/s12011-018-1365-3.
17. Dharam P. A., Amrit K. S., Jyoti K., Tanveer N. Pharmacognostical Characterization & Preliminary Phytochemical Investigation of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;2(2):108–113.
18. Pop R. M., Weesepoel Y., Socaciu C., Pintea A., Vincken J. P., Gruppen H. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem*. 2014;147:1–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.083.
19. Saggu S., Divekar H. M., Gupta V., Sawhney R. C., Banerjee P. K., Kumar R. Adaptogenic and safe-ty evaluation of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(4):609–617. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.008.
20. Szakova J., Tlustoš P., Goessler W., Pokorný T., Findenig S., Balik J. The Effect of Soil Contamination Level and Plant Origin on Contents of Arsenic, Cadmium, Zinc, and Arsenic Compounds in Mentha Aquatica L. *Archives of Environmental Protection*. 2011;37(2):109–121.
21. Usha T., Middha S. K., Goyal A. K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V. Molecular docking studies of anticancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia*. *The Journal of Biomedical Research*. 2014;28(5):406–415. DOI: 10.7555/JBR.28.20130110.
22. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S. C., Sharma M., Singh S., Kumar H. T., Singh A. K., Nivsarkar M., Kaushik M. P., Sawhney R. C., Chaurasia O. P., Prasad G. B. Protective effect of ethanolic and water extracts of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006;44(10):821–831.
23. Padwad Y., Ganju L., Jain M., Chanda S., Karan D., Banerjee P. K., Sawhney R. C. Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *International immunopharmacology*. 2006;6(1):46–52. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.07.015.
24. Tanwar H., Shweta, Singh D., Singh S. B., Ganju L. Anti-inflammatory activity of the functional groups present in *Hippophae rhamnoides* (Seabuckthorn) leaf extract. *Inflammopharmacology*. 2018;26(1):291–301. DOI: 10.1007/s10787-017-0345-0.
25. Ren Z., Gong, H., Zhao A., Zhang J., Yang C., Wang P., Zhang Y. Effect of Sea Buckthorn on Plasma Glucose in Individuals with Impaired Glucose Regulation: A Two-Stage Randomized Crossover Intervention Study. *Foods*. 2021;10(4):804. DOI: 10.3390/foods10040804.
26. Mir M. A., Mir B. A., Singh D., Rao Z. Studies on the Anti-Inflammatory Properties of Various extracts of *Hippophae rhamnoide*. *Journal of pharmacology & clinical research*. 2017;2(2):555584. DOI: 10.19080/JPCR.2017.02.555584.
27. Verma H., Sharma M., Chahota R., Palial A. Assessment of antimycotic activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf exacts against common fungi associated with skin dermatitis. *Vet. World*. 2013;6(4):205–208. DOI: 10.5455/vetworld.2013.205-208.
28. Крамарьов С. О., Євтушенко В. В., Шадрин В. О., Головач О. В., Камінська Т. М. Застосування екстракту з листя *Hippophae rhamnoides* у терапії вітряної віспи в дітей. *Aktual'naâ Infektologiâ*. 2018;6(2):77–82. DOI: 10.22141/2312-413x.6.2.2018.131093.
29. Ganju L., Padwad Y., Singh R., Karan D., Chanda S., Chopra M. K., Bhatnagar P., Kashyap R., Sawhney R. C. Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *International immunopharmacology*. 2005;5(12):1675–1684. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.03.017.
30. Geetha S., Sai Ram M., Singh V., Ilavazhagan G., Sawhney R. C. Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) an in vitro study. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(3):373–378. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00406-8.
31. Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Гудкова А. А., Сливкин А. И. Изучение морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методами люминесцентной и стереомикроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):123-131. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131.

REFERENCES

1. Konnikov S. G. Quantitative scanning electron microscopy of materials and structures of solid-state electronics. *Nauchnoe priborostroenie*. 2000;1:3–13. (In Russ.)
2. Lunev A. A. Fundamentals of scanning electron microscopy and sample preparation. *Molodoy uchenyy*. 2021;21(363):98–101. (In Russ.)
3. Kamyshinsky R. A., Orekhov A. S., Grigoriev T. E., Kuevda E. V., Gubareva E. A., Tokaev K. V., Chvalun S. N., Vasiliev A. L. Comparative analysis of various methods of scanning electron microscopy and sample preparation in studies of biological tissues. *Kristallografiya*. 2019;64(3):438–441. DOI: 10.1134/S0023476119030135.
4. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sinetskaya D. A., Slivkin A. I., Bolgov A. S., Bolgova M. A. Scanning electron microscopy in the analysis of species of the genus *Persicaria* Mill. *Drug development & registration*. 2022;11(1):99–105. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105. (In Russ.)
5. Motyleva S. M. Comparative studies of the morphological and anatomical characteristics of the leaves of representatives of the genus *Prunus* L. s. l. by scanning electron microscopy. *Problemy botaniki Yuzhnoy Sibiri i Mongolii*. 2017;16:135–138. (In Russ.)
6. Severinova N. A. Study of surface features of alginate-chitosan microcapsules with vinpocetine by scanning electron microscopy. In: Theoretical and practical aspects of modern medicine: Proceedings of the 91st international scientific and practical conference and young scientists; April 18, 2019; Simferopol, Medical Academy. S. I. Georgievskogo; 2019. 444 p. Available at: https://ma.cfuv.ru/page/show/docid/240454?locale=en. Accessed: 05.09.2022. (In Russ.)
7. Yarmamedov D. M., Lipatov V. A., Medvedeva M. V., Zakharova K. V. Study of the dynamics of changes in the area of corneal cells after an infected traumatic lesion using scanning electron microscopy. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2019;3:157–163. (In Russ.)

8. Alekseev R. Z., Golderova A. S., Markova O. G., Mamaeva S. N., Nikolaeva N. A., Krylova T. A., Dyakonov A. A. Characterization of synovial fluid microcrystals in joint pathology by scanning electron microscopy. In: III International Congress of the Association of Rheumatic Orthopedists; September 20–21, 2019; Moscow; 2019. 136 p. Available at: https://elibrary.ru/download/elibrary_41504349_23188760.pdf. Accessed: 05.09.2022. (In Russ.)
9. Mamaeva S. N., Munkhalova Ya. A., Konova I. V., Dyakonov A. A., Koryakina V. N., Shutova V. V., Maksimov G. V. Examination of blood erythrocytes by scanning electron microscopy. *Mordovia University Bulletin*. 2016;26(3):381–390. (In Russ.) DOI: 10.15507/0236-2910.026.201603.381-390.
10. Mamaeva S. N., Maksimov G. V., Antonov S. R., Munkhalova Ya. A., Dyakonov A. A., Vinokurov P. V. Study of blood erythrocytes in children with kidney diseases with hematuria syndrome using scanning electron and atomic force microscopy. *Meditsinskaya fizika*. 2017;1(73):58–63. (In Russ.)
11. Golderova A. S., Platonova V. A., Alekseev R. Z., Gogoleva T. E., Trifonova L. Yu., Grigorieva L. V., Mamaeva S. N. Evaluation of changes in erythrocytes using atomic force and scanning electron microscopy (death from hypothermia). *Vestnik Severo-Vostochnogo federal'nogo universiteta im. M. K. Ammosova. Seriya: Meditsinskie nauk*i. 2019;2(15):8–17. (In Russ.) DOI: 10.25587/SVFU.2019.2(15).31306.
12. Alekseev R. Z., Golderova A. S., Mamaeva S. N., Nikolaeva N. A., Buzinaeva M. T. Evaluation of changes in erythrocytes by scanning electron microscopy in persons who died from hypothermia. *Yakut medical journal*. 2018;4(64):18–21. (In Russ.) DOI: 10.25789/YMJ.2018.64.05.
13. Bessudnova N. O., Bilenko D. I., Venig S. B., Atkin V. S., Galushka V. V., Zakharevich A. M. Experimental study of crystalline formations found on the surface of dentin using scanning electron microscopy. *Molecular medicine*. 2012;5:55–61. (In Russ.)
14. Bessudnova N. O., Venig S. B., Revzina E. M., Shlyapnikova O. A., Gribov A. N. Application of atomic force and scanning electron microscopy methods for the purpose of visual diagnostics of the state of adhesive joints of dental hard tissues and composite polymer materials under shock cyclic thermal loads. *journal of new medical technologies*. 2017;4:244–251. (In Russ.) DOI: 10.12737/article_5a0589ffd7f1c7.76704976.
15. Arimboor R., Kumar K. S., Arumughan C. Simultaneous estimation of phenolic acids in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;47(1):31–38. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.11.045.
16. Begaa S., Messaoudi M. Toxicological aspect of some selected medicinal plant samples collected from Djelfa, Algeria Region. *Biological trace element research*. 2019;187(1):301–306. DOI: 10.1007/s12011-018-1365-3.
17. Dharam P. A., Amrit K. S., Jyoti K., Tanveer N. Pharmacognostical Characterization & Preliminary Phytochemical Investigation of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;2(2):108–113.
18. Pop R. M., Weesepoel Y., Socaciu C., Pintea A., Vincken J. P., Gruppen H. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem*. 2014;147:1–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.083.
19. Saggu S., Divekar H. M., Gupta V., Sawhney R. C., Banerjee P. K., Kumar R. Adaptogenic and safe-ty evaluation of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(4):609–617. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.008.
20. Szakova J., Tlustoš P., Goessler W., Pokorný T., Findenig S., Balik J. The Effect of Soil Contamination Level and Plant Origin on Contents of Arsenic, Cadmium, Zinc, and Arsenic Compounds in Mentha Aquatica L. *Archives of Environmental Protection*. 2011;37(2):109–121.
21. Usha T., Middha S. K., Goyal A. K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V. Molecular docking studies of anticancerous candidates in *Hippophae rhamnoides* and *Hippophae salicifolia*. *The Journal of Biomedical Research*. 2014;28(5):406–415. DOI: 10.7555/JBR.28.20130110.
22. Vijayaraghavan R., Gautam A., Kumar O., Pant S. C., Sharma M., Singh S., Kumar H. T., Singh A. K., Nivsarkar M., Kaushik M. P., Sawhney R. C., Chaurasia O. P., Prasad G. B. Protective effect of ethanolic and water extracts of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against the toxic effects of mustard gas. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006;44(10):821–831.
23. Padwad Y., Ganju L., Jain M., Chanda S., Karan D., Banerjee P. K., Sawhney R. C. Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. *International immunopharmacology*. 2006;6(1):46–52. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.07.015.
24. Tanwar H., Shweta, Singh D., Singh S. B., Ganju L. Anti-inflammatory activity of the functional groups present in *Hippophae rhamnoides* (Seabuckthorn) leaf extract. *Inflammopharmacology*. 2018;26(1):291–301. DOI: 10.1007/s10787-017-0345-0.
25. Ren Z., Gong, H., Zhao A., Zhang J., Yang C., Wang P., Zhang Y. Effect of Sea Buckthorn on Plasma Glucose in Individuals with Impaired Glucose Regulation: A Two-Stage Randomized Crossover Intervention Study. *Foods*. 2021;10(4):804. DOI: 10.3390/foods10040804.
26. Mir M. A., Mir B. A., Singh D., Rao Z. Studies on the Anti-Inflammatory Properties of Various extracts of *Hippophae rhamnoide*. *Journal of pharmacology & clinical research*. 2017;2(2):555584. DOI: 10.19080/JPCR.2017.02.555584.
27. Verma H., Sharma M., Chahota R., Palial A. Assessment of antimycotic activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf exacts against common fungi associated with skin dermatitis. *Vet. World*. 2013;6(4):205–208. DOI: 10.5455/vetworld.2013.205-208.
28. Kramaryov S. O., Yevtushenko V. V., Shadrin V. O., Golovach O. V., Kaminska T. M. Ingestion of *Hippophae rhamnoides* leaf extract in the treatment of chickenpox in children. *Aktual'naa Infektologia*. 2018;6(2):77–82. (In Ukr.) DOI: 10.22141/2312-413x.6.2.2018.131093.
29. Ganju L., Padwad Y., Singh R., Karan D., Chanda S., Chopra M. K., Bhatnagar P., Kashyap R., Sawhney R. C. Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *International immunopharmacology*. 2005;5(12):1675–1684. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.03.017.
30. Geetha S., Sai Ram M., Singh V., Ilavazhagan G., Sawhney R. C. Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) an in vitro study. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(3):373–378. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00406-8.
31. Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Gudkova A. A., Slivkin A. I. Study of Morphological Features of Sea Buckthorn Leaves by Luminescent and Stereomicroscopy Methods. *Drug development & registration*. 2022;11(1):123–131. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-87-94
УДК 615.015 + 615.2 + 618.19

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP на клетках линии Caco-2

Ю. С. Транова, А. А. Слепнев, И. В. Черных✉, А. В. Щулькин, П. Ю. Мыльников, Н. М. Попова, М. И. Поветко, Е. Н. Якушева

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России), 390026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

✉ **Контактное лицо:** Черных Иван Владимирович. **E-mail:** Ivchernykh88@mail.ru

ORCID: Ю. С. Транова – https://orcid.org/0000-0001-5068-1201; А. А. Слепнев – https://orcid.org/0000-0001-0696-6554; И. В. Черных – https://orcid.org/0000-0002-5618-7607; А. В. Щулькин – https://orcid.org/0000-0003-1688-0017; П. Ю. Мыльников – https://orcid.org/0000-0001-7829-2494; Н. М. Попова – https://orcid.org/0000-0002-5166-8372; М. И. Поветко – https://orcid.org/0000-0003-1273-520X; Е. Н. Якушева – https://orcid.org/0000-0001-6887-4888.

Статья поступила: 18.03.2022 **Статья принята в печать:** 29.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Белок резистентности рака молочной железы (BCRP) является эффлюксным мембранным транспортером, контролирующим фармакокинетику большого числа лекарственных средств. Его активность может изменяться на фоне приема ряда эндо- и экзогенных веществ, таким образом, делая его звеном межлекарственных взаимодействий.

Цель. Цель исследования – разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP *in vitro*.

Материалы и методы. Работа выполнена на клетках Caco-2 гиперэкспрессирующих BCRP; культивирование проводили в трансвелл-системе, состоящей из апикальной и базолатеральной камер. На дно апикальной камеры (полупроницаемая мембрана) высеивали клетки. Оценивался транспорт субстратов BCRP: метотрексата, митоксантрона и кверцетина в концентрациях 1–50 мкМ в направлении из базолатеральной камеры в апикальную (Papp b-a) и в обратном направлении (Papp a-b). Отношение Papp b-a / Papp a-b более «2» характеризует участие транспортера в переносе веществ. Для подтверждения участия BCRP в транспорте тест-субстратов эксперимент проводился с добавлением в камеры ингибитора транспортера – резерпина (50 мкМ). Концентрацию субстратов определяли методом ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты и их обсуждение. При добавлении метотрексата (1 мкМ), митоксантрона (1 мкМ) и кверцетина (1–10 мкМ) в обе камеры их содержание в камере-реципиенте не детектировалось. При концентрации метотрексата 5 мкМ отношение Papp b-a / Papp a-b составило 3,38 ± 0,08, что свидетельствует об участии транспортера в его переносе. При концентрации вещества (10 и 50 мкМ) Papp b-a / Papp a-b снижалось до значений ниже «2». При концентрации митоксантрона 5 мкМ Papp b-a / Papp a-b составило 2,72 ± 0,16. Увеличение концентрации до 10 мкМ привело к росту Papp b-a / Papp a-b до 6,18 ± 0,08. При содержании вещества 50 мкМ показатель снижался, но оставался выше значения 2. В концентрации кверцетина 50 мкМ Papp b-a / Papp было ниже «2». Резерпин снижал Papp b-a / Papp a-b метотрексата в 3,31 раза ($p = 0,0002$), что свидетельствует об устранении асимметрии транспорта вещества. При концентрации митоксантрона 10 мкМ резерпин снижал его Papp b-a / Papp a-b в 3,36 раза ($p < 0,0001$). Результаты свидетельствуют об участии BCRP в контроле переноса обоих веществ через клеточный монослой.

Заключение. Разработана и апробирована на клетках линии Caco-2 методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP с использованием в качестве маркерных субстратов метотрексата (5 мкМ) и митоксантрона (10 мкМ), а в качестве ингибитора – резерпина (50 мкМ).

Ключевые слова: BCRP, культура клеток Caco-2, эффлюкс, субстраты, ингибиторы, метотрексат, митоксантрон, кверцетин, резерпин

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

Вклад авторов. Ю. Транова, И. В. Черных, Н. М. Попова, М. И. Поветко – культивирование клеток, выполнение транспортных экспериментов. А. А. Слепнев – статистическая обработка полученных результатов, написание статьи. А. В. Щулькин – выполнение хроматографических исследований. П. Ю. Мыльников – выполнение хроматографических исследований, пробоподготовка. Е. Н. Якушева – написание статьи, общее руководство работой.

Для цитирования: Транова Ю. С., Слепнев А. А., Черных И. В., Щулькин А. В., Мыльников П. Ю., Попова Н. М., Поветко М. И., Якушева Е. Н. Методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP на клетках линии Caco-2. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):87–94. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-87-94

Method for Testing of Drugs Belonging to Substrates and Inhibitors of the Transporter Protein BCRP on Caco-2 Cells

Yulya S. Tranova, Alexander A. Slepnev, Ivan V. Chernykh✉, Aleksey V. Shchulkin, Pavel Yu. Mylnikov, Nataliya M. Popova, Mariya I. Povetko, Elena N. Yakusheva

Ryazan State Medical University named after academician I. P. Pavlov, 9, Vysokovoltnaya str., Ryazan, 390026, Russia

✉ **Corresponding author:** Ivan V. Chernykh. **E-mail:** Ivchernykh88@mail.ru

© Транова Ю. С., Слепнев А. А., Черных И. В., Щулькин А. В., Мыльников П. Ю., Попова Н. М., Поветко М. И., Якушева Е. Н., 2023
© Tranova Yu. S., Slepnev A. A., Chernykh I. V., Shchulkin A. V., Mylnikov P. Yu., Popova N. M., Povetko M. I., Yakusheva E. N., 2023

ORCID: Yulya S. Tranova – https://orcid.org/0000-0001-5068-1201; Alexander A. Slepnev – https://orcid.org/0000-0001-0696-6554; Ivan V. Chernykh – https://orcid.org/0000-0002-5618-7607; Aleksey V. Shchulkin – https://orcid.org/0000-0003-1688-0017; Pavel Yu. Mylnikov – https://orcid.org/0000-0001-7829-2494; Nataliya M. Popova – https://orcid.org/0000-0002-5166-8372; Mariya I. Povetko – https://orcid.org/0000-0003-1273-520X; Elena N. Yakusheva – https://orcid.org/0000-0001-6887-4888.

Received: 18.03.2022 **Revised:** 29.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Breast cancer resistance protein (BCRP) is an efflux membrane transporter that controls the pharmacokinetics of a large number of drugs. Its activity may change when taking some endo- and exogenous substances, thus making it a link in drug interactions.

Aim. The aim of the study was to develop a method for testing of drugs for belonging to BCRP substrates and inhibitors *in vitro*.

Materials and methods. The work was performed on Caco-2 cells overexpressing BCRP, the cultivation was performed in a transwell-system consisting of the apical and basolateral chambers. Cells were seeded at the bottom of the apical chamber, which is a semipermeable membrane. Primarily, the transport of BCRP substrates: methotrexate, mitoxantrone and quercetin was evaluated in the concentration range of 1, 5, 10, and 50 μM in the direction from the basal chamber to the apical one (Papp b-a) and in the opposite direction (Papp a-b). The ratio Papp b-a / Papp a-b more than «2» characterizes the participation of transporter proteins in the transcellular transport of substances. To confirm the participation of BCRP in their transport the experiment was carried out with the addition of a transporter inhibitor, reserpine, to the transport medium at a concentration of 50 μM. The concentration of substrates in the chambers was analyzed by HPLC-MS/MS.

Results and their discussion. The addition of methotrexate (1 μM), mitoxantrone (1 μM), and quercetin (1–10 μM) to both the apical or basolateral chambers of the transwell-system, their content in the recipient chamber was not detected. When methotrexate concentration became 5 μM the Papp b-a / Papp a-b ratio was 3.38 ± 0.08, which indicates the involvement of transporters in its transfer. The addition of methotrexate to the donor chamber at concentrations of 10 and 50 μM, Papp b-a / Papp a-b decreased to values below «2». At mitoxantrone concentration of 5 μM Papp b-a / Papp a-b was 2.72 ± 0.16. An increase in the concentration to 10 μM led to an increase in Papp b-a / Papp a-b to 6.18 ± 0.08. With a substance content of 50 μM the indicator decreased but remained above the value «2». In the quercetin concentration of 50 microns, Papp b-a / Papp was below "2". Reserpine reduced Papp b-a / Papp a-b of methotrexate by 3.31 times ($p = 0.0002$), which indicates the elimination of asymmetry in the transport of the substance. At a mitoxantrone concentration of 10 microns, reserpine reduced its Papp b-a / Papp a-b by 3.36 times ($p < 0.0001$). The results indicate the participation of BCRP in the control of the transfer of both substances through the cellular monolayer.

Conclusion. A method of testing drugs belonging to BCRP substrates and inhibitors using methotrexate (5 μM) and mitoxantrone (10 μM) as marker substrates and reserpine (50 μM) as inhibitor was developed and tested on Caco-2 cells.

Keywords: BCRP, Caco-2 cell culture, efflux, substrates, inhibitors, methotrexate, mitoxantrone, quercetin, reserpine

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. Yulya S. Tranova, Ivan V. Chernykh, Nataliya M. Popova, Mariya I. Povetko – cell cultivation, transport experiments. Alexander A. Slepnev – statistical processing of the results, writing an article. Aleksey V. Shchulkin – performance of chromatographic studies. Pavel Yu. Mylnikov – performance of chromatographic studies, sample preparation. Elena N. Yakusheva – writing an article, general supervision of the work.

For citation: Tranova Yu. S., Slepnev A. A., Chernykh I. V., Shchulkin A. V., Mylnikov P. Yu., Popova N. M., Povetko M. I., Yakusheva E. N. Method for testing of drugs belonging to substrates and inhibitors of the transporter protein BCRP on Caco-2 cells. *Drug development & registration*. 2023;12(2):87–94. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-87-94

ВВЕДЕНИЕ

С целью снижения риска развития нежелательных лекарственных реакций, связанных с участием белков-транспортеров и цитохрома Р450, зарубежные регулирующие организации, начиная с 1997, рекомендуют все новые лекарственные средства тестировать на принадлежность к субстратам и ингибиторам цитохромов Р450[1], а с 2006 года также и к субстратам и ингибиторам транспортных белков[2]. Аналогичные рекомендации в России появились в 2014 году[3].

Белок резистентности рака молочной железы человека (BCRP – breast cancer resistance protein, ABCG2) представляет собой эффлюксный трансмембранный белок-транспортер с массой порядка 75 кДа, относящийся к суперсемейству ABC-транспортеров [1, 2].

На данный момент показано, что BCRP экспрессируется как в опухолевых клетках, так и в плазмодиотрофобластах плаценты человека, в апикальной мембране энтероцитов, в гепатоцитах, на поверхности эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга человека, в стволовых клетках, в яичниках, надпочечниках и легких [3]. Подобная локализация транс-

[1] U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administraion, Center for Drug Evaluation and Research, Center For Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development Process: Studies In Vitro. 1997. P. 10.

[2] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. 2006. P. 52.

[3] Методические рекомендации по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. М.: Гриф и К; 2014. 343 с.

портера в органах и тканях может указывать на то, что он играет немаловажную роль в абсорбции, распределении и удалении лекарственных средств, являющихся его субстратами [4]. Учитывая функционирование BCRP в кишечнике и печени, он, аналогично гликопротеину-P (Pgp, ABCB1-белок), служит барьером для энтеральной абсорбции лекарственных средств, что ограничивает их биодоступность, а также опосредует выведение через гепатобилиарную систему [4].

На сегодня известно более 200 субстратов BCRP. К ним относят противоопухолевые средства, такие как метотрексат, митоксантрон, производные камптотецина, некоторые ингибиторы протеинкиназы, и ряд препаратов других фармакологических групп: празозин, глибурид, циметидин, сульфасалазин, нитрофурантоин, розувастатин и др. [5].

Некоторые лекарственные средства способны изменять активность BCRP. Прием препаратов, снижающих его функциональную активность (ингибиторы протеазы ВИЧ, блокаторы протонной помпы, ряд флавоноидов и др), может приводить к развитию нежелательных лекарственных взаимодействий. Прием потенциальных индукторов, напротив, может приводить к снижению эффективности фармакотерапии. На данный момент веществ, являющихся индукторами BCRP, обнаружено крайне мало [5].

Одной из методик обнаружения функциональных ингибиторов BCRP является способ, основанный на измерении накопления флуоресцентного субстрата в клетках линии почек собак Madin-Darby II, селективно экспрессирующих BCRP (SB MDCKII BCRP), на фоне инкубации с тестируемым агентом. Данный подход позволяет использовать только субстраты, способные к флуоресценции, а также дорогостоящие трансфицированные клеточные линии [6].

Оценка принадлежности биологически активных веществ к субстратам и ингибиторам BCRP может проводиться также с помощью проточной цитофлуориметрии на клетках эмбриональной почки человека (HEK) с использованием флуоресцентных субстратов [7].

В нашей работе мы планировали опробировать одобренный зарубежными рекомендациями[1] метод тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам/модуляторам активности BCRP на доступной большинству лабораторий клеточной линии Caco-2 с применением субстратов: метотрексата, митоксантрона и кверцетина. Данные вещества обладают достаточной растворимостью в большинстве растворителей и характеризуются интенсивным проникновением через клетки линии Caco-2, в отличие, например, от используемых рядом исследователей феофорбида А [8] и празозина [9]. Кверцетин, кроме того, обладает низкой токсичностью и может в дальнейшем использоваться в экспериментах *in vivo* [10].

Целью исследования явилась апробация методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам белка-транспортера BCRP *in vitro* на культуре клеток Caco-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе исследования проведена оценка количества BCRP в клетках линии Caco-2 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Россия). Для этого их культивировали как указано ранее [11] в течение 3 недель: за это время происходит их самопроизвольная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие BCRP [12]. После завершения культивирования клетки снимали с лунок [11] и лизировали трехкратным циклом заморозки-разморозки. В лизате с помощью коммерческого набора для гетерогенного иммуноферментного анализа (BlueGene, КНР) оценивали количество BCRP методом абсолютной калибровки.

Для анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам/ингибиторам BCRP использовали специальные трансвелл-системы (12 mm Transwell® with 0,4 μm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, Corning Incorporated, США), состоящие из апикальной и базолатеральной камер (рисунок 1). Клетки Caco-2 высеивали на полупроницаемую мембрану, которая представляет дно апикальной камеры.

Транспортные эксперименты проводились на 22-е сутки после достижения плотных межклеточных контактов и формирования монослоя в трансвелл-системе.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления (TEER), которое определяли с помощью вольтметра Millicell® ERS-2 (Millipore, США). Транспортные эксперименты выполняли при значении TEER выше 500 мОм · см^2. Для этого питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса (ООО «ПанЭко», Россия) с 25 мМ HEPES (Gipco, № 2026999, Англия) и 1 % диметилсульфоксида (ООО «ПанЭко», Россия). После этого в апикальную камеру (камера-донор) трансвелл-системы добавляли один из тестируемых субстратов BCRP [6]: метотрексат [метотрексата гидрат, субстанция-порошок, содержание метотрексата ≥98 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Китай, серия A6770, годен до 10.02.2023], митоксантрон [митоксантрона дигидрохлорид, субстанция-порошок, содержание митоксантрона ≥97 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Китай, серия M6545, годен до 11.03.2023], кверцетин [кверцетин, субстанция-порошок, содержание кверцетина ≥95 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Индия, серия Q4951, годен до 23.03.2023] в концентрациях 1, 5, 10, 50 мкМ. Забор образцов транспортной среды

[1] European medicines agency. Guideline on the investigation of drug interactions. – 2012. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. In Vitro Metabolism and Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry. 2017.

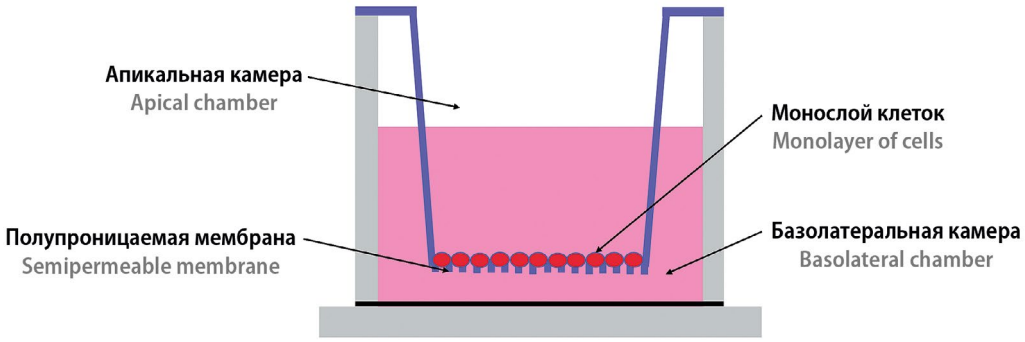


Рисунок 1. **Трансвелл-система (схема)**

Figure 1. **Transwell-system (scheme)**

для определения концентрации субстрата в базолатеральной камере (камере-реципиенте) производили через 1, 2 и 3 часа (a-b транспорт, обусловленный пассивной диффузией).

На следующем этапе оценивали транспорт субстрата BCRP из базолатеральной камеры в апикальную (b-a транспорт). Для этого забор проб осуществляли из апикальной камеры (камеры-реципиента) после добавления субстрата в базолатеральную камеру (камеру-донор) через аналогичные временные промежутки. Данный транспорт реализуется как путем пассивной диффузии, так и с помощью белков-транспортеров [13].

Для оценки интенсивности транспорта веществ через клеточных монослой рассчитывали коэффициенты кажущейся проницаемости: Papp b-a и Papp a-b, а также их отношение, которое характеризует общий вклад эффлюксных транспортеров в перенос веществ через билипидную мембрану [11].

Для подтверждения участия BCRP в трансцеллюлярном переносе данных веществ эксперименты выполняли на фоне добавления в транспортную среду ингибитора белка-транспортера резерпина [резерпин, субстанция-порошок, содержание резерпина ≥99 % (HPLC), Sigma-Aldrich, Китай, серия 83580, годен до 09.03.2023] в концентрации 50 мкМ (за 30 мин до начала исследования и на всем его протяжении) в обе камеры вне зависимости от направления оцениваемого транспорта.

Концентрацию тестируемых веществ в камерах реципиентах анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС, используя следующие реактивы: Вода ВЭЖХ-МС (№ 21F104014, VWR, Франция), кислота муравьиная 98 % для аналитики (№ 0001900259, PanReac, Испания), ацетонитрил градиентной ВЭЖХ (№ 2183665, Thermo Fisher Scientific Inc., Китай), метанол особой чистоты для градиентной ВЭЖХ (ООО ТД «ХИММЕД», Россия).

Работа выполнена на высокоэффективном жидкостном хроматографе UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенном градиентным насосом, дегазатором, автосемплером и тандемным масс-селективным детектором TSQ Fortis (Thermo Fisher Scientific, США). Управление совмещенной системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47).

В исследовании использовали колонку UCT Selectra C18 4,6 · 100 мм 5 мкм, 100 А, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18 GDC46-5UM.

Извлечение метотрексата из транспортной среды осуществляли смесью метанола и воды в соотношении 1:1, митоксантрона – метанолом, кверцетина – смесью ацетонитрила и воды в соотношении 1:1. Далее образцы тщательно перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия), после чего центрифугировали в течение 10 мин при 13000 g на центрифуге Avanti® JXN-30 (Beckman Coulter Inc., США). Надосадочную жидкость переносили в виалы и помещали в автосемплер.

Условия хроматографического анализа были следующими.

Метотрексат. Объем вводимой пробы составил 2 мкл при скорости потока подвижной фазы 0,3 мл/мин и температуре разделения 35 °С. Время анализа – 10 мин. Использовали градиентный режим элюирования: соотношение раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила: 0 мин – 75 к 25 %; 0,4 мин – 60 к 40 %; 6 мин – 20 к 80 %; 8 мин – 75 к 25 %. В данных условиях время удерживания метотрексата составило 3,11 мин.

Митоксантрон. Скорость потока подвижной фазы составила 0,3 мл/мин при температуре разделения 35 °С и объеме вводимой пробы 5 мкл. Использовали градиентный режим элюирования: соотношение раствора муравьиной кислоты и метанола: 0 мин – 70 и 30 %; 0,3 мин – 10 и 90 %; 6 мин – 70 и 30 %. Время анализа – 10 мин. В данных условиях время удерживания метотрексата составило 5,51 мин.

Кверцетин. Скорость потока элюента – 0,5 мл/мин, температура разделения – 35 °С, объем вводимой пробы – 5 мкл. Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме: соотношение раствора 0,1%-й муравьиной кислоты и ацетонитрила составило на 0 мин 70 и 30 %; 0,3 мин 30 и 70 %; 4 мин 1 и 99 %;

Таблица 1. **Масс-спектрометрические параметры детектирования метотрексата, митоксантрона и кверцетина**

Table 1. **Mass-spectrometric parameters for the detection of methotrexate, mitoxantrone and quercetin**

Параметры детектирования Detection parameters	**Анализируемые вещества** Analyzed substances		
	Метотрексат Methotrexate	**Митоксантрон** Mitoxantrone	**Кверцетин** Quercetin
Режим ионизации Ionization mode	**Положительный** Positive	**Положительный** Positive	**Негативный** Negative
Напряжение электроспрея Spray voltage	3500 В 3500 V	3700 В 3700 V	3000 В 3000 V
Оболочечный газ Sheath gas	35 Arb	50 Arb	50 Arb
Вспомогательный газ Aux gas	7 Arb	10 Arb	10 Arb
Продувочный газ Sweep gas	0 Arb	1 Arb	10 Arb
Температура трубки для переноса ионов Ion transfer tube temperature	300 °C	300 °C	300 °C
Температура испарителя Vaporizer temperature	350 °C	350 °C	350 °C
Условия детектирования Detection conditions	455,15 → 308,125 m/z и 455,15 → 174,98 m/z 455,15 → 308,125 m/z and 455,15 → 174,98 m/z	455 → 88,2 m/z и 455 → 358,1 m/z 455 → 88,2 m/z and 455 → 358,1 m/z	301 → 150,9 m/z и 301 → 178,9 m/z 301 → 150,9 m/z and 301 → 178,9 m/z
Энергия столкновения Collision energy	22,99 и 19,74 В 22,99 and 19,74 V	25 и 18 В 25 and 18 V	22 и 17 В 22 and 17 V
Фрагментация источника Source fragmentation	5	0	5
CID-газа CID gas	2 мТорр 2 mTorr	2 мТорр 2 mTorr	1 мТорр 1 mTorr

9 мин 70 и 30 %. Продолжительность анализа – 11 мин, при данных условиях время удерживания кверцетина составило 3,91 мин.

В описанных методиках внутренний стандарт не использовался.

Аналитический диапазон методики составил для метотрексата, митоксантрона и кверцетина соответственно 60–10000 нмоль/л, 50–1000 нмоль/л, 5–500 нмоль/л целевого вещества.

Параметры детектирования указаны в таблице 1.

Биоаналитические методики были валидированы путем доказательства селективности, линейности, удовлетворительных внутри- и межцикловой точности и прецизионности, стабильности образцов в процессе заморозки/разморозки, отсутствия переноса пробы и матричного эффекта[1].

Анализ результатов проводили с помощью программы STATISTICA 13.0 (StatSoft Inc., США). Критерий Шапиро – Уилка использовали для анализа распределения данных, а критерия Стьюдента применяли для попарного сравнения данных. Результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (M ± SD). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

[1] Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К; 2013. 328 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание BCRP в клетках линии Caco-2 к 21-м суткам культивирования, оцененное методом гетерогенного иммуноферментного анализа, составило 4,39 ± 0,12 нг/мг белка. Для сравнения – уровень Pgp в данной клеточной линии превышал 100 нг/мг белка [14].

При оценке транспорта субстратов BCRP были получены следующие результаты (таблица 2).

При добавлении метотрексата и митоксантрона в концентрации 1 мкМ, а кверцетина в концентрациях 1–10 мкМ как в апикальную, так и в базолатеральную камеры их содержание в камере-реципиенте было ниже НПКО.

При увеличении концентрации метотрексата до 5 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспортера вещества: коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a составил 1,46 ± 0,58, Papp a-b – 0,44 ± 0,18, а их отношение Papp b-a / Papp a-b превышало «2», что свидетельствует об участии BCRP в транспорте вещества.

При добавлении метотрексата в камеру-донор в концентрациях 10 и 50 мкМ отношение коэффициентов кажущейся проницаемости достоверно снижалось по сравнению с параметром при 5 мкМ до значений ниже единицы ($p = 0,00023$, $p = 0,00024$ соответственно), что свидетельствует о снижении транс-

Таблица 2. Транспорт субстратов BCRP через монослой клеток линии Caco-2 (M ± SD, ×10⁻⁶ см/сек)

Table 2. Transport of BCRP substrates through the monolayer of Caco-2 cells (M ± SD, ×10⁻⁶ cm/sec)

Тестируемое вещество Test substance		Papp b-a	Papp a-b	Papp b-a / Papp a-b
Метотрексат Methotrexate	1 мкМ 1 μM	*Не рассчитывались, т.к. концентрации вещества были ниже НПКО* *Were not calculated, because the concentrations of the substance were lower than LLOQ*		
	5 мкМ 5 μM	1,46 ± 0,58	0,44 ± 0,18	3,38 ± 0,078
	10 мкМ 10 μM	0,41 ± 0,13*	1,38 ± 0,18*	0,30 ± 0,052*
	50 мкМ 50 μM	0,41 ± 0,14*	0,98 ± 0,033*#	0,42 ± 0,14*
Митоксантрон Mitoxantrone	1 мкМ 1 μM	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ
	5 мкМ 5 μM	2,23 ± 0,090	0,82 ± 0,080	2,72 ± 0,16
	10 мкМ 10 μM	1,57 ± 0,32*	0,25 ± 0,045*	6,18 ± 0,17*
	50 мкМ 50 μM	0,75 ± 0,018*#	0,34 ± 0,054*	2,22 ± 0,30*#
Кверцетин Quercetin	1 мкМ 1 μM	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ
	5 мкМ 5 μM	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ
	10 мкМ 10 μM	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ	ниже НПКО below the LLOQ
	50 мкМ 50 μM	0,035 ± 0,015	0,02 ± 0,014	1,93 ± 0,46

Примечание. Серым цветом выделены значения отношения Papp b-a / Papp a-b, превышающее «2», свидетельствующее об участии эффлюксных транспортеров в трансцеллюлярном переносе вещества.

* – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями при концентрации вещества 5 мкМ; # – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями при концентрации вещества 10 мкМ.

Note. The values of the Papp b-a / Papp a-b ratio exceeding "2" are highlighted in gray, indicating the participation of efflux transporters in the transcellular transfer of the substance

* – $p < 0.05$ – significant differences with values at a concentration μM; # – $p < 0.05$ – significant differences with values at a concentration 10 μM.

порта метотрексата в направлении из клеток в апикальную камеру (соответствует эффлюксу в просвет кишечника). Скорее всего, полученные данные являются следствием насыщения белка-транспортера BCRP. Также возможна конкуренция BCRP с другим транспортным белком – RFC1, который также присутствует в клетках линии Caco-2 и обеспечивает инфлюкс метотрексата [15].

При концентрации митоксантрона в камере-доноре 5 мкМ наблюдалась асимметрия его транспорта через клеточный монослой: отношение коэффициентов кажущейся проницаемости превышало «2».

Увеличение концентрации митоксантрона в транспортной среде до 10 мкМ приводило к росту отношения коэффициентов кажущейся проницаемости по сравнению с параметром при концентрации 5 мкМ до 6,18 ± 0,08 ($p = 0,00024$). Однако при содержании вещества 50 мкМ показатель снижался по сравнению с сериями 5 мкМ ($p = 0,0297$) и 10 мкМ ($p = 0,00023$) вещества, однако оставался выше критического значения «2», что возможно объяснить насыщением BCRP.

При добавлении кверцетина в концентрации 50 мкМ в камеру-донор трансвелл-системы вещество детектировалось в камере-реципиенте в количествен менее 1 % от его содержания в камере-доноре, что свидетельствует о низкой проницаемости через клеточный монослой. При этом наблюдалась незначительная асимметрия его транспорта, недостаточная, однако, для утверждения участия BCRP в регуляции данного процесса в предложенных условиях.

Дальнейший эксперимент по подтверждению участия именно белка-транспортера BCRP в трансцеллюлярном переносе веществ проводился с использованием метотрексата и митоксантрона в концентрациях соответственно 5 и 10 мкМ, что связано с выявленными нами отношениями коэффициентов кажущейся проницаемости, превышающими значение «2». Для митоксантрона при этом наблюдалась максимальная асимметрия транспорта. Анализ заключался в оценке интенсивности переноса веществ через клеточный монослой в присутствии ингибитора BCRP – резерпина в концентрации 50 мкМ [16]. Полученные результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Влияние ингибитора BCRP резерпина (50 мкМ) на транспорт метотрексата и митоксантрона через монослой клеток линии Caco-2 (M ± SD, $\times 10^{-6}$ см/сек)

Table 3. Effect of BCRP inhibitor reserpine (50 μM) on the transport of methotrexate and mitoxantrone through the monolayer of Caco-2 cells (M ± SD, $\times 10^{-6}$ cm/sec)

Серия Series	Papp b-a	Papp a-b	Papp b-a / Papp a-b
Метотрексат 5 мкМ Methotrexate 5 μM	1,46 ± 0,58	0,44 ± 0,18	3,38 ± 0,08
Метотрексат 5 мкМ + резерпин Methotrexate 5 μM + reserpine	0,53 ± 0,13*	0,56 ± 0,27	1,02 ± 0,29*
Митоксантрон 10 мкМ Mitoxantrone 10 μM	1,57 ± 0,32	0,25 ± 0,045	6,18 ± 0,17
Митоксантрон 10 мкМ + резерпин Mitoxantrone 10 μM + reserpine	0,39 ± 0,057*	0,21 ± 0,025	1,84 ± 0,052*

Примечание. * – $p < 0,05$ – достоверные различия со значениями без добавления резерпина.

Note. * – $p < 0.05$ – significant differences with values without reserpine addition.

Резерпин снижал коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a метотрексата в 2,75 раза (уровень тенденции: $p = 0,053$), достоверно не изменял коэффициент кажущейся проницаемости Papp a-b ($p = 0,539$). Отношение Papp ba / Papp a-b при этом снижалось в 3,31 раза ($p = 0,0002$), что свидетельствует об устранении асимметрии транспорта вещества, вызванной участием эффлюксного белка-транспортера BCRP в контроле данного процесса. Это подтверждает возможность использования метотрексата в указанной концентрации для оценки принадлежности лекарственных веществ к ингибиторам данного транспортера.

При концентрации митоксантрона 10 мкМ резерпин снижал его коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a в 4,03 раза ($p = 0,0033$), не влиял достоверно на коэффициент кажущейся проницаемости Papp a-b и уменьшал соотношение Papp b-a / Papp a-b в 3,36 раза ($p < 0,0001$). Это также свидетельствует об участии BCRP в контроле трансцеллюлярного переноса митоксантрона и позволяет рекомендовать данное вещество в указанной концентрации в качестве субстрата для оценки влияния лекарственных средств на активность белка-транспортера.

Таким образом, коммерчески доступные в России клетки линии Caco-2 могут быть использованы для тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам/ингибиторам BCRP. При этом для тестирования на принадлежность к ингибиторам белка-транспортера в качестве субстрата оптимально использовать метотрексат или митоксантрон в концентрациях соответственно 5 и 10 мкМ, а для анализа принадлежности веществ к субстратам BCRP в качестве его ингибитора целесообразно применять резерпин в концентрации 50 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и апробирована на клетках линии Caco-2 методика тестирования лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP с использованием в качестве субстратов метотрексата (5 мкМ) и митоксантрона (10 мкМ), а в качестве ингибитора – резерпина (50 мкМ). Проведение подобного тестирования лекарственных средств на этапе их доклинических исследований позволит в дальнейшем осуществлять эффективную и безопасную фармакотерапию и прогнозировать возможные фармакокинетические межлекарственные взаимодействия на уровне транспортера. Кроме того, обнаружение эффективного ингибитора BCRP может служить основанием для развития новой стратегии лечения опухолей, гиперэкспрессирующих данный мембранный белок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sarkadi B., Homolya L., Hegedus T. The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology. *FEBS Lett*. 2020;594(23):4012–4034. DOI: 10.1002/1873-3468.13947.
2. Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., Ross D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(26):15665–15670. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15665.
3. Maliepaard M., Scheffer G. L., Faneyte I. F., van Gastelen M. A., Pijnenborg A. C., Schinkel A. H., van De Vijver M. J., Scheper R. J., Schellens J. H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research*. 2001;61(8):3458–3464.
4. Jonker J. W., Smit J. W., Brinkhuis R. F., Maliepaard M., Beijnen J. H., Schellens J. H., Schinkel A. H. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(20):1651–1656. DOI: 10.1093/jnci/92.20.1651.
5. Mao Q., Unadkat J. D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *The AAPS Journal*. 2015;17(1):65–82. DOI: 10.1208/s12248-014-9668-6.
6. Bircsak K. M., Gibson C. J., Robey R. W., Aleksunes L. M. Assessment of drug transporter function using fluorescent cell imaging. *Current Protocols in Toxicology*. 2013;57(1). DOI: 10.1002/0471140856.tx2306s57.
7. Zhang Y., Gupta A., Wang H., Zhou L., Vethanayagam R. R., Unadkat J. D., Mao Q. BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharmaceutical Research*. 2005;22(12):2023–2034. DOI: 10.1007/s11095-005-8384-4.
8. Yasuda K., Ganguly S., Schuetz E. G., Pheophorbide A. Fluorescent Bcrp Substrate to Measure Oral Drug-Drug Interactions in Real-Time In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018;46(11):1725–1733. DOI: 10.1124/dmd.118.083584.
9. Mukkavilli R., Jadhav G., Vangala S. Evaluation of Drug Transport in MDCKII-Wild Type, MDCKII-MDR1, MDCKII-BCRP and Caco-2 Cell Lines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2017;18(14):1151–1158. DOI: 10.2174/1389201019666180308091855.
10. Sesink A. L., Arts I. C., de Boer V. C., Breedveld P., Schellens J. H., Hollman P. C., Russel F. G. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Molecular Pharmacology*. 2005;67(6):1999–2006. DOI: 10.1124/mol.104.009753.

11. Якушева Е. Н., Щулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., Котлярова А. А., Слепнев А. А. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P in vitro. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2019;17(1):71–78. DOI: 10.17816/RCF17171-78.
12. Hilgers A. R., Conradi R. A., Burton P. S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*. 1990;7(9):902–910. DOI: 10.1023/a:1015937605100.
13. Elsby R., Surry D. D., Smith V. N., Gray A. J. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions. *Xenobiotica*. 2008;38(7–8):1140–1164. DOI: 10.1080/00498250802050880.
14. Щулькин А. В., Абаленихина Ю. В., Черных И. В., Ерохина П. Д., Якушева Е. Н. Роль Р-гликопротеина в ограничении проницаемости клеточных мембран при окислительном стрессе. *Биохимия*. 2021;86(2):236–247. DOI: 10.31857/S0320972521020081.
15. Maksimovic V., Pavlovic-Popovic Z., Vukmirovic S., Cvejic J., Mooranian A., Al-Salami H., Mikov M., Golocorbin-Kon S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(6):4699–4708. DOI: 10.1007/s11033-020-05481-9.
16. Li H., Li J., Liu L., Zhang Y., Luo Y., Zhang X., Yang P., Zhang M., Yu W., Qu S. Elucidation of the Intestinal Absorption Mechanism of Celastrol Using the Caco-2 Cell Transwell Model. *Planta Medica*. 2016;82(13):1202–1207. DOI: 10.1055/s-0035-1568597.

REFERENCES

1. Sarkadi B., Homolya L., Hegedus T. The ABCG2/BCRP transporter and its variants – from structure to pathology. *FEBS Lett*. 2020;594(23):4012–4034. DOI: 10.1002/1873-3468.13947.
2. Doyle L. A., Yang W., Abruzzo L. V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A. K., Ross D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(26):15665–15670. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15665.
3. Maliepaard M., Scheffer G. L., Faneyte I. F., van Gastelen M. A., Pijnenborg A. C., Schinkel A. H., van De Vijver M. J., Scheper R. J., Schellens J. H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Research*. 2001;61(8):3458–3464.
4. Jonker J. W., Smit J. W., Brinkhuis R. F., Maliepaard M., Beijnen J. H., Schellens J. H., Schinkel A. H. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(20):1651–1656. DOI: 10.1093/jnci/92.20.1651.
5. Mao Q., Unadkat J. D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *The AAPS Journal*. 2015;17(1):65–82. DOI: 10.1208/s12248-014-9668-6.
6. Bircsak K. M., Gibson C. J., Robey R. W., Aleksunes L. M. Assessment of drug transporter function using fluorescent cell imaging. *Current Protocols in Toxicology*. 2013;57(1). DOI: 10.1002/0471140856.tx2306s57.
7. Zhang Y., Gupta A., Wang H., Zhou L., Vethanayagam R. R., Unadkat J. D., Mao Q. BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharmaceutical Research*. 2005;22(12):2023–2034. DOI: 10.1007/s11095-005-8384-4.
8. Yasuda K., Ganguly S., Schuetz E. G., Pheophorbide A. Fluorescent Bcrp Substrate to Measure Oral Drug-Drug Interactions in Real-Time In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018;46(11):1725–1733. DOI: 10.1124/dmd.118.083584.
9. Mukkavilli R., Jadhav G., Vangala S. Evaluation of Drug Transport in MDCKII-Wild Type, MDCKII-MDR1, MDCKII-BCRP and Caco-2 Cell Lines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2017;18(14):1151–1158. DOI: 10.2174/1389201019666180308091855.
10. Sesink A. L., Arts I. C., de Boer V. C., Breedveld P., Schellens J. H., Hollman P. C., Russel F. G. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Molecular Pharmacology*. 2005;67(6):1999–2006. DOI: 10.1124/mol.104.009753.
11. Yakusheva E. N., Shchulkin A. V., Chernykh I. V., Popova N. M., Kotlyarova A. A., Slepnev A. A. Assessment of drugs belonging to inhibitors and inductors of P-glycoprotein in vitro. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(1):71–78. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF17171-78.
12. Hilgers A. R., Conradi R. A., Burton P. S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research*. 1990;7(9):902–910. DOI: 10.1023/a:1015937605100.
13. Elsby R., Surry D. D., Smith V. N., Gray A. J. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions. *Xenobiotica*. 2008;38(7–8):1140–1164. DOI: 10.1080/00498250802050880.
14. Shchulkin A. V., Abalenikhina Yu. V., Chernykh I. V., Erokhina P. D., Yakusheva E. N. Role P-glycoprotein in limitation of permeability of cell membranes during oxidative stress. *Biochemistry*. 2021;86(2):236–247. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0320972521020081.
15. Maksimovic V., Pavlovic-Popovic Z., Vukmirovic S., Cvejic J., Mooranian A., Al-Salami H., Mikov M., Golocorbin-Kon S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(6):4699–4708. DOI: 10.1007/s11033-020-05481-9.
16. Li H., Li J., Liu L., Zhang Y., Luo Y., Zhang X., Yang P., Zhang M., Yu W., Qu S. Elucidation of the Intestinal Absorption Mechanism of Celastrol Using the Caco-2 Cell Transwell Model. *Planta Medica*. 2016;82(13):1202–1207. DOI: 10.1055/s-0035-1568597.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-95-102
УДК 543.544.5.068.7

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики количественного определения эторикоксиба в жидкой лекарственной форме

А. Х. Амандусова[1, 2]✉, А. Е. Коваленко[2], А. В. Морозов[1], К. Р. Савельева[1], Т. Л. Баталова[1], О. А. Остапюк[1], Л. В. Персанова[1], Т. Ю. Андреевичева[1], А. Г. Бениашвили[1], В. Н. Шестаков[1], С. В. Поляков[1]

[1] ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП»), 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6
[2] ФБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева» (РХТУ им. Д. И. Менделеева), 125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9

✉ **Контактное лицо:** Амандусова Акжвек Хасановна. **E-mail:** akzhvek-31.05@mail.ru

ORCID: А. Х. Амандусова – https://orcid.org/0000-0001-6309-6853; А. Е. Коваленко – https://orcid.org/0000-0002-8412-0311;
А. В. Морозов – https://orcid.org/0000-0002-8987-2651; К. Р. Савельева – https://orcid.org/ 0000-0002-6344-2522; Т. Л. Баталова – https://orcid.org/0000-0001-7119-0030;
О. А. Остапюк – https://orcid.org/0000-0002-0122-2030; Л. В. Персанова – https://orcid.org/0000-0003-4124-328X; Т. Ю. Андреевичева – https://orcid.org/0000-0003-2507-3516;
А. Г. Бениашвили – https://orcid.org/0000-0002-5149-3760; В. Н. Шестаков – https://orcid.org/0000-0002-6507-7530; С. В. Поляков – https://orcid.org/0000-0003-4234-1156.

Статья поступила: 30.03.2022 **Статья принята в печать:** 31.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Эторикоксиб – селективный ингибитор циклооксигеназы (ЦОГ-2), применяемый для лечения острой боли и обладающий противовоспалительной и анальгетической эффективностью. Эторикоксиб вызывает меньшее количество осложнений по сравнению с другими нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП). ФБУ «ГИЛС и НП» была разработана глазная жидкая лекарственная форма на основе эторикоксиба. В настоящей статье предложена методика определения содержания эторикоксиба в жидкой лекарственной форме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения эторикоксиба в жидкой лекарственной форме.

Материалы и методы. Для анализа использовали глазные капли с концентрацией действующего вещества эторикоксиба 0,05 %, стандартный образец эторикоксиб (Kekule Pharma Limited, Индия, серия ACE-3 WS001/15). Хроматографическое разделение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1220 Infinity II LC (Agilent Technologies, США), оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и детектором с диодной матрицей. Анализ проводили на колонке Kromasil C8 250 × 4,6 мм, используя в качестве подвижной фазы ацетонитрил и 0,05 М буферный раствор дигидрофосфата калия pH = 4,2 в соотношении 46 : 54. Время анализа составило 15 минут при длине волны детектирования 235 нм.

Результаты и обсуждение. Разработана и проведена валидация методики количественного определения эторикоксиба в жидкой лекарственной форме по следующим показателям специфичность, линейность, правильность, промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность, повторяемость.

Заключение. По результатам валидационных испытаний все перечисленные параметры соответствуют критериям приемлемости. Предлагаемая методика характеризуется высокой эффективностью и специфичностью.

Ключевые слова: эторикоксиб, жидкая лекарственная форма, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), валидация

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

Вклад авторов. А. Х. Амандусова, К. Р. Савельева, Т. Л. Баталова, О. А. Остапюк участвовали в разработке аналитической методики, проведении экспериментов и обработке данных. Т. Ю. Андреевичева и Л. В. Персанова разработали лекарственную форму. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Амандусова А. Х., Коваленко А. Е., Морозов А. В., Савельева К. Р., Баталова Т. Л., Остапюк О. А., Персанова Л. В., Андреевичева Т. Ю., Бениашвили А. Г., Шестаков В. Н., Поляков С. В. Разработка и валидация методики количественного определения эторикоксиба в жидкой лекарственной форме. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):95–102. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-95-102

Development and Validation of a Method for the Quantitative Determination of Etoricoxib in Liquid Dosage Form

Akzhvek Kh. Amandusova[1, 2]✉, Aleksei E. Kovalenko[2], Andrei V. Morozov[1], Kristina R. Savelyeva[1], Tatyana L. Batalova[1], Oxana A. Ostapyuk[1], Luydmila V. Persanova[1], Tatyana Yu. Andreevicheva[1], Allan G. Beniashvili[1], Vladislav N. Shestakov[1], Sergei V. Polyakov[1]

[1] Federal State Institution «State Institute of Drugs and Good Practices», 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia
[2] Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya square, Moscow, 125047, Russia

✉ **Corresponding author:** Akzhvek Kh. Amandusova. **E-mail:** akzhvek-31.05@mail.ru

© Амандусова А. Х., Коваленко А. Е., Морозов А. В., Савельева К. Р., Баталова Т. Л., Остапюк О. А., Персанова Л. В., Андреевичева Т. Ю., Бениашвили А. Г., Шестаков В. Н., Поляков С. В., 2023
© Amandusova A. Kh., Kovalenko A. E., Morozov A. V., Savelyeva K. R., Batalova T. L., Ostapyuk O. A., Persanova L. V., Andreevicheva T. Yu., Beniashvili A. G., Shestakov V. N., Polyakov S. V., 2023

ORCID: Akzhvek Kh. Amandusova – https://orcid.org/0000-0001-6309-6853; Aleksei E. Kovalenko – https://orcid.org/0000-0002-8412-0311; Andrei V. Morozov – https://orcid.org/0000-0002-8987-2651; Kristina R. Savelyeva – https://orcid.org/ 0000-0002-6344-2522; Tatyana L. Batalova – https://orcid.org/0000-0001-7119-0030; Oxana A. Ostapyuk – https://orcid.org/0000-0002-0122-2030; Luydmila V. Persanova – https://orcid.org/0000-0003-4124-328X; Tatyana Yu. Andreevicheva – https://orcid.org/0000-0003-2507-3516; Allan G. Beniashvili – https://orcid.org/0000-0002-5149-3760; Vladislav N. Shestakov – https://orcid.org/0000-0002-6507-7530; Sergei V. Polyakov – https://orcid.org/0000-0003-4234-1156.

Received: 30.03.2022 **Revised:** 31.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Etoricoxib is a selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitor used for the treatment of acute pain and has anti-inflammatory and analgesic efficacy. Etoricoxib causes fewer complications compared to other non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). FSI "SID and GP" has developed an ophthalmic liquid dosage form based on etoricoxib. This article proposes a method for determining the content of etoricoxib in a liquid dosage form by high performance liquid chromatography with UV detection.

Aim. Development and validation of a method for the quantitative determination of etoricoxib in liquid dosage form.

Materials and methods. Eye drops with a concentration of the active substance etoricoxib of 0.05 % were used for the analysis, a standard sample of etoricoxib (Kekule Pharma Limited, India, series ACE-3 WS001/15). Chromatographic separation performed on an Agilent 1220 Infinity II LC high performance liquid chromatograph (Agilent Technologies, USA) equipped with a gradient pump, a column thermostat, and a diode array detector. The analysis carried out on a Kromasil C8 column 250 × 4.6 mm, using acetonitrile and 0.05 M buffer solution of potassium dihydrogen phosphate pH = 4.2 as a mobile phase in a ratio of 46 : 54. The analysis time was 15 minutes at a detection wavelength of 235 nm.

Results and discussion. A method for the quantitative determination of etoricoxib in a liquid dosage form developed and validated according to the following indicators: specificity, linearity, accuracy, range, intermediate precision, repeatability.

Conclusion. According to the results of validation tests, all of the listed parameters meet the acceptance criteria. The proposed method characterize by high efficiency and specificity.

Keywords: etoricoxib, liquid dosage form, high performance liquid chromatography (HPLC), 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. Akzhvek Kh. Amandusova, Kristina. R. Savelyeva, Tatyana. L. Batalova, Oxana. A. Ostapyuk participated in the development of the analytical methodology, experiments and data processing. Tatyana. Yu. Andreevicheva, Luydmila. V. Persanova developed the dosage form. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

For citation: Amandusova A. Kh., Kovalenko A. E., Morozov A. V., Savelyeva K. R., Batalova T. L., Ostapyuk O. A., Persanova L. V., Andreevicheva T. Yu., Beniashvili A. G., Shestakov V. N., Polyakov S. V. Development and validation of a method for the quantitative determination of etoricoxib in liquid dosage form. *Drug development & registration*. 2023;12(2):95–102. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-95-102

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) являются наиболее широко используемыми лекарствами в нескольких странах для лечения симптомов боли и воспаления [1, 2]. НПВП представляют собой химически разнообразную группу веществ со значительной неоднородностью по химической структуре и свойствам [3]. Среди них представлен ряд селективных ингибиторов циклооксигеназы II (ЦОГ-2) группы коксибов, характеризующихся меньшей частотой развития осложнений и нежелательных реакций в сравнении с другими НПВП [4]. Эторикоксиб (5-хлор-6-метил-3[4-(метилсульфонил)фенил]-2,3-бипиридин (рисунок 1) обладает улучшенной биохимической селективностью по сравнению с другими коммерчески доступными коксибами (рофекоксиб, вальдекоксиб или целекоксиб) [4, 5]. Данные из различных источников, включая рандомизированные контролируемые испытания и мета-анализы, свидетельствуют о том, что эторикоксиб связан с меньшей токсичностью желудочно-кишечного тракта, чем диклофенак [6], и обладает лучшей обезболивающей активностью по сравнению с ибупрофеном и диклофенаком [7]. Обширные клинические испытания подтвердили анальгетическую и противовоспалительную эффективность эторикоксиба [7, 8]. Эторикоксиб одобрен в ряде стран для различных показаний, включая лечение острой боли, хронического лечения признаков и симптомов остеоартрита и ревматоидного артрита [8].

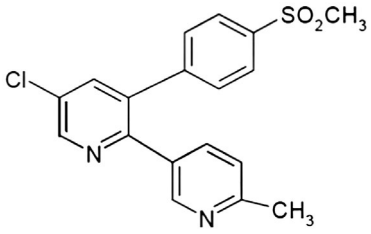


Рисунок 1. Структурная формула эторикоксиба

Figure 1. Structure of etoricoxib

Эторикоксиб практически нерастворим в воде и относится к соединениям липофильной природы. Для того, чтобы повысить растворимость эторикоксиба используют разные физико-химические способы: получение полиморфных систем, добавление небольшого количества менее полярного растворителя в более полярный растворитель [9–11], образование

твердых дисперсий или уменьшение размеров частиц [12]. Так как аморфная форма эторикоксиба нестабильна, то во время разработки и изготовления твердых лекарственных форм на его основе используют фармацевтическую субстанцию только кристаллической формы [13].

ФБУ «ГИЛС и НП» была разработана глазная жидкая лекарственная форма на основе эторикоксиба. При исследовании жидких лекарственных форм одним из важнейших показателей является определение активного компонента. Для количественного определения эторикоксиба в разработанной лекарственной форме предложен метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Целью данного исследования является разработка и валидация методики количественного определения эторикоксиба в жидкой лекарственной форме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование и реактивы. Для анализа использовали глазные капли с концентрацией действующего вещества 0,05 % и модельную смесь, аналогичную по составу глазным каплям, не содержащую эторикоксиб. Составы лекарственного препарата и модельной смеси приведены в таблице 1.

Таблица 1. Состав лекарственного препарата и модельной смеси препарата

Table 1. The composition of the medicinal product and the model mixture of the drug

Компоненты Components	**Содержание в препарате, %** Content in the drug, %	**Модельная смесь, %** Model mixture, %
Эторикоксиб Etoricoxib	0,05	–
Гиалуроновая кислота Hyaluronic acid	0,4	0,4
Повидон К30 Povidone K30	3,0	3,0
Глицерин Glycerol	1,0	1,0
Твин-20 Twin-20	2,0	2,0
ЭДТА EDTA	0,1	0,1
Нипагин Nipagin	0,1	0,1
Фосфатный буферный раствор Phosphate buffer solution	до 100 мл to 100 ml	до 100 мл to 100 ml

Хроматографическое разделение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1220 Infinity II LC (Agilent Technologies, США), оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и детектором с диодной матрицей. Взвешивание образцов проводили на весах Secura 225D-10RU (Sartorius Lab Instruments GmbH, Германия).

В работе использовали стандартный образец эторикоксиб (Kekule Pharma Limited, Индия, серия ACE-3 WS001/15); эторикоксиб субстанция-порошок (Kekule Pharma LTC, серия ACE-0111G/ACE 1011G); ацетонитрил (UV-IR-HPLC-gradient, ACS, Panreac, Германия, серия 361881.1611); вода очищенная.

Метод ВЭЖХ. Приготовление стандартного раствора эторикоксиба. Около 0,1 г стандартного образца эторикоксиба (точная навеска) помещают в мерную колбу объемом 100,0 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы, тщательно перемешивают в течении 15 минут. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного стандартного раствора 2,0 мл, помещают в мерную колбу объемом 100,0 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через мембранный фильтр Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичный.

Приготовление испытуемого раствора. 1,0 мл лекарственного препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки подвижной фазой, перемешивают. Раствор фильтруют через мембрану Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичный.

Приготовление раствора модельной смеси. 1,0 мл модельной смеси помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки подвижной фазой, перемешивают. Раствор фильтруют через мембрану Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичный.

Приготовление подвижной фазы. Смесь ацетонитрила и 0,05 М буферного раствора дигидрофосфата калия pH = 4,2 в соотношении 46:54 профильтрованная и дегазированная.

Условия хроматографирования:

Колонка: Kromasil C8 250 × 4,6 мм, 10 мкм.

Температура колонки: 25 ± 1 °C.

Детектор: УФ-спектрофотометрический, длина волны 235 нм.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Подвижная фаза: ацетонитрил и 0,05 М буферный раствор дигидрофосфата калия pH = 4,2 в соотношении 46:54.

Объем пробы: 25 мкл.

Время хроматографирования: 15 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При разработке методики количественного определения варьировались следующие характеристики: pH буферного раствора и соотношение подвижной фазы. Исходя из полученных данных (таблица 2), по числу теоретических тарелок наиболее оптимальным буферным раствором был выбран 0,05 М KH_2PO_4 pH 4,2 в соотношении 54:46 (буфер:ацетонитрил) при времени выхода эторикоксиба около 8,6 мин. При соотношении 65:35 (буфер:ацетонитрил) (№ 1, 3) время выхода составило около 18 мин, что является нецелесообразным для методики количественного определения.

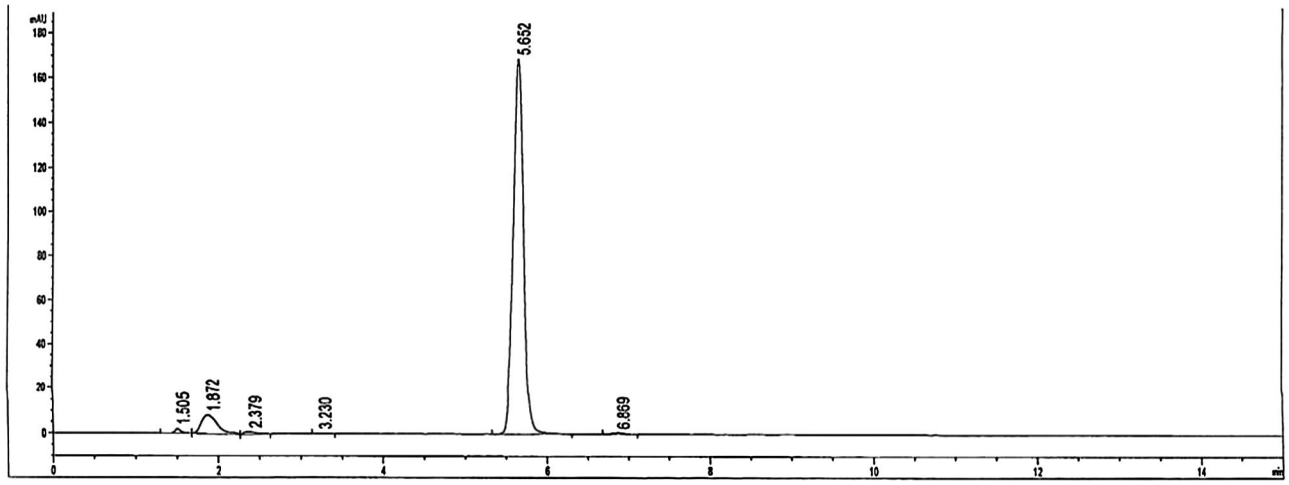


Рисунок 2. **Хроматограмма раствора модельной смеси**

Figure 2. **Chromatogram of a solution of a model mixture**

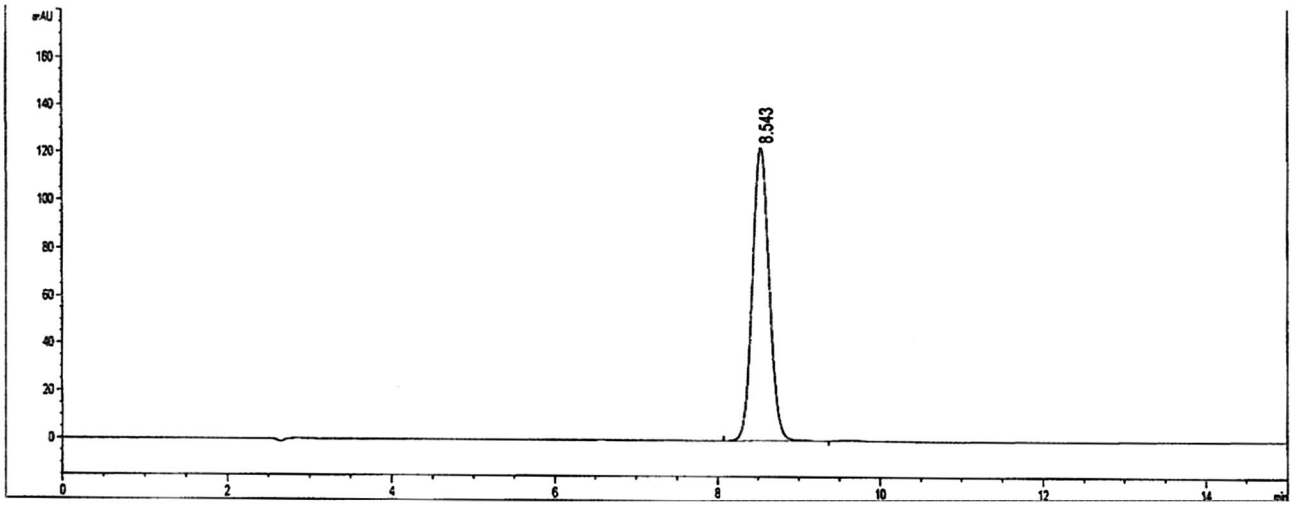


Рисунок 3. **Хроматограмма стандартного раствора эторикоксиба**

Figure 3. **Chromatogram of a standard solution of etoricoxib**

Таблица 2. **Подбор условий**

Table 2. **Selection of conditions**

№	Буферный раствор Buffer solution	Число теоретических тарелок Number of theoretical plates		
		Соотношение 54:46 (буфер:ацетонитрил) Ratio 54:46 (buffer:acetonitrile)	Соотношение 65:35 (буфер:ацетонитрил) Ratio 65:35 (buffer:acetonitrile)	Соотношение 35:65 (буфер:ацетонитрил) Ratio 35:65 (buffer:acetonitrile)
1	0,05 М KH_2PO_4 pH 4.2	8044	8916	7681
2	0,05 М KH_2PO_4 pH 3.1	7339	7457	7242
3	0,05 М KH_2PO_4 pH 5.5	7814	8359	7648
4	0,01 М $H3PO_4$ pH 2.5	4882	2469	5689

Методика была валидирована по показателям: специфичность, линейность, правильность, промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность, повторяемость[1].

Под специфичностью понимали способность методики однозначно оценивать аналит на фоне вспомогательных компонентов, присутствующих в испытуемом растворе. Для подтверждения специфичности анализировали модельную смесь, не содержащую эторикоксиб (рисунок 2, таблица 3). Анализ профилей полученных хроматограмм показал, что пик эторикоксиба определяется на фоне пиков вспомогательных компонентов. В результате анализа (рисунки 3, 4)

[1] ГФ XIV ОФС.1.1.0012.15. «Валидация аналитических методик». Доступно по: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskih-metodik/ Ссылка активна на 28.03.2021.

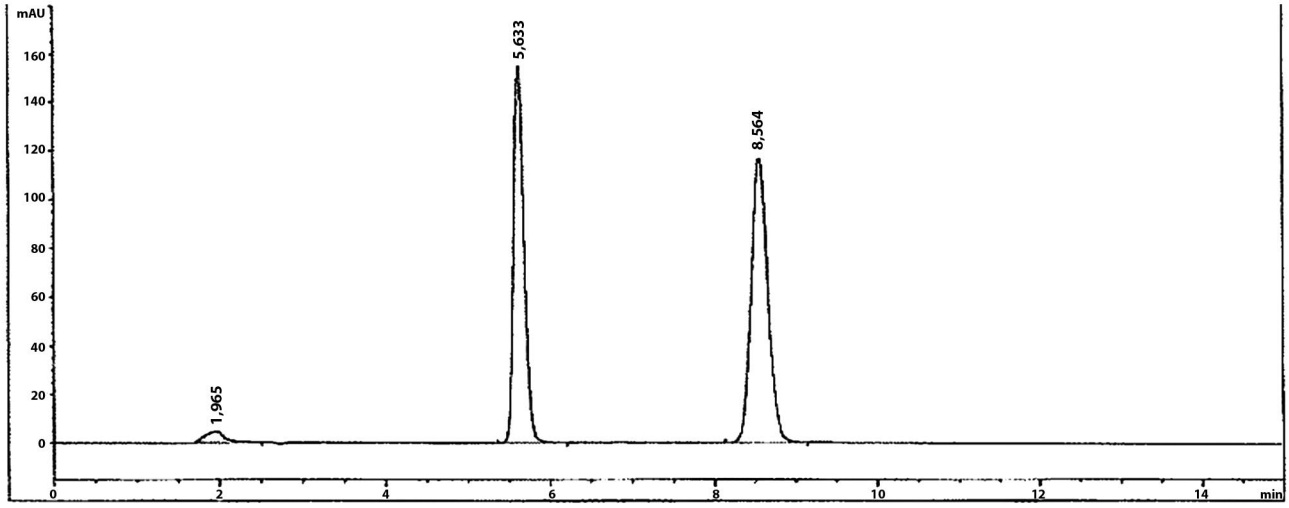


Рисунок 4. **Хроматограмма испытуемого раствора лекарственного препарата**

Figure 4. **Chromatogram of the test solution of the drug**

Таблица 3. **Данные для определения специфичности**

Table 3. **Data for determining specificity**

Наименование образца Sample name	**Концентрация анализируемого раствора, мкг/мл** The concentration of the analyzed solution, mcg/ml	**Площадь пика (A), mAU × сек** Peak area (A), mAU × sec					
		A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6
Стандартный образец Standard sample	21,35	1757,9	1762,3	1761,8	1758,4	1763,5	1761,2
	21,22	1746,1	1751,8	1751,4	1748,6	1751,1	1749,4
	21,32	1759,7	1760,1	1756,8	1756,7	1754,8	1757,7
Испытуемый препарат Test drug	21,58	1780,0	1780,2	1779,5	1779,1	1782,7	1779,4
	21,50	1774,3	1772,5	1772,5	1774,7	1775,4	1774,2
	21,54	1776,8	1776,1	1776,7	1775,8	1777,2	1776,9
Модельная смесь Model mixture	–	–	–	–	–	–	–
Статистические характеристики *Statistical characteristics*							
Характеристика Characteristic	**Наименование образца** Sample name						
	Стандартный раствор Standard sample			**Испытуемый препарат** Test solution			**Модельная смесь** Model mixture
Средняя площадь пика, mAU × сек Average peak area, mAU × sec	1760,9	1749,7	1757,6	1779,4	1774,2	1776,9	–
Стандартное отклонение, % Standard deviation, %	2,23	2,16	1,99	1,31	1,18	1,13	–
Коэффициент вариации, % The coefficient of variation, %	0,12	0,12	0,11	0,07	0,06	0,06	–

время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора совпадает со временем удерживания основного пика на хроматограмме стандартного раствора эторикоксиба и составляет около 8,6 мин. На хроматограмме модельной смеси пика эторикокосиба не наблюдалось.

Линейность аналитической методики заключается в наличии линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Определение линейности проводили на 5 уровнях концентрации от 80 до 120 % от номинального значения 20 мкг/мл (таблица 4).

Установлено, что график зависимости имеет линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описывается уравнением:

Таблица 4. **Данные для определения линейности**

Table 4. **Data for determining linearity**

Концентрация анализируемого раствора, мкг/мл The concentration of the analyzed solution, mcg/ml	Площадь пика (А), mAU × сек Peak area (A), mAU × sec				Стандартное отклонение, % Standard deviation, %	Коэффициент вариации, % The coefficient of variation, %
	A_1	A_2	A_3	$A_{ср}$		
15,14	1239,3	1240,9	1240,1	1240,1	1,20	0,10
17,28	1417,3	1416,4	1414,7	1416,1	1,32	0,09
19,44	1592,6	1593,8	1593,2	1593,2	0,60	0,04
21,60	1769,2	1771,1	1770,4	1770,2	0,96	0,05
23,76	1947,9	1945,1	1948,6	1947,2	1,85	0,09
25,92	2122,8	2125,4	2124,5	2124,2	1,32	0,06

$$y = 81{,}997x - 1{,}024.$$

Полученные данные представлены в виде градуировочного графика с указанием коэффициента корреляции на рисунке 5.

Правильность выражают величиной открываемости – процентное соотношение между экспериментальной концентрацией и номинальной концентрацией для каждого образца с учетом соответствующих доверительных интервалов. Результаты представлены в таблице 5.

Процент открываемости составил от 100,2 до 101,1 %.

Повторяемость методики характеризует прецизионность методики при выполнении повторных испытаний в одинаковых рабочих условиях в пределах короткого промежутка времени. Сходимость была доказана при помощи испытаний лекарственного препарата. Оценка проводилась путем расчета процента известной концентрации, стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения, относительной погрешности и доверительного интервала. Результаты определения сходимости представлены в таблице 6.

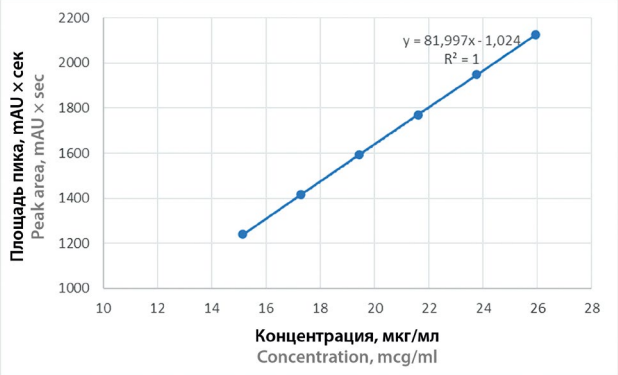


Рисунок 5. **Линейность методом ВЭЖХ**

Figure 5. **Linearity of the HPLC method**

Таблица 5. **Правильность**

Table 5. **Accuracy**

Уровень концентрации Concentration level	Площадь пика, mAU × сек Peak area, mAU × sec	Концентрация анализируемого раствора, мкг/мл The concentration of the analyzed solution, mcg/ml	Полученное содержание в препарате, мкг/мл The resulting content, mcg/ml	Среднее, мкг/мл Average value, mcg/ml	Стандартное относительное отклонение, % Relative standard deviation, %	Процент открываемости, % Percent openability, %
80 %	1330,3	16,23	403,56	404,09	0,11	101,00
	1333,2	16,27	404,43			
	1331,8	16,25	404,01			
100 %	1673,3	20,42	507,34	505,51	0,32	101,10
	1663,5	20,3	504,40			
	1664,7	20,31	504,75			
120 %	1983,9	24,28	601,32	601,14	0,53	100,20
	1972,3	24,06	597,82			
	1993,3	24,32	604,18			

Таблица 6. **Данные для характеристики повторяемость**

Table 6. **Data for characterizing repeatability**

№	Площадь пика, mAU × сек Peak aream, AU × sec	Концентрация анализируемого раствора, мкг/мл The concentration of the analyzed solution, mcg/ml	Полученное содержание в препарате, мкг/мл The resulting content, mcg/ml	Среднее, мкг/мл Average value, mcg/ml	Стандартное отклонение Standard deviation	Относительная погрешность, % Relative accuracy, %	Доверительный интервал Confidence interval	Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %
1	1782,7	21,75	543,81	540,45	3,45	0,51	541,95 ± 2,76	0,65
2	1770,4	21,61	540,06					
3	1769,2	21,59	539,69					
4	1751,3	21,36	534,23					
5	1776,2	21,67	541,83					
6	1780,2	21,72	543,05					

Относительное стандартное отклонение параллельных определений для 6 измерений составило 0,65 %.

Промежуточная прецизионность характеризует влияние вариаций внутри лаборатории на результаты идентичных образцов, отобранных из одной и той же серии. Оценка проводилась путем расчета процента известной концентрации, стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения, относительной погрешности и доверительного интервала. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности двух аналитиков в разные дни представлены в таблице 7.

Относительное стандартное отклонение при определении внутрилабораторной прецизионности составило не более 2 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения эторикоксиба в жидкой лекарственной форме с использованием ВЭЖХ. При разработке методики меняли pH буферного раствора и соотношение подвижной фазы. Наиболее оптимальным вариантом был выбран 0,05 М калия дигидрофосфат pH 4.2 в соотношении 54:46 (буфер:ацетонитрил). Подобранные условия количественного определения эторикоксиба обеспечивают быстрое время анализа и простоту пробоподготовки. Результаты валидационных испытаний показали, что методика обладает достаточной точностью, воспроизводимостью, доказана линейность в диапазоне концентраций от 80 до 120 % от номинального значения 20 мкг/мл. Разработанная

Таблица 7. **Промежуточная прецизионность**

Table 7. **Intermediate precision**

	№	Площадь пика, mAU × сек Peak area, mAU × sec	Концентрация анализируемого раствора, мкг/мл The concentration of the analyzed solution, mcg/ml	Полученное содержание в препарате, мкг/мл The resulting content, mcg/ml	Среднее, мкг/мл Average value, mcg/ml	Стандартное отклонение Standard deviation	Относительная погрешность, % Relative accuracy, %	Доверительный интервал Confidence interval	Стандартное относительное отклонение, % Relative standard deviation, %
Химик 1 Chemist 1	1	1770,1	21,60	536,75	537,51	0,90	0,20	537,50 ± 1,02	0,17
	2	1772,2	21,63	537,25					
	3	1776,2	21,67	538,50					
Химик 2 Chemist 2	1	1769,7	21,60	536,50	536,50	1,25	0,26	536,50 ± 1,41	0,23
	2	1773,8	21,65	537,75					
	3	1765,9	21,55	535,25					

методика может быть использована для количественного анализа эторикоксиба в жидкой лекарственной форме в диапазоне концентраций от 16 до 24 мкг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sriuttha P., Sirichanchuen B., Permsuwanof U. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *International Journal of Hepatology*. 2018;2018:1–13. DOI: 10.1155/2018/5253623.
2. Feng X., Tian M., Zhang W., Mei H. Gastrointestinal safety of etoricoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Plos one*. 2018;13(1):1–13. DOI: 10.1371/journal.pone.0190798.
3. Hunter T. S., Robison C., Gerbino P. P. Emerging evidence in NSAID pharmacology: important considerations for product selection. *The American Journal of Managed Care*. 2015;21(7):139–147.
4. Hartman R., Abrahim A., Clausen A., Mao B., Crocker L. S. Development and Validation of an HPLC Method for the Impurity and Quantitative Analysis of Etoricoxib. *Journal of liquid chromatography and related technologies*. 2003;26(15):2551–2566. DOI: 10.1081/JLC-120023800.
5. Patrignani P., Capone M. L., Tacconelli S. Clinical pharmacology of etoricoxib: a novel selective COX2 inhibitor. *Expert Opin Pharmacother*. 2003;4(2):265–284. DOI: 10.1517/14656566.4.2.265.
6. Walker C. Are All Oral COX-2 Selective Inhibitors the Same? A Consideration of Celecoxib, Etoricoxib, and Diclofenac. *International Journal of Rheumatology*. 2018;1302835. DOI: 10.1155/2018/1302835.
7. Franco-de la Torre L., Franco-González D. L., Brennan-Bourdon L. M., Molina-Frechero N., Alonso-Castro A. J., Isiordia-Espinoza M. A. Analgesic Efficacy of Etoricoxib following Third Molar Surgery: A Meta-analysis. *Behavioural Neurology*. 2021;9536054. DOI: 10.1155/2021/9536054.
8. Matsumoto A. K., Cavanaugh P. Etoricoxib. *Drugs Today (Barc)*. 2004;40(5):395–414. DOI: 10.1358/dot.2004.40.5.850488.
9. Rathi P., Jouyban A., Khoubnasabjafari M., Kale M. Solubility of Etoricoxib in Aqueous Solutions of 1,4-Butanediol,1,4-Dioxane, N,N-Dimethylacetamide,N,N-Dimethylformamide, Dimethyl Sulfoxide, and Ethanol at 298.2 K. *Chemical Engineering Journal*. 2015;60:2128–2134. DOI: 10.1021/ACS.JCED.5B00201.
10. Rathi P. B., Kale M., Soleymani J., Jouyban A. Solubility of Etoricoxib in Aqueous Solutions of Glycerin, Methanol, Polyethylene Glycols 200, 400, 600, and Propylene Glycol at 298.2 K. *Journal of chemical and engineering data*. 2018;63(2):321–330. DOI: 10.1021/acs.jced.7b00709.
11. Martínez F., Jouyban A., Acree W. E., Jr. Preferential solvation of etoricoxib in some aqueous binary cosolvent mixtures at 298.15 K. *Phisics and Chemistry of Liquids*. 2016;55(3):291–303. DOI: 10.1080/00319104.2016.1198481.
12. Краснюк И. И. (мл.), Овсянникова Л. В., Степанова О. И., Беляцкая А. В., Краснюк И. И., Харитонов Ю. Я., Грих В. В., Кошелева Т. М., Король Л. А. Применение твердых дисперсий с нестероидными противовоспалительными средствами в фармации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 2:40–44.
13. Баталова Т. Л., Остапюк О. А., Савельева К. Р., Андреевичева Т. Ю., Персанова Л. В., Поляков С. В., Шестаков В. Н. Разработка и валидация методики количественного определения эторикоксиба в твердых лекарственных формах методом ВЭЖХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;1(22):90–95.

REFERENCES

1. Sriuttha P., Sirichanchuen B., Permsuwanof U. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *International Journal of Hepatology*. 2018;2018:1–13. DOI: 10.1155/2018/5253623.
2. Feng X., Tian M., Zhang W., Mei H. Gastrointestinal safety of etoricoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Plos one*. 2018;13(1):1–13. DOI: 10.1371/journal.pone.0190798.
3. Hunter T. S., Robison C., Gerbino P. P. Emerging evidence in NSAID pharmacology: important considerations for product selection. *The American Journal of Managed Care*. 2015;21(7):139–147.
4. Hartman R., Abrahim A., Clausen A., Mao B., Crocker L. S. Development and Validation of an HPLC Method for the Impurity and Quantitative Analysis of Etoricoxib. *Journal of liquid chromatography and related technologies*. 2003;26(15):2551–2566. DOI: 10.1081/JLC-120023800.
5. Patrignani P., Capone M. L., Tacconelli S. Clinical pharmacology of etoricoxib: a novel selective COX2 inhibitor. *Expert Opin Pharmacother*. 2003;4(2):265–284. DOI: 10.1517/14656566.4.2.265.
6. Walker C. Are All Oral COX-2 Selective Inhibitors the Same? A Consideration of Celecoxib, Etoricoxib, and Diclofenac. *International Journal of Rheumatology*. 2018;1302835. DOI: 10.1155/2018/1302835.
7. Franco-de la Torre L., Franco-González D. L., Brennan-Bourdon L. M., Molina-Frechero N., Alonso-Castro A. J., Isiordia-Espinoza M. A. Analgesic Efficacy of Etoricoxib following Third Molar Surgery: A Meta-analysis. *Behavioural Neurology*. 2021;9536054. DOI: 10.1155/2021/9536054.
8. Matsumoto A. K., Cavanaugh P. Etoricoxib. *Drugs Today (Barc)*. 2004;40(5):395–414. DOI: 10.1358/dot.2004.40.5.850488.
9. Rathi P., Jouyban A., Khoubnasabjafari M., Kale M. Solubility of Etoricoxib in Aqueous Solutions of 1,4-Butanediol,1,4-Dioxane, N,N-Dimethylacetamide,N,N-Dimethylformamide, Dimethyl Sulfoxide, and Ethanol at 298.2 K. *Chemical Engineering Journal*. 2015;60:2128–2134. DOI: 10.1021/ACS.JCED.5B00201.
10. Rathi P. B., Kale M., Soleymani J., Jouyban A. Solubility of Etoricoxib in Aqueous Solutions of Glycerin, Methanol, Polyethylene Glycols 200, 400, 600, and Propylene Glycol at 298.2 K. *Journal of chemical and engineering data*. 2018;63(2):321–330. DOI: 10.1021/acs.jced.7b00709.
11. Martínez F., Jouyban A., Acree W. E. (Jr.). Preferential solvation of etoricoxib in some aqueous binary cosolvent mixtures at 298.15 K. *Phisics and Chemistry of Liquids*. 2016;55(3):291–303. DOI: 10.1080/00319104.2016.1198481.
12. Krasnuk I. I. (junior), Ovsyannikova L. V., Stepanova O. I., Belyatskaya A. V., Krasnuk I. I., Kharitonov Yu. Ya., Grikh V. V., Kosheleva T. M., Korol L. A. Application of solid dispersions with non steroidal anti inflammatory drugs in pharmacy. *Drug development & registration*. 2016;2(15):40–44. (In Russ.)
13. Batalova T. L., Ostapyuk O. A., Saveleva K. R., Andreevicheva T. Yu., Persanova L. V., Polyakov S. V., Shestakov V. N. Development and validation the method of quantitative determination of etoricoxib in solid pharmaceutical forms by HPLC. *Drug development & registration*. 2018;1(22):90–95. (In Russ.)

26-29 сентября 2023

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО

X ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ

OPEN BIO

LIFESCIENCE EVENT

БИЗНЕС-ФОРУМ

ДЛЯ БИЗНЕСА,
НАУКИ, ВЛАСТИ
И ИНФРАСТРУКТУРЫ

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ВИРУСОЛОГИЯ,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ,
БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОФИЗИКА,
БИОИНФОРМАТИКА

ОТРАСЛЕВАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ
КОМПАНИЙ

OPENBIO.RU

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-104-112
УДК 615.322:574.24

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Сравнительный анализ качественного состава эфирного масла травы полыни горькой синантропной флоры Воронежской области

Н. А. Дьякова✉, **И. М. Коренская, А. И. Сливкин**

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

✉ **Контактное лицо:** Дьякова Нина Алексеевна. **E-mail:** Ninochka_V89@mail.ru

ORCID: Н. А. Дьякова – https://orcid.org/0000-0002-0766-3881; И. М. Коренская – https://orcid.org/ 0000-0001-5444-8108; А. И. Сливкин – https://orcid.org/0000-0001-6934-0837.

Статья поступила: 18.04.2022 **Статья принята в печать:** 31.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Образование и накопление биологически активных веществ в растениях – сложный процесс, связанный с рядом факторов окружающей среды, в том числе антропогенных. Изучение особенностей качественного состава эфирного масла травы полыни горькой различных с экологической точки зрения мест заготовки является актуальным.

Цель. Цель исследования – изучение качественного состава эфирного масла травы полыни горькой, заготовленной в различных с экологической точки зрения районах Воронежской области.

Материалы и методы. В Воронежском регионе было выбрано 4 точки заготовки сырья, разнообразных с точки зрения антропогенного воздействия. Выделение эфирного масла из сырья проводили по методике ФС «Полыни горькой трава». Определение компонентного состава полученных эфирных масел проводили на хромато-масс-спекрометрическом комплексе Agilent 7890B GC System (Agilent Technologies, США) с масс-селективным детектором Agilent 5977A MSD (Agilent Technologies, США). Анализ и обработка данных осуществлялись на основании баз данных NIST11 (от 19.05.2011), использовалось программное обеспечение MassHunter ver. B.06.00 и NIST MS Search ver. 2.0.

Результаты и обсуждение. В образце эфирного масла, полученного из заповедного сырья, на долю монотерпеновых соединений приходится более 82 %, а сесквитерпеновых соединений – 16,6 %, около 2 % составляют примеси органической природы. Интенсивный биосинтез монотерпенов отмечен в образце, собранном в районе сельскохозяйственных полей Верхнехавского района, его массовая доля – более 73 %. В образцах сырья, имеющих антропогенную нагрузку (ОАО «Минудобрения» и автомобильная трасса М4), доля монотерпеновых соединений значительно ниже (соответственно 63,7 и 49 %). Рост доли сесквитерпеновых соединений в последних образцах эфирного масла полыни, возможно, связан с избыточной кислотностью урбанизированных мест заготовки. Сесквитерпеновое соединение хамазулен, окрашивающий эфирное масло в голубой цвет, определен только в двух образцах полыни горькой травы, заготовленных вдоль сельскохозяйственных полей и в трассы М4, что объясняет наличие голубого оттенка в этих маслах.

Заключение. Хромато-масс-спектрометрический анализ эфирного масла исследуемых образцов травы полыни горькой позволил идентифицировать в них более 70 различных компонентов, при этом качественный состав эфирного масла сырья различных мест заготовки заметно отличался, что может указывать на значительное влияние места произрастания вида и антропогенных факторов на особенности вторичного метаболизма терпеновых соединений в растительном организме.

Ключевые слова: Воронежская область, полынь горькая, эфирные масла, агроценозы, урбоценозы

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

Вклад авторов. Н. А. Дьякова придумала и разработала эксперимент. Н. А. Дьякова, И. М. Коренская провели фармакогностическое исследование и расчеты. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

Для цитирования: Дьякова Н. А., Коренская И. М., Сливкин А. И. Сравнительный анализ качественного состава эфирного масла травы полыни горькой синантропной флоры Воронежской области. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):104–112. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-104-112

Comparative Analysis of Quality of Essential Oil of Wormwood Herb Synanthropic Flora of Voronezh Region

Nina A. Dyakova✉, **Irina M. Korenskaya, Alexey I. Slivkin**

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

✉ **Corresponding author:** Nina A. Dyakova. **E-mail:** Ninochka_V89@mail.ru

ORCID: Nina A. Dyakova – https://orcid.org/0000-0002-0766-3881; Irina M. Korenskaya – https://orcid.org/ 0000-0001-5444-8108; Alexey I. Slivkin – https://orcid.org/0000-0001-6934-0837.

Received: 18.04.2022 **Revised:** 31.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. The formation and accumulation of biologically active substances in plants is a complex process associated with a number of environmental factors, including anthropogenic ones. The study of the characteristics of the qualitative composition of essential oil of wormwood grass of bitter different from the ecological point of view of the places of harvesting is relevant.

© Дьякова Н. А., Коренская И. М., Сливкин А. И., 2023
© Dyakova N. A., Korenskaya I. M., Slivkin A. I., 2023

Aim. The aim of this study study of the qualitative composition of essential oil of bitter wormwood grass, harvested in areas of the Voronezh region that are different from an ecological point of view.
Materials and methods. In the Voronezh region, 4 points of raw materials procurement were selected, diverse in terms of anthropogenic impact. Isolation of essential oil from the raw materials was carried out according to the method of PS "Wormwood of bitter grass". Component composition of the obtained essential oils was determined using Agilent 7890B GC System (Agilent Technologies, USA) with Agilent 5977A MSD mass selective detector (Agilent Technologies, USA). Data analysis and processing was carried out on the basis of NIST11 databases (from 19.05.2011), MassHunter ver. B.06.00 and NIST MS Search ver. 2.0 software were used.
Results and discussion. In a sample of essential oil obtained from reserved raw materials, monoterpene compounds account for more than 82 %, and sesquiterpene compounds – 16.6 %, about 2 % are organic impurities. Intensive biosynthesis of monoterpenes was noted in a sample collected in the area of agricultural fields of the Verkhnekhavsky district, its mass fraction is more than 73 %. In samples of raw materials with anthropogenic load (OJSC "Minudobreniya" and Highway M4), the share of monoterpene compounds is significantly lower (63.7 and 49 %, respectively). The increase in the proportion of sesquiterpene compounds in the last samples of wormwood essential oil may be due to the excessive acidity of the urbanized places of the workpiece. The sesquiterpene compound hamazulene, which stains essential oil blue, is identified in only two samples of gorse grass wormwood harvested along agricultural fields and in M4 tracks, which explains the presence of a blue hue in these oils.
Conclusion. The chromato-mass spectrometric analysis of the essential oil of the studied samples of bitter wormwood grass made it possible to identify more than 70 different components in them, while the qualitative composition of the essential oil of the raw materials of different places of the workpiece was significantly different, which may indicate a significant influence of the place of growth of the species and anthropogenic factors on the features of the secondary metabolism of terpene compounds in the plant organism.

Keywords: Voronezh region, bitter wormwood, essential oil, agrocenoses, urbocenoses

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

Contribution of the authors. Nina A. Dyakova invented and developed the experiment. Nina A. Dyakova, Irina M. Korenskaya conducted pharmacognostic research and calculations. All authors participated in the discussion of the results and writing of the article.

For citation: Dyakova N. A., Korenskaya I. M., Slivkin A. I. Comparative analysis of quality of essential oil of wormwood herb synanthropic flora of Voronezh region. *Drug development & registration*. 2023;12(2):104–112. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-104-112

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к препаратам на основе растительного сырья возрастает с каждым годом. Это объясняется высокой терапевтической эффективностью таких лекарственных средств, а также, что наиболее важно, безвредностью и отсутствием побочных эффектов. При этом значительная доля заготовок лекарственных растений осуществляется в Центральной полосе России, отличающейся высокой плотностью населения, активной хозяйственной деятельностью, развитой сетью транспортных магистралей, большим количеством промышленных производств, интенсивными технологиями ведения сельского хозяйства [1, 2]. В данных условиях нарастает угроза заготовки растительного сырья в экологически неблагоприятных районах, а потому актуальным становится выявление влияния антропогенного загрязнения на химический состав растений [3–5].

Полынь горькая (*Artemisia absinthium* L.) – многолетнее, синантропное растение, рефлекторно улучшающее секрецию желудочного сока и желчи, повышающее аппетит и оказывающее противовоспалительное действие [6–9]. Основу богатого химического состава травы полыни горькой составляют эфирные масла (до 0,8 %) и флавоноиды (до 1,8 %). Эфирное масло полыни горькой включает до 90 компонентов, основными из которых являются хамазулен и цинеол, а также β-мирцен, нерил-2-метилбутаноат, нерил-3-метилбутаноат, линалоол, β-фарнезен, нафталенон, борнилацетат, геранил гексаноат, β-кариофиллен, β-бурбонен и др. Флавоноиды представлены преимущественно производными апигенина, артеметина, изорамнетина, кверцетина, кемпферола, патулетина, спинацетина. Также в сырье содержатся сесквитерпеновые лактоны (до 0,4 %), дубильные вещества (до 10,5 %), кумарины, сапонины, лигнаны, органические кислоты, фенолкарбоновые кислоты. Трава полыни горькой эффективно накапливает витамины (B_1, B_5, B_6, B_9, C), макро- (калий, кальций, фосфор) и микроэлементы (бор, бром, железо, марганец, медь, цинк) [10–17].

Образование и накопление биологически активных веществ в растениях – сложный процесс, связанный с рядом факторов окружающей среды, в том числе антропогенных. Часто поллютанты выступают в роли ингибиторов или индукторов биосинтетических процессов. Известно, что в стрессовых для растения условиях обитания активизируется синтез веществ антиоксидантной активности – низкомолекулярных пептидов, органических кислот, флавоноидных соединений [18–22]. Так, ранее проведенные ис-

следования по изучению влияния различных последствий хозяйственной деятельности человека, в частности на накопление флавоноидов в траве полыни горькой, заготовленной в урбоценозах и агроценозах Центрального Черноземья, показали сильную вариабельность результатов: при умеренной антропогеннной нагрузке отмечена индукция синтеза флавоноловых соединений, при повышении – подавление биосинтеза полифенолов, что можно объяснить угнетением антиоксидантной системы растения [2, 3, 5]. При этом данные о влиянии стрессовой антропогенной нагрузки на особенности компонентного состава эфирного масла практически отсутствуют.

Цель работы – изучение особенностей компонентного состава эфирного масла травы полыни горькой, заготовленной в агро- и урбоценозах Воронежской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор территорий для заготовки травы полыни горькой объясняется особенностями антропогенного воздействия. Для оценки эфирного масла полыни горькой в качестве зоны сравнения использовалась заповедная зона (контроль): Воронежский биосферный заповедник. Опытные зоны: зона с активной сельскохозяйственной деятельностью в Верхнехавском районе; химическое предприятие ОАО «Минудобрения»; территория вдоль крупной дороги – трасса М4 «Дон».

Заготовку травы полыни горькой проводили в соответствии с фармакопейными требованиями во время цветения растения, аккуратно срезая ножницами верхушки стеблей длиной 15–20 см. Использовали естественную сушку, под навесом, раскладывая толстым слоем по 30–40 см, периодически переворачивая. Выделение и определение содержания эфирного масла проводили в соответствии с ФС.2.5.0033.15 «Полыни горькой трава» и ОФС.1.5.3.0010.15 «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». На анализ брали по 20,0 г сырья, осуществляя перегонку в течение 3 ч [23]. Взвешивание проводили на аналитических весах AND GH-202 (AND, Япония). Каждое определение проводили трижды, полученные результаты статистически обрабатывали при доверительной вероятности 0,95.

Определение компонентного состава полученных эфирных масел проводили на хромато-масс-спектрометрическом комплексе Agilent 7890B GC System (Agilent Technologies, США) с масс-селективным детектором Agilent 5977A MSD (Agilent Technologies, США). Температура узла ввода пробы – 310 °C, аналитического интерфейса – 290 °C. Разделение проводили на капиллярной колонке HP-5ms UI с неподвижной фазой (5 %-фенил)-метилполисилоксан (30 м × 0.250 мм × 0.25 μм). Скорость потока газа носителя – 1 мл/мин при постоянном потоке. Объем вводимой пробы – 1 мкл, деление потока 20:1; температурный режим: 40 °C – изотерма 5 мин, нагрев 5 °C/мин, до 65 °C, изотерма 5 мин, затем нагрев со скоростью 5 °C/мин до 180 °C, изотерма 1 мин, нагрев со скоростью 10 °C/мин до 270 °C, изотерма 1 мин, нагрев со скоростью 10 °C/мин до 320 °C, изотерма 3 минуты. Применялась ионизация «электронный удар» с энергией излучения 70 эВ. Регистрацию сигнала проводили по полному ионному току (TIC) в диапазоне масс 20–550 m/z. Анализ и обработка данных осуществлялись на основании баз данных NIST11 (от 19.05.2011), использовалось программное обеспечение MassHunter ver. B.06.00 и NIST MS Search ver. 2.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования было проведено количественное определение эфирного масла в исследуемом сырье (таблица 1). Все проанализированное растительное сырье соответствует требованиям фармакопейной статьи по определяемому показателю [23]. Содержание эфирного масла в исследуемых

Таблица 1. Содержание эфирного масла в траве полыни горькой

Table 1. Content of essential oil in bitter wormwood herb

№ п/п No	Территория сбора Collection area	Содержание эфирного масла, % Amount of essential oil, %	Окраска эфирного масла Essential oil coloration
1	Воронежский государственный заповедник Voronezh State Reserve	1,85 ± 0,09	Оранжевая Orange
2	Сельскохозяйственные поля Верхнехавского р-на Agricultural fields of the Verkhnekhavsky district	1,61 ± 0,06	Темно-коричневая с синеватым оттенком Dark brown with a bluish tinge
3	ОАО «Минудобрения» OJSC "Minudobreniya"	1,40 ± 0,09	Светло-желтая Light yellow
4	Автомобильная трасса М4 Highway M4	0,68 ± 0,05	Коричнево-синяя Brown-blue
Числовой показатель по ФС [23] Numerical indicator for pharmacopoeia article		Не менее 0,2 Not less than 0.2	–

образцах травы полыни горькой варьировало от 0,68 до 1,85 %.

При количественной оценке содержания эфирного масла нами была отмечена разная окраска выделяемого масла, изменяющаяся от светло-желтой и оранжевой до темно-коричневой и коричнево-синей, что указывало на актуальность изучения компонентного состава эфирного масла данных объектов.

Следующим этапом исследований было проведение хромато-масс-спектрометрического анализа эфирных масел травы полыни горькой (таблица 2) [24, 25].

Как следует из данных таблицы 2 в компонентном составе исследованных образцов эфирных масел полыни горькой наблюдаются различия как в качественном, так и в количественном отношении, что указывает на возможное влияние места произрастания и антропогенных факторов на особенности вторичного метаболизма терпеновых соединений в растительном организме. Всего было идентифицировано 73 компонента. Набольшее количество соединений – 49, определено в образце травы полыни горькой, заготовленной в агроценозе. В остальных объектах зафиксировано от 41 до 45 соединений.

Качественный состав эфирных масел травы полыни горькой представлен монотерпеновыми (C_{10}) и сесквитерпеновыми (C_{15}) соединениями. В образце эфирного масла, полученного из заповедного сырья, на долю монотерпеновых соединений приходится более 82 %, а сесквитерпеновых соединений – 16,6 %, около 2 % составляют примеси органической природы. Интенсивный биосинтез монотерпенов отмечен в образце, собранном в районе сельскохозяйственных полей Верхнехавского района, его массовая доля – более 73 %. В образцах сырья, имеющих антропогенную нагрузку (ОАО «Минудобрения» и автомобильная трасса М4), доля монотерпеновых соединений значительно ниже (соответственно 63,7 и 49 %). Рост доли сесквитерпеновых соединений в последних образцах эфирного масла полыни, возможно, связан с избыточной кислотностью урбанизированных мест заготовки. Согласно литературным данным, присутствие ацетатов в почве увеличивает накопление в эфирных маслах сесквитерпеновых соединений, что обусловлено особенностями ацетатно-мевалонатного пути их биосинтеза [26].

Среди компонентов исследованных объектов можно выделить компоненты, присутствующие во всех эфирных маслах. К ним относятся: β-фелландрен (0.94–9,37 %), β-мирцен (1,76–15,79 %), *n*-цимен (0,33–3,46 %), эукалиптол (1,09–14,44 %), γ-терпинен (0,24–2,16 %), β-туйон (5,16–24,95 %), α-туйон (6,62–11,04 %), миртенилацетат (0,60–42,81 %), α-копаен (0,16–0,95 %), β-боурбонен (0,27–0,91 %), кариофиллен (0,54–1,46 %), α-мууролен (0,17–0,42 %), 2-этил-4-метил-1,3-пентадиенилбензен (0,23–10,72 %), кедрен-13-ол (0,09–0,79 %), геранил-*n*-цимен (0,35–1,65 %), терпинен-4-ол (1,67–5,13 %), нерил-2-метилбутаноат (0,67–17,83 %). Доминирующим соединением во всех эфирных маслах полыни горькой является туйон, бициклический монотерпен, который обычно находится в двух стереоизомерных формах: α- и β-туйоны (синоним: туйон и изотуйон). Максимальное содержание изомеров туйона определено в масле полыни заповедной зоны заготовки (около 36 %), меньше всего – в эфирном масле полыни, заготовленной вдоль сельскохозяйственных полей (около 15 %). Отмечено также, что больше всего β-мирцена (15,79 %) обнаружено в масле полыни из заповедника, эукалиптола (14,44 %) – в масле полыни, заготовленной около ОАО «Минудобрения», миртенилацетата (42,81 %) в эфирном масле, полученном из сырья травы, выросшей около сельскохозяйственных полей. Миртенилацетат – монотерпеновый эфир с фруктово-травянистым запахом, обладающий спазмолитическим действием, в большом количестве встречается в эфирных маслах мирта обыкновенного [27]. Во второй группе – компоненты идентифицированы только в отдельных образцах. Например, в масле полыни из заповедника не обнаружен фенхен, линалоол, сабинила ацетат, борнеол, α-терпинеол, лавандуол и др. Примечательно, что сесквитерпеновое соединение хамазулен, окрашивающий эфирное масло в голубой цвет, определен только в двух образцах полыни горькой травы, заготовленных вдоль сельскохозяйственных полей и трассы М4, что объясняет наличие голубого оттенка в этих маслах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хромато-масс-спектрометрический анализ эфирных масел исследуемых образцов травы полыни горькой позволил идентифицировать в них более 70 различных компонентов, при этом качественный состав эфирного масла сырья различных мест заготовки заметно отличался, что может указывать на значительное влияние места произрастания вида и антропогенных факторов на особенности вторичного метаболизма терпеновых соединений в растительном организме. Отмечен рост доли сесквитерпеновых соединений в образцах ЭМ полыни горькой урбанизированных территорий, что, возможно, связано с избыточной кислотностью почв, повышающей биосинтез сесквитерпеновых соединений по ацетатно-мевалонатному пути.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дьякова Н. А. Особенности накопления биологически активных веществ в корнях лопуха обыкновенного синантропной флоры Воронежской области. *Традиционная медицина.* 2021;2(65):47–52. DOI: 10.54296/18186173_2021_2_47.
2. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Шишорина Л. А., Бобина Е. А., Великанова Л. А. Изучение особенностей накопления флавоноидов травой полыни горькой, произрастающей в различных урбо- и агробиоценозах Воронежской области. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2020;23(7):15–21. DOI: 10.29296/25877313-2020-07-03.

Таблица 2. **Компонентный состав эфирных масел травы полыни горькой**

Table 2. **Component composition of essential oils of bitter wormwood herb**

№	Время удержи-вания, мин Retention time, min	Название компонента Component name	Место заготовки сырья Place of raw material procurement			
			Воронежский государственный заповедник Voronezh State Reserve	Сельскохозяйственные поля Верхнехавского р-на Agricultural fields of the Verkhnekhavsky district	ОАО «Минудобрения» OJSC "Minudobreniya"	Автомобильная трасса М4 Highway M4
			Массовая доля в образце (от общей суммы), % Mass fraction in sample (of total amount), %			
1	3,847	3-гексанон 3-hexanone	–	–	–	0,27
2	7,688	1-циклопентилэтил-2-фенилацетат 1-cyclopentylethyl-2-phenylacetate	–	0,37	–	–
3	7,991	3,5-диметилоктан 3,5-dimethyloctane	0,14	–	0,16	–
4	8,026	12-метил-1,5,9,11-тридекатетраен 12-methyl-1,5,9,11-tridecatetraene	0,4	–	–	0,2
5	8,082	15-хлоро-13-оксабициклопентадекан 15-Chloro-13-oxabicyclopentadecane	–	0,29	–	0,29
6	8,195	4,5-диэтилоктан 4,5-diethyloctane	0,62	0,25	0,44	–
7	8,347	1-метилэтилбензен 1-methylethylbenzene	–	0,59	–	–
8	8,429	4-карен 4-karene	–	–	1,02	0,39
9	8,494	α-пинен α-pinene	–	–	–	0,2
10	8,564	α-фелландрен α-fellandrene	3,03	1,13	1,73	–
11	8,629	1-хлоротетрадекан 1-Chlorotetradecane	–	0,44	–	–
12	8,789	2,6-диметилоктан 2,6-dimethyloctane	0,19	0,12	0,23	–
13	9,049	α-фенхен α-fenkhene	–	0,15	0,52	0,17
14	10,085	β-фелландрен β-fellandrene	9,37	1,79	0,96	0,94
15	10,935	β-мирцен β-mirtsene	15,79	5,14	8,16	1,76
16	11,950	1-*п*-ментен 1-*p*-mentene	1,24	0,22	0,63	–
17	12,340	*п*-цимен *p*-cymene	2,17	1,23	3,46	0,33
18	12,522	эукалиптол eukaliptole	1,77	1,13	14,44	1,09
19	14,312	γ-терпинен γ-terpinene	2,16	0,45	1,39	0,24
20	15,145	1,2-оксолиналоол 1,2-oxolinaloole	0,87	1,46	–	2,52
21	16,155	линалоола оксид linalool oxide	–	1,2	0,71	–
22	16,198	α-терпинеол α-terpineole	0,87	–	0,65	–
23	16,948	β-туйон β-tuyone	24,95	5,16	13,68	20,54

Продолжение таблицы 2

№	Время удержи-вания, мин Retention time, min	Название компонента Component name	Место заготовки сырья Place of raw material procurement			
			Воронежский государственный заповедник Voronezh State Reserve	Сельскохозяйственные поля Верхнехавского р-на Agricultural fields of the Verkhnekhavsky district	ОАО «Минудобрения» OJSC "Minudobreniya"	Автомобильная трасса М4 Highway M4
			Массовая доля в образце (от общей суммы), % Mass fraction in sample (of total amount), %			
24	17,546	α-туйон α-tuyone	11,04	9,76	6,62	7,62
25	17,889	геранилвиниловый эфир geranylvinyl ethere	–	0,2		0,21
26	18,435	2-циклогексен-1-ол 2-cyclohexen-1-ole	0,18	–	0,15	–
27	18,782	сабинила ацетат sabinyl acetate	–	0,94	0,62	0,34
28	18,830	3-циклогексен-1-карбинол 3-cyclohexene-1-carbinole	0,27	–	–	
29	19,532	1,2-эпоксициклододекан 1,2-epoxicyclododecane	0,4	0,34	–	0,22
30	19,809	тетрагидроактинидиолид tetrahydroactinidiolide	0,48	–	–	–
31	19,840	эндо-борнеол endo-borneole	–	0,09	1,41	–
32	20,369	терпинен-4-ол terpinen-4-ole	5,13	1,67	3,04	2,14
33	20,993	α-терпинеол α-terpineole	–	0,13	0,41	0,31
34	21,284	9,10-диметилтрициклодекан-9,10-диол 9,10-dimethyltricyclodecan-9,10-diole	–	–	–	0,19
35	21,929	3-карен 3-karene	0,83	–	0,64	–
36	23,577	изовербинила ацетат isoverbinyl acetate	–	–	0,57	–
37	24,626	миртенилацетат myrtenylcetate	0,6	42,81	2,72	9,63
38	27,019	α-копаен kopaene	0,27	0,16	0,95	0,29
39	27,253	β-боурбонен β-bourbonene	0,27	0,33	0,91	0,69
40	27,500	β-элемен β-elemene	–	0,11	0,26	0,43
41	27,773	α-акоренол α-akorenole	–	–	0,14	–
42	27,912	4-гидрокси-β-ионон 4-gidroksi-β-ionone	–	0,08	–	0,14
43	28,181	Кариофиллен karyophyllene	1,46	0,82	0,54	0,93
44	28,450	лавандуол lavanduole	–	0,34	0,72	1,17
45	29,091	1,5,9,9-тетраметил-1,4,7-циклоундекатриен 1,5,9,9-tetramethyl-1,4,7-cycloundecatriene	0,14	0,09	–	0,12
46	29,343	ледена оксид ledene oxide	–	–	–	0,21

Продолжение таблицы 2

№	Время удержи-вания, мин Retention time, min	Название компонента Component name	Место заготовки сырья Place of raw material procurement			
			Воронежский государственный заповедник Voronezh State Reserve	Сельскохозяйственные поля Верхнехавского р-на Agricultural fields of the Verkhnekhavsky district	ОАО «Минудобрения» OJSC "Minudobreniya"	Автомобильная трасса М4 Highway M4
			Массовая доля в образце (от общей суммы), % Mass fraction in sample (of total amount), %			
47	29,824	β-копаен β-kopayene	0,32	–	–	–
48	29,950	леден ledene	0,75	0,23	1,16	–
49	30,162	фарнезола ацетат farnesol acetate	–	–	1,6	3,3
50	30,180	линалил изобутират linalyl isobutyrate	–	0,65	–	–
51	30,210	неролидила ацетат nerolidyl acetate	0,28	–	–	–
52	30,669	2-этил-4-метил-1,3-пентадиенилбензен 2-ethyl-4-methyl-1,3-pentadienylbenzene	2,05	5,07	10,72	0,23
53	30,956	α-мууролен α-muurolene	0,2	0,17	0,42	0,31
54	31,216	5,5-диметил-4-(3-метил-1,3-бутадиенил)-1-оксаспирооктан 5,5-dimethyl-4-(3-methyl-1,3-butadienyl)-1-oxaspirooctane	0,29	0,25	–	0,19
55	31,393	2-(*п*-хлорофенил)-изопропилидене-циклопропан 2-(*p*-chlorophenyl)-isopropylidene-cyclopropane	–	–	0,24	–
56	31,653	аромадендрена оксид aromadendrene oxide	–	–	0,18	–
57	32,178	спатуленол spatulenole	0,32	0,37	1,44	–
58	32,243	цитронеллила сенециоат citronellyl senecioate	–	–	–	16,01
59	32,273	кариофиллена оксид caryophyllene oxide	3,53	5,66	–	–
60	32,408	нерил-2-метилбутаноат neryl-2-methylbutanoate	0,67	2,01	13,01	17,83
61	32,872	метил-фарнезол methyl-farnesole	–	0,49	0,59	
62	33,015	α-изометил ионон α-izometil ionone	–	0,25	0,3	0,44
63	34,025	γ-селинен γ-selinene	0,58	2,27	–	0,47
64	35,261	андроста-1,4,6-триен-3,17-дион androsta-1,4,6-triene-3.17-dione	0,14	–	0,24	–
65	35,599	хамазулен chamazulene	–	0,72	–	1,08
66	36,180	2,6,10-триметилтетрадекан 2,6,10-trimethyltetradecane	–	–	0,13	–
67	38,057	гексагидрофарнезил ацетон hexahydrofarnesyl acetone	–	–	–	0,55

Окончание таблицы 2

№	Время удержи-вания, мин Retention time, min	Название компонента Component name	Место заготовки сырья Place of raw material procurement			
			Воронежский государственный заповедник Voronezh State Reserve	Сельскохозяйственные поля Верхнехавского р-на Agricultural fields of the Verkhnekhavsky district	ОАО «Минудобрения» OJSC "Minudobreniya"	Автомобильная трасса М4 Highway M4
			Массовая доля в образце (от общей суммы), % Mass fraction in sample (of total amount), %			
68	38,616	геранил-α-терпен geranil-α-terpene	–	–	–	0,17
69	39,041	кедрен-13-ол cedar-13-ole	0,17	0,09	0,34	0,79
70	39,561	7,9-дитертбутил-1-оксаспиро(4,5)дека-6,9-диен-2,8-дион 7,9-Ditertbutyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	0,74	0,15	0,7	0,25
71	40,316	геранил-*n*-цимен geranyl-*p*-cymene	1,65	0,37	0,35	0,9
72	41,165	нуциферол nuciferole	2,44	0,72	–	1,35
73	41,269	α-куркумен α-kurkumene	–	1,11	–	2,03
Всего идентифицировано Total identified			98,77	98,97	99,30	99,48

3. Бубенчикова В. Н., Дьякова Н. А., Гапонов С. П., Сливкин А. И. Оценка радионуклидного загрязнения лекарственного растительного сырья в Центральном Черноземье на примере травы полыни горькой. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2019;3(25):36–44.
4. Королёв А. С., Гладышев А. А., Юткина И. С. Особенности накопления биоэлементов в надземной части *Artemisia absinthium* L. на шламовом поле криолитового завода. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2014;5(49):159–161.
5. Дьякова Н. А. Накопление тяжелых металлов и мышьяка лекарственным растительным сырьем полыни горькой. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2020;4:445–453. DOI: 10.18500/1816-9775-2020-20-4-445-453.
6. Северин А. П., Сипливая Л. Е., Яцюк В. Я., Чулков А. Н., Новиков О. О., Жилякова Е. Т., Кочкаров В. И. О комплексном использовании сырья полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.) для получения фитопрепаратов. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011;4–2(99):134–137.
7. Денисов И. В., Букатин М. В. Влияние эфирного масла полыни горькой на эмоциональный статус крыс в условиях биологического эксперимента. *Успехи современного естествознания*. 2011;8:33.
8. Кароматов И. Д., Каххорова С. И. Лекарственное растение полынь горькая-химический состав, лечебные свойства. *Биология и интегративная медицина*. 2018;9(26):84–101.
9. Куркин В. А. Фармакогнозия. Самара: Офорт; 2004. 1179 с.
10. Бузук Г. Н., Эльяшевич Е. Г. Фармакогностическая характеристика полыни горькой *Artemisia absinthium* L. Обзор литературы. *Вестник фармации*. 2009;4(46):87–97.
11. Торыбаев Ж. С. Сравнительный анализ методик выделения биологически активных веществ на примере полыни горькой и туи западной. *Евразийское Научное Объединение*. 2020;7–3(65):146–148.
12. Платонов В. В., Сухих Г. Т., Волочаева М. В., Хадарцев А. А., Дунаева И. В. Химический состав органического вещества полыни горькой (*Artemisia absinthium* L., семейство сложноцветных). *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2019;5:149–162.
13. 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. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(5):693–699. DOI: 10.1590/007402760140129.
14. Mihajilov-Krstev T., Jovanovic B., Jovic J., Ilic B., Miladinovic D., Matejic J., Rajkovic J., Dortfevic L., Cvetkovic V., Zlatkovic B. Antimicrobial, antioxidative, and insect repellent effects of Artemisia absinthium essential oil. *Planta Medica*. 2014;80(18):1698–1705. DOI: 10.1055/s-0034-1383182.
15. Monzote L., Pinon A., Sculli R., Setzer W. N. Chemistry and leishmanicidal activity of the essential oil from Artemisia absinthium from Cuba. *Natural Product Communications*. 2014;9(12):1799–1804. DOI: 10.1177/1934578x1400901236
16. Алякин А. А., Ефремов А. А., Ангаскиева А. С., Гребенникова В. В. Химический состав эфирных масел *Artemisia absinthium* L. и *Artemisia vulgaris* L. произрастающих на территории Красноярского края. *Химия растительного сырья*. 2011;3:123–127.

17. Ханина М. А., Серых Е. А., Покровский Л. М., Ткачева А. В. Новые данные по химическому составу эфирного масла *Artemisia absinthium* L. *Химия растительного сырья*. 2000;3:33–40.
18. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Papanga G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;20:933–956. DOI: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
19. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5:218–223. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
20. Loreto F., Schnitzler J. P. Abiotic stresses and induced biogenic volatile organic compounds. *Trends in Plant Science*. 2010;15(3):154–166. DOI:10.1016/j.tplants.2009.12.006.
21. Ferdinando M. D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. In: *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. NY: Springer New York. 2012. P. 159–179. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1_9.
22. Баяндина И. И., Загуская Ю. В. Взаимосвязь вторичного метаболизма и химических элементов в лекарственных растениях. *Сибирский медицинский журнал*. 2014;8:107–111.
23. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XIV. Том 4. М.: ФЭМБ; 2018. 1883 с.
24. Ткачев А. В. Исследование летучих веществ растений. Новосибирск: Офсет; 2008. 969 с.
25. Adams R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publ. Corp.; 2007. 804 p.
26. Артюшина И. Ю., Верховцева Н. В. Изменение компонентного состава смеси душистых веществ, выделяемых розой, в зависимости от состава питательного раствора. *Проблемы агрохимии и экологии*. 2013;2:41–46.
27. Хлыпенко Л. А., Логвиненко Л. А., Шевчук О. М., Феськов С. А., Марко Н. В. Малораспространенные ароматические растения как источник эфирных масел широкого спектра действия. *Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада*. 2015;141:110–117.

REFERENCES

1. D'yakova N. A. Features of accumulation of biologically active substances in roots of common burdock synanthropic flora of Voronezh region. *Traditional Medicine.* 2021;2(65):47–52. (In Russ.) DOI: 10.54296/18186173_2021_2_47.
2. D'yakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P., SHishorina L. A., Bobina E. A., Velikanova L. A. Study of features of accumulation of flavonoids by grass of bitter pollen collected in various urban and agribiocenoses of the Voronezh Region. *Problems of Biological Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2020;23(7):15–21. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2020-07-03.
3. Bubenschikova W. N., D'yakova N. A., Gaponov S. P., Slivkin A. I. Assessment of radio nuclide pollution of medicinal vegetable raw materials in the Central Black-soil region on the example of the grass of the sage-brush bitter. *Quality assurance of medicines*. 2019;3(25):36–44. (In Russ.)
4. Korolyov A. S., Gladyshev A. A., Yutkina I. S. Features of accumulation of bioelements in the aerial part of *Artemisia absinthium* L. in the sludge field of a cryolite plant. *News of the Orenburg State Agrarian University*. 2014;5(49):159–161. (In Russ.)
5. D'yakova N. A. Accumulation of Heavy Metals and Arsenic by Medicinal Plant Raw Material of Bitter Hollow. *News of Saratov University. New series. Series: Chemistry. Biology. Ecology.* 2020;4:445–453. (In Russ.) DOI: 10.18500/1816-9775-2020-20-4-445-453.
6. Severin A. P., Siplivaya L. E., Yacyuk V. Ya., CHulkov A. N., Novikov O. O., Zhilyakova E. T., Kochkarov V. I. On the complex use of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) to obtain phytopreparations. *Scientific statements of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2011;4-2(99):134–137. (In Russ.)
7. Denisov I. V., Bukatin M. V. Effect of essential oil of wormwood on the emotional status of rats in a biological experiment. *The successes of modern natural science*. 2011;8:33. (In Russ.)
8. Karomatov I. D., Kahkhorova S. I. Herb the wormwood bitter – the chemical composition, medicinal properties. *Biology and integrative medicine*. 2018;9(26):84–101. (In Russ.)
9. Kurkin V. A. Pharmacognosy. Samara: Ofort; 2004. 1179 p. (In Russ.)
10. Buzuk G. N., El'yashevich E. G. Pharmacognostic characteristics of wormwood *Artemisia absinthium* L. Literature review. *Herald of pharmacy*. 2009;4(46):87–97. (In Russ.)
11. Torybaev Zh. S. Comparative analysis of methods for isolating biologically active substances on the example of wormwood and western arborvitae. *Eurasian Scientific Association*. 2020;7–3(65):146–148. (In Russ.)
12. Platonov V. V., Sukhikh G. T., Volochaeva M. V., Khadarsev A. A., Dunaeva I. V. Chemical composition of organic matter of wormwood (*Artemisia absinthium* L., family *Asteraceae*). *Bulletin of new medical technologies. Electronic edition.* 2019;5:149–162. (In Russ.)
13. 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. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(5):693–699. DOI: 10.1590/007402760140129.
14. Mihajilov-Krstev T., Jovanovic B., Jovic J., Ilic B., Miladinovic D., Matejic J., Rajkovic J., Dortfevic L., Cvetkovic V., Zlatkovic B. Antimicrobial, antioxidative, and insect repellent effects of Artemisia absinthium essential oil. *Planta Medica*. 2014;80(18):1698–1705. DOI: 10.1055/s-0034-1383182.
15. Monzote L., Pinon A., Sculli R., Setzer W. N. Chemistry and leishmanicidal activity of the essential oil from Artemisia absinthium from Cuba. *Natural Product Communications*. 2014;9(12):1799–1804. DOI: 10.1177/1934578x1400901236
16. Alyakin A. A., Efremov A. A., Angaskieva A. S., Grebennikova V. V. The chemical composition of the essential oils of *Artemisia absinthium* L. and *Artemisia vulgaris* L. growing on the territory of the Krasnoyarsk Territory. *Chemistry of plant raw materials.* 2011;3:123–127. (In Russ.)
17. Hanina M. A., Seryh E. A., Pokrovskij L. M., Tkacheva A. V. New data on the chemical composition of *Artemisia absinthium* L. essential oil. *Chemistry of plant raw materials*. 2000;3:33–40. (In Russ.)
18. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Papanga G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;20:933–956. DOI: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
19. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002;5:218–223. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
20. Loreto F., Schnitzler J. P. Abiotic stresses and induced biogenic volatile organic compounds. *Trends in Plant Science*. 2010;15(3):154–166. DOI:10.1016/j.tplants.2009.12.006.
21. Ferdinando M. D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. In: *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*. NY: Springer New York. 2012. P. 159–179. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1_9.
22. Bayandina I. I., Zaguskaya Y. V. The relationship of secondary metabolism and chemical elements in medicinal plants. *Siberian Medical Journal*. 2014;8:107–111. (In Russ.)
23. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Edition XIV. Volume 4. Moscow: FEMB; 2018.1883 p. (In Russ.)
24. Tkachev A. V. Plant Volatile Substances Study. Novosibirsk: Ofset; 2008. 969 p. (In Russ.)
25. Adams R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publ. Corp.; 2007. 804 p.
26. Artyushina I. Yu., Verhovceva N. V. Changes in the component composition of a mixture of aromatic substances emitted by a rose, depending on the composition of the nutrient solution. *Problemy agrohimii i ekologii.* 2013;2:41–46. (In Russ.)
27. Hlypenko L. A., Logvinenko L. A., SHevchuk O. M., Fes'kov S. A., Marko N. V. Rare aromatic plants as a source of broad-spectrum essential oils. *Sbornik nauchnyh trudov Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada*. 2015;141:110–117. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-113-123
УДК 615.1

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Содержание минорных элементов в грудном сборе № 4

И. В. Гравель, Д. В. Лёвушкин✉

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

✉ **Контактное лицо:** Лёвушкин Дмитрий Владимирович. **E-mail:** istomam@gmail.com

ORCID: И. В. Гравель – https://orcid.org/0000-0002-3735-2291; Д. В. Лёвушкин – https://orcid.org/0000-0002-7782-1574.

Статья поступила: 04.04.2023 **Статья принята в печать:** 17.05.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Микроэлементы являются неотъемлемой частью организма человека, однако около 80 % населения отмечает дисбаланс их содержания. В лекарственных растениях минеральные вещества находятся в легко доступной и усвояемой форме вместе с биологически активными веществами. Весьма популярны для профилактики и в составе комплексной терапии различных заболеваний лекарственные растительные сборы. Однако сведения о содержании микроэлементов в многокомпонентных лекарственных растительных препаратах весьма ограничены. Поэтому необходимы исследования минерального состава, которые позволят рассматривать растительные сборы в качестве дополнительного источника микроэлементов.

Цель. Изучить содержание микроэлементов (B, Si, Al, Ba, Sr, Ti) в грудном сборе № 4, его компонентах и водных извлечениях из них.

Материалы и методы. Объектами исследования были грудной сбор № 4, его отдельные компоненты и водные извлечения из них. Настои из образцов получали согласно инструкции по применению на упаковке лекарственного растительного препарата. Подготовку проб к анализу осуществляли смесью концентрированной азотной кислоты и воды деионизированной в микроволновой системе Milestone Ethos Up (Milestone, Италия). Анализ проводили методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе ИСП-АЭС 720-ES (Agilent Technologies, США).

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что концентрации Si, Al, B, Sr, Ba, Ti в отдельных компонентах сбора варьировали в диапазоне 2,9–1240 мг/кг, переход микроэлементов в водные извлечения составил 0,4–34,2 %. Содержание этих элементов в грудном сборе № 4 найдено 13,3–920,7 мг/кг, а степень извлечения в настой составила 3–40 %. Сравнительный анализ показал, что извлечение B, Al, Ba из сбора в настой на 14–58 % выше, чем из отдельных компонентов, входящих в его состав. Установлено, что с настоем из грудного сбора № 4 в организм человека поступает 50 % бора и 264 % кремния от рекомендуемого адекватного уровня потребления в РФ.

Заключение. Проведенное исследование показало, что грудной сбор № 4 можно рассматривать как дополнительный источник B и Si в организм человека. Концентрации Al, Sr, Ba, Ti находились в пределах средних значений диапазона содержания этих элементов в растениях.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, растительные препараты, микроэлементы, атомно-эмиссионная спектрометрия, сборы лекарственные

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

Вклад авторов. И. В. Гравель принадлежит основная идея и дизайн исследования, обобщение и критический анализ полученных результатов. Д. В. Лёвушкин получил данные и осуществил их анализ и интерпретацию. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Гравель И. В., Лёвушкин Д. В. Содержание минорных элементов в грудном сборе № 4. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):113–123. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-113-123

The Content of Minor Elements in the Breast Collection No. 4

Irina V. Gravel, Dmitry V. Levushkin✉

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:** Dmitry V. Levushkin. **E-mail:** istomam@gmail.com

ORCID: Irina V. Gravel – https://orcid.org/0000-0002-3735-2291; Dmitry V. Levushkin – https://orcid.org/0000-0002-7782-1574.

Received: 04.04.2023 **Revised:** 17.05.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Trace elements are an essential part of the human body, but about 80 % of the human population notes an imbalance in their content. Medicinal plants contain minerals in an accessible and digestible form together with biologically active substances. Medicinal herbal preparations are very popular for the prevention and as part of the complex therapy of various diseases. However, information about the content of trace elements in multicomponent medicinal herbal preparations is very limited. Therefore, it is necessary to study the mineral composition, which will allow us to consider plant collections as an additional source of trace elements.

Aim. The purpose of our study was to study the content of trace elements (B, Si, Al, Ba, Sr, Ti) in breast collection No. 4, its components and aqueous extracts from them.

© Гравель И. В., Лёвушкин Д. В., 2023
© Gravel I. V., Levushkin D. V., 2023

Materials and methods. The objects of the study were breast collection No. 4, its individual components and aqueous extracts from them. Infusions from the samples were obtained according to the instructions for use on the packaging of a medicinal herbal preparation. The samples were prepared for analysis with a mixture of concentrated nitric acid and water deionized in the Milestone Ethos Up microwave system (Milestone, Italy). The analysis was carried out by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma on the ISP-NPP 720-ES device (Agilent Technologies, USA).
Results and discussion. It was found that the concentrations of Si, Al, B, Sr, Ba, Ti in individual components of the collection varied in the range of 2.9–1240 mg/kg, the transition of trace elements to aqueous extracts was 0.4–34.2 %. The content of these elements in breast collection No. 4 was found to be 13.3–920.7 mg/kg, and the degree of extraction the infusion was 3–40 %. Comparative analysis showed that the extraction of B, Al, Ba from the collection into the infusion is 14–58 % higher than from the individual components included in its composition. It has been established that 50 % of boron and 264 % of silicon from the recommended adequate level of consumption in the Russian Federation enters the human body with an infusion from the breast collection No. 4.
Conclusion. The study showed that breast collection No. 4 can be considered as an additional source of B and Si in the human body. The concentrations of Al, Sr, Ba, Ti were within the average values of the range of the content of these elements in plants.

Keywords: medicinal plant raw materials, herbal preparations, trace elements, atomic emission spectrometry, medicinal collections

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 V. Gravel reviewed the publications and designed the study. Dmitry V. Levushkin received the data and carried out their analysis and interpretation. All the authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

For citation: Gravel I. V., Levushkin D. V. The content of minor elements in the breast collection No. 4. *Drug development & registration*. 2023;12(2):113–123. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-113-123

ВВЕДЕНИЕ

Минорные элементы (микроэлементы) – это группа химических элементов, которые содержатся в организме человека в очень малых количествах, меньше 0,001 % массы [1]. К ним относятся бор (B), кремний (Si), алюминий (Al), стронций (Sr), барий (Ba), титан (Ti), германий (Ge), хром (Cr), олово (Sn), цинк (Zn), фтор (F), молибден (Mo), ванадий (V) и некоторые другие (таблица 1) [2]. Микроэлементы выполняют важные функции в организме человека, в частности, участвуют в обмене белков, жиров, углеводов, синтезе белка, теплообмене, кроветворении, костеобразовании, размножении, реакциях иммунитета [3]. По значимости для живых организмов микроэлементы подразделяют на эссенциальные, условно-эссенциальные, условно токсичные и токсичные [4]. Однако известно, что сами эссенциальные микроэлементы в определенных концентрациях могут вызывать нежелательные реакции, а отдельные токсичные элементы в малых количествах жизненно необходимы организму [5].

Кремний (Si) входит в состав гликозаминогликанов и коллагена, которые формируют и стабилизируют каркас соединительной ткани [6]. Он необходим для поддержания твердости костей, подвижности суставов и хорошего состояния кожи, защищает сосудистую стенку при атеросклеротических процессах, предотвращает развитие болезни Альцгеймера. В организме человека содержится около 1 г Si, преимущественно в виде остатков ортокремниевой кислоты в соединительной ткани (таблица 2) [7]. Дефицит Si может развиваться при его недостаточном поступлении в организм (менее 5 мг/день) [8].

Таблица 1. Содержание, суточное поступление и усвоение микроэлементов

Table 1. Content, daily intake and assimilation of trace elements

Элемент / Trace elements	Содержание в организме, мг / Content in the human body, mg	Суточное поступление, мг / Daily intake, mg	Усвоение организмом, % / Assimilation by the body, %
Кремний / Silicium	1000	20–30	2–4
Бор / Borum	20	7–20	80–90
Алюминий / Aluminum	50	2–3	2–4
Стронций / Strontium	320	0,8–3,0	5–10
Барий / Barium	20	0,3–1,0	10–30
Титан / Titanium	9	0,1–1,0	1–3

Бор (B) – эссенциальный микроэлемент, который участвует в образовании костной ткани; влияет на обмен кальция, фосфора, фтора, цинка и магния; участвует в образовании витамина D; нормализует обмен нуклеиновых кислот; поддерживает и стимулирует синтез белков [9]. Адекватный уровень потребления этого элемента составляет 2 мг/сут [10, 11].

Алюминий (Al) входит в состав множества ферментных систем; участвует в образовании фосфатных и белковых комплексов; процессах регенерации костной, соединительной и эпителиальной ткани; оказывает стимулирующее действие на пищевари-

тельные и паращитовидные железы [12, 13]. С другой стороны, он относится к иммунотоксичным элементам, поскольку вызывает угнетение функций Т- и В-клеток, макрофагов. В малых количествах Al обнаружен практически во всех органах человека, но свыше 5000 мг/сутки может представлять серьезную опасность для здоровья [14, 15]. В желудочно-кишечном тракте лучше всего усваиваются растворимые соли, такие как хлорид и цитрат Al (таблица 2) [16].

Роль стронция (Sr) в организме человека до конца не ясна, но доказано его участие в образовании и прочности эмали зубов, в процессах костеобразования [17]. Он относится к токсичным элементам: при поступлении свыше 700 мг/сут поражаются костная ткань, печень, легкие и мозг [18].

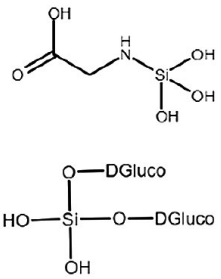
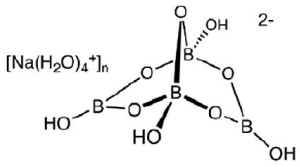
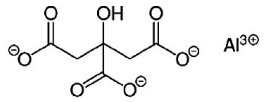
Барий (Ba) относится к токсичным элементам: все его растворимые соединения могут вызвать патологические реакции через несколько часов после поступления в организм. Отравления Ba приводят к спазму гладкой мускулатуры и резкому нарушению сердечной деятельности [19]. Токсическая доза для человека составляет 200 мг [20].

Роль титана (Ti) в организме человека окончательно не выяснена. Ti может поступать в организм человека с пищей (в виде пищевой добавки E171), при вдыхании титановой пыли на химических и металлургических предприятиях [21]. Всего в организме человека содержится 9–15 мг Ti [22].

В ряде исследований установлено, что у пациентов с различными заболеваниями (в том числе при бронхиальной астме) наблюдаются изменения состава и концентраций химических элементов в тканях и органах [23]. Помимо непосредственного участия микроэлементов в патогенезе респираторных заболеваний, их избыток может привести к негативным воздействиям на клетки и внутриклеточные структу-

Таблица 2. Формы поступления минорных элементов в организм человека

Table 2. Forms of entry of minor elements into the human body

Элемент Trace element	**Форма поступления** Form of intake	**Формула** Formula
Кремний Silicium	В виде остатков ортокремниевой кислоты, связанной с аминокислотами и моносахаридами Orthosilicic acid associated with amino acids and monosaccharides	
Бор Borum	В виде солей борной кислоты: • Тетраборат натрия Boric acid salts: • Sodium Tetraborate	
Алюминий Aluminum	В виде солей органических кислот: • Цитрат алюминия Salts of organic acids: • Aluminum citrate	
Стронций Strontium	В виде солей неорганических кислот: • Нитрат стронция. • Хлорид стронция Salts of inorganic acids: • Strontium nitrate. • Strontium chloride	$SrCl_2$, $Sr(NO_3)_2$
Барий Barium	В виде солей неорганических и органических кислот: • Хлорид бария. • Ацетат бария Salts of inorganic and organic acids: • Barium Chloride. • Barium Acetate	$BaCl_2$, $Ba(CH_3COO)_2$
Титан Titanium	В виде оксидов: • Диоксид титана Oxides: • Titanium dioxide	TiO_2

ры [24]. Показано, что в организме больных с хроническими заболеваниями увеличивается содержание Al и S, наблюдается дисбаланс Zn, Cu, Mn, Co [25]. У больных с множественными эпизодами острых респираторных заболеваний наблюдается повышенное содержание Pb, Cd, Cr и пониженное содержание Ca, Mg, Fe [26]. Для макроэлементов такие закономерности изучены намного лучше, чем для микроэлементов.

Минеральные вещества в лекарственном растительном сырье (ЛРС) находятся в легко усваиваемых формах – в виде солей органических кислот (цитратов, оротатов, глюконатов и пиколинатов) и других растворимых комплексных соединений [27]. Поэтому лекарственные растительные препараты могут оказывать терапевтический эффект не только за счет биологически активных веществ, но и корректировать микроэлементный баланс в организме человека. Однако ранее многокомпонентные лекарственные растительные препараты (ЛРП) в этом аспекте не рассматривались.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве основного объекта исследования выбран грудной сбор № 4 (ОАО «Красногорсклексредства», Россия, серия 50419). Помимо него, исследованы отдельные компоненты, из которых получен сбор: цветки ромашки аптечной (*Chamomillae recutita flores*), цветки календулы лекарственной (*Calendulae officinalis flores*), листья мяты перечной (*Menthae piperitae folia*), побеги багульника болотного (*Ledi palustris cormus*), корни солодки (*Glycyrrhizae radices*), трава фиалки (*Violae herba*).

В анализе использовалась концентрированная азотная кислота (о.с.ч., 18-4, АО «ВЕКТОН», Россия) и вода деионизированная, которую получали при помощи системы очистки воды Milli-Q plus (Millipore, Германия).

Из сбора и всех видов сырья готовили водные извлечения. Измельченное лекарственное растительное сырье помещали в стеклянный стакан на 250 мл и заливали 200 мл горячей деионизированной водой. Накрыв часовым стеклом, нагревали на кипящей водяной бане при периодическом помешивании 15 минут. Затем охлаждали при комнатной температуре 45 минут и фильтровали через фильтр «красная лента». Затем фильтр помещали в марлю и вместе с фильтром отжимали сырье. Объем полученного настоя доводили деионизированной водой до 200,0 мл в мерной колбе.

Содержание элементов (Si, Al, B, Sr, Ba, Ti) в пробах определяли методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой после предварительной кислотной минерализации. Пробоподготовку образцов сырья проводили смесью кислоты азотной концентрированной и воды деионизированной в соотношении 1:10. Водные извлечения (20 мл) предварительно упаривали до сухого остатка. Разложение осуществляли в микроволновой системе Milestone Ethos Up (Milestone, Италия) с частотой 2450 Гц и выходной мощностью 900 Вт. Элементный анализ проводили методом атомно-эмиссионной спектрометрии на приборе ИСП-АЭС 720-ES (Agilent Technologies, США) с осевой конфигурацией обзора плазмы (таблица 3).

Таблица 3. Условия измерений в ИСП–АЭС эксперименте

Table 3. Measurement conditions in the ISP–NPP experiment

Показатель, единицы измерения Indicator, units of measurement	Значение Value
Мощность РЧ, кВт RF power, kW	1,40
Поток плазмы, л/мин Plasma flow, l/min	15
Дополнительный поток, л/мин Additional flow, l/min	1,50
Поток распылителя, л/мин Spray flow, l/min	0,70
Время чтения повторности, с Repetition reading time, s	5
Время стабилизации, с Stabilization time, s	15
Повторности Repetition	3
Задержка ввода пробы, с Sample input delay, s	15
Скорость вращения перистальтического насоса, об/мин Rotation speed of the peristaltic pump, rpm	12

Значение концентраций рассчитывали как среднее арифметическое в пересчете на 1 грамм сухого сырья.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что в отдельных компонентах сбора концентрации микроэлементов варьировали в широком диапазоне (в мг/кг): Si – 282,3–1239,2; Al – 27,6–512,0; B – 6,5–11,9; Sr – 7,6–233,2; Ba – 12,3–84,1; Ti – 2,9–97,5 (таблица 4). Максимальные концентрации элементов определены в корнях солодки (Si, Al, Sr), в цветках календулы лекарственной (Ti, B), в побегах багульника болотного (Ba). Минимальные концентрации микроэлементов отмечены в цветках календулы лекарственной (Ba) и в побегах багульника болотного (Si, Al, Sr, Ti, B). Содержание микроэлементов в образцах грудного сбора № 4 убывали в ряду: Si > Al > Sr > Ba > Ti > B.

Концентрации Si варьировали в диапазоне 282,30–1239,24 мг/кг, что находится в пределах средних значений в растениях (14,47–1700,19 мг/кг) [28]. Si найден в максимальных концентрациях в корнях солодки, а в минимальных – в побегах багульника болотного (рисунок 1). Обнаружено, что в корнях солодки концентрации Si на 40 % больше, чем в грудном сборе № 4.

Al в компонентах сбора найден в концентрациях 27,58–512,02 мг/кг, что не превышало среднего содержания в растениях (0,06–5130 мг/кг) [28]. Мак-

Таблица 4. **Среднее содержание микроэлементов в грудном сборе № 4 и его компонентах**

Table 4. **Average content of trace elements in breast collection No. 4 and its components**

ЛРС/ЛРП LRS/LRP	Микроэлементы, мг/кг Trace elements, mg/kg					
	Si	Al	B	Sr	Ba	Ti
Цветки ромашки аптечной Chamomillae recutita flores	811,66 ± 21,13	115,59 ± 2,96	28,68 ± 0,20	13,15 ± 0,46	13,44 ± 0,63	15,27 ± 0,51
Цветки календулы лекарственной Calendulae officinalis flores	860,75 ± 47,67	470,72 ± 11,25	34,35 ± 0,20	58,62 ± 0,56	12,32 ± 1,35	97,48 ± 2,27
Листья мяты перечной Menthae piperitae folia	995,74 ± 115,67	285,79 ± 27,78	11,93 ± 0,51	42,45 ± 1,76	19,54 ± 0,97	32,15 ± 3,77
Побеги багульника болотного Ledi palustris cormus	282,30 ± 16,17	27,58 ± 0,83	6,51 ± 0,85	7,58 ± 0,17	84,12 ± 1,66	2,94 ± 0,23
Корни солодки Glycyrrhizae radices	1239,24 ± 41,43	512,02 ± 15,38	8,42 ± 0,43	233,19 ± 5,08	15,23 ± 0,36	26,50 ± 1,29
Трава фиалки Violae herba	449,95 ± 61,96	90,95 ± 10,15	8,88 ± 0,71	35,84 ± 1,76	72,96 ± 0,68	8,97 ± 1,55
Грудной сбор № 4 Breast collection No. 4	920,67 ± 132,42	229,72 ± 33,44	13,27 ± 0,82	51,52 ± 1,54	36,48 ± 1,08	30,97 ± 8,04

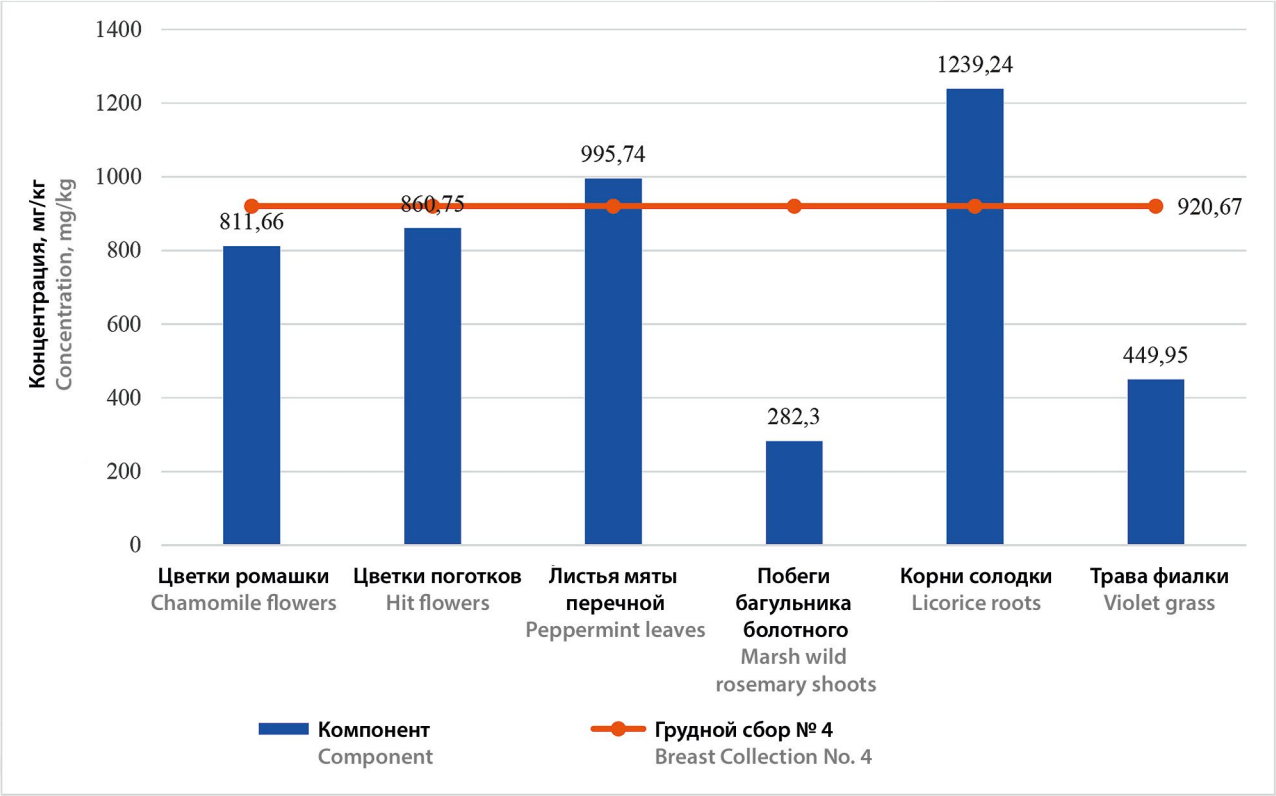


Рисунок 1. **Содержание кремния в грудном сборе № 4 и его компонентах, мг/кг**

Figure 1. **The content of Si in breast collection No. 4 and its components, mg/kg**

симальные концентрации элемента отмечены в корнях солодки, а в минимальных – в побегах багульника болотного.

Содержание B варьировало в диапазоне 6,51–34,35 мг/кг (концентрации в растениях – 2,50–61,0 мг/кг) [28]. Максимальные концентрации элемента отмечены в цветках календулы лекарственной, а в минимальных – в побегах багульника болотного (рисунок 2). В отдельных компонентах (цветки ромашки аптечной и цветки календулы лекарственной) содержание B было более чем в 2 раза выше по сравнению со сбором.

Концентрации Sr варьировали в диапазоне 7,58–233,19 мг/кг, что несколько выше концентраций, указанных в литературных источниках (0,19–212,00 мг/кг) [28]. Sr в максимальных концентрациях

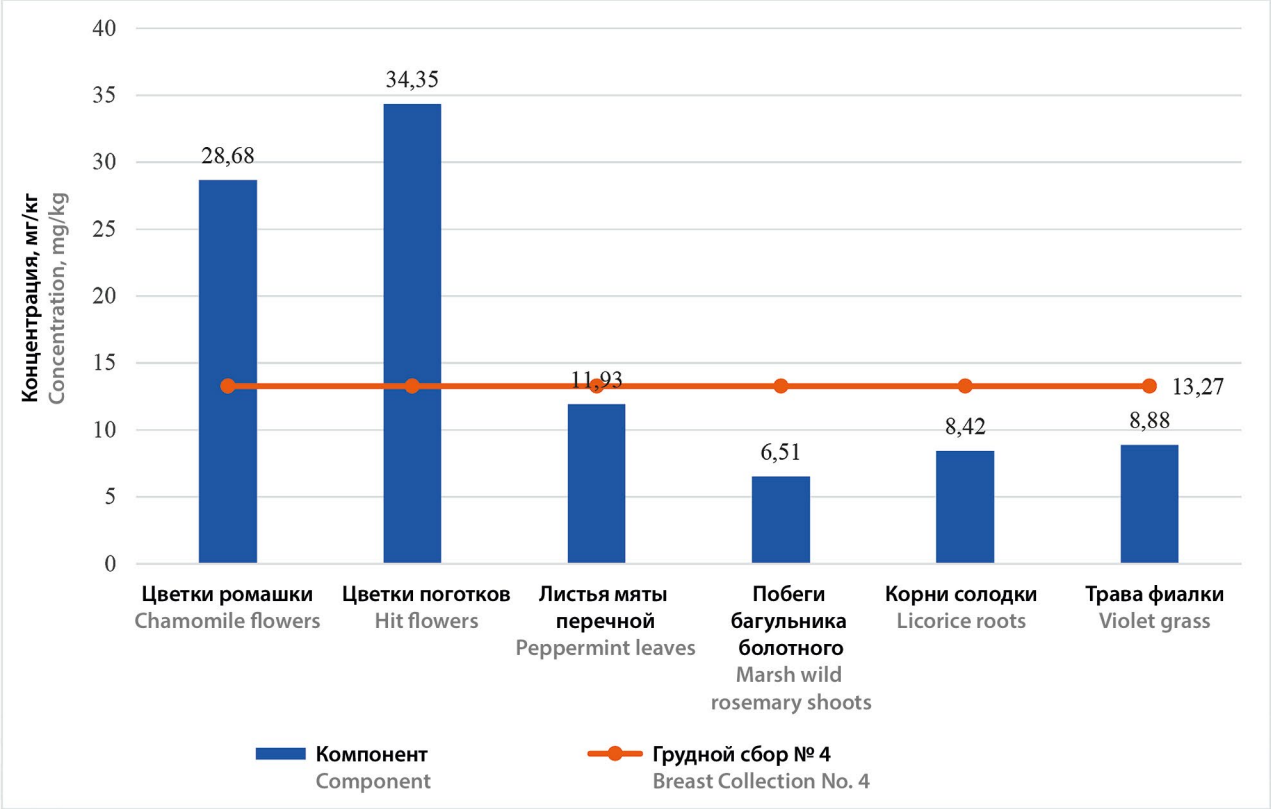


Рисунок 2. Содержание бора в грудном сборе № 4 и его компонентах, мг/кг

Figure 2. The content of B in breast collection No. 4 and its components, mg/kg

найден в корнях солодки, а в минимальных – в побегах багульника болотного. Показано, что содержание Sr в корнях солодки в 4,5 раза выше, чем в грудном сборе № 4. Другие компоненты содержали Sr в концентрациях меньших или равных содержанию в грудном сборе.

Концентрации Ba варьировало в диапазоне 12,32–84,12 мг/кг, что согласуется с литературными данными (1,40–181,00 мг/кг) [28]. Ba в максимальных концентрациях найден в побегах багульника болотного, а в минимальных – в цветках календулы лекарственной. Проведенные исследования показали, что концентрации Ba в побегах багульника болотного и в траве фиалки в 2 раза выше, чем в грудном сборе № 4.

Содержание Ti варьировало в диапазоне 2,94–97,48 мг/кг, что выше концентраций, указанных в литературных источниках (1,30–38,9 мг/кг) [28]. Ti в максимальных концентрациях найден в цветках календулы лекарственной, а в минимальных – в побегах багульника болотного. Установлено, что содержание Ti в цветках календулы лекарственной в 3 раза выше, чем в грудном сборе № 4 (2669,15 ± 69,8 мг/кг).

В водных извлечения из компонентов грудного сбора № 4 концентрации микроэлементов варьировали в широком диапазоне (в мг/кг): Si – 14,93–86,83; Al – 1,54–4,18; B – 1,19–4,47; Sr – 1,44–10,93; Ba – 0,39–6,43; Ti – 0,03–2,26 (таблица 5). Максимальные концентрации элементов были обнаружены в настоях из календулы лекарственной цветков (Si, Ti), из корней солодки (Al, Sr), из багульника болотного побегов (Ba), из ромашки аптечной цветков (B). Минимальные концентрации микроэлементов отмечены в настоях из корней солодки (B), из календулы лекарственной цветков (Ba) и из багульника болотного побегов (большинство элементов). Содержание микроэлементов в образцах настоя из грудного сбора № 4 убывали в ряду: Si > Sr > Al > B > Ba > Ti.

Содержание Si в водных извлечениях варьировало в диапазоне 14,93–86,83 мг/кг (рисунок 3). Si найден в максимальных концентрациях в водном извлечении из календулы лекарственной цветков, а в минимальных – из побегов багульника болотного.

Содержание Al в водных извлечениях варьировало в диапазоне 1,54–13,85 мг/кг. Al найден в максимальных концентрациях в водном извлечении из календулы лекарственной цветков, а в минимальных – из побегов багульника болотного. Установлено, что содержание Al в настое из цветков календулы лекарственной в 2,05 раз выше, чем содержание вводном извлечении из грудного сбора № 4.

Концентрации B в водных извлечениях варьировало в диапазоне 1,19–5,22 мг/кг (рисунок 4). B найден в максимальных концентрациях в водном извле-

Таблица 5. **Среднее содержание микроэлементов в водных извлечениях (настоях) из грудного сбора № 4 и его компонентов**

Table 5. **Average content of trace elements in aqueous extracts (infusions) from breast collection No. 4 and its components**

ЛРС/ЛРП LRS/LRP	Микроэлементы, мг/кг Trace elements, mg/kg					
	Si	Al	B	Sr	Ba	Ti
Цветки ромашки аптечной Chamomillae recutita flores	65,39 ± 0,10	2,03 ± 0,34	4,74 ± 0,05	2,43 ± 0,13	0,76 ± 0,04	0,11 ± 0,03
Цветки календулы лекарственной Calendulae officinalis flores	86,83 ± 8,13	13,85 ± 1,76	4,07 ± 0,03	4,41 ± 0,04	0,39 ± 0,01	2,26 ± 0,34
Листья мяты перечной Menthae piperitae folia	44,34 ± 0,14	2,12 ± 0,54	2,49 ± 0,01	7,04 ± 0,34	1,58 ± 0,14	0,13 ± 0,05
Побеги багульника болотного Ledi palustris cormus	14,93 ± 0,13	1,54 ± 0,02	2,23 ± 0,08	1,44 ± 0,11	6,43 ± 0,17	0,03 ± 0,00
Корни солодки Glycyrrhizae radices	26,49 ± 0,09	4,18 ± 0,15	1,19 ± 0,03	10,93 ± 0,35	0,64 ± 0,02	0,26 ± 0,08
Трава фиалки Violae herba	16,81 ± 0,08	2,03 ± 0,10	1,23 ± 0,02	3,27 ± 0,24	3,20 ± 0,19	0,10 ± 0,01
Грудной сбор № 4 Breast collection No. 4	66,36 ± 0,24	6,78 ± 0,95	5,22 ± 0,08	8,06 ± 0,32	4,70 ± 0,66	0,63 ± 0,09

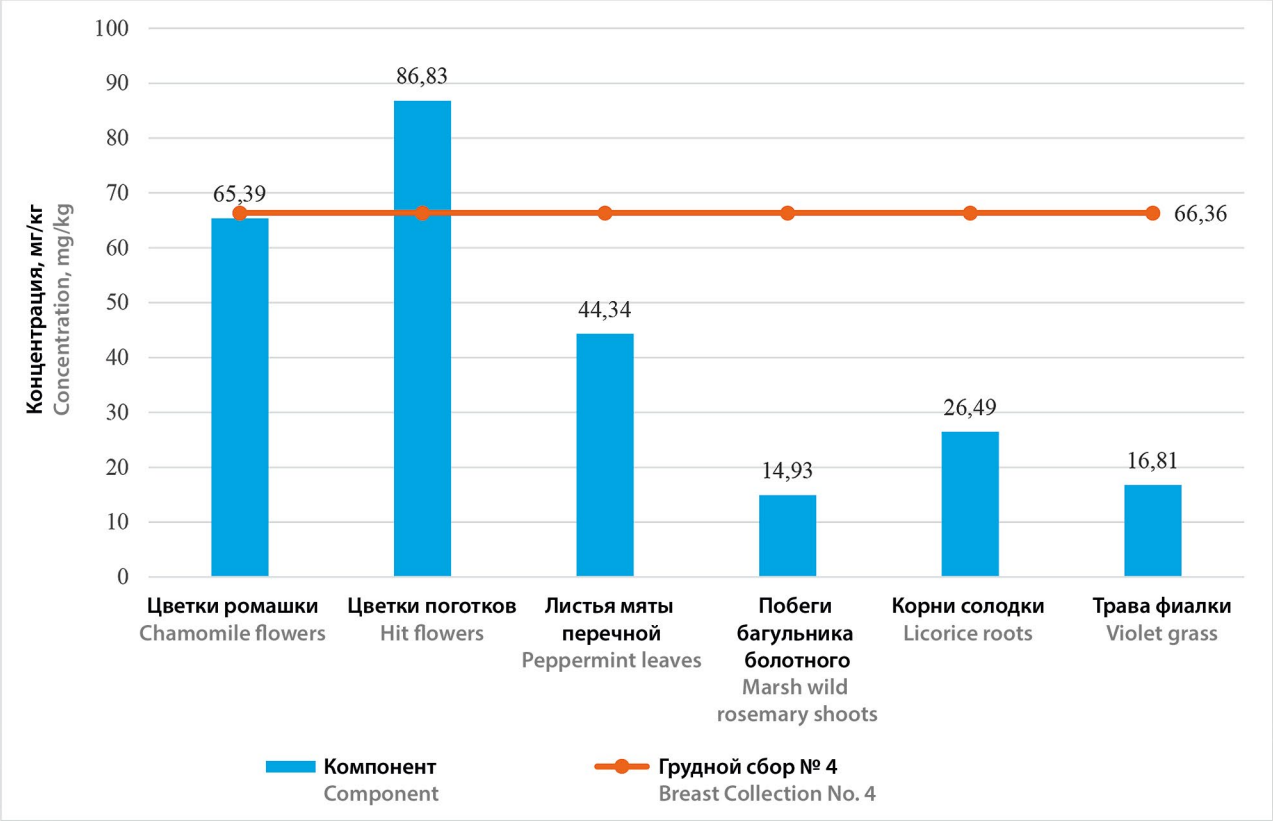


Рисунок 3. **Содержание кремния в водных извлечениях, мг/кг**

Figure 3. **The content of Si in aqueous extracts, mg/kg**

чении из ромашки аптечной цветков, а в минимальных – из корней солодки. Показано, что концентрации B в настое из грудного сбора № 4 на 10 % выше, чем в настоях из компонентов.

Содержание Sr в водных извлечениях варьировало в диапазоне 1,44–10,93 мг/кг. Sr найден в максимальных концентрациях в водном извлечении из корней солодки, а в минимальных – из побегов багульника болотного. Исследования показали, что содержание Sr в настое из корней солодки в 1,36 раз выше, чем в настоях из грудного сбора № 4.

Концентрации Ba в водных извлечениях варьировали в диапазоне 0,39–6,43 мг/кг. Ba найден в максимальных концентрациях в водном извлечении из

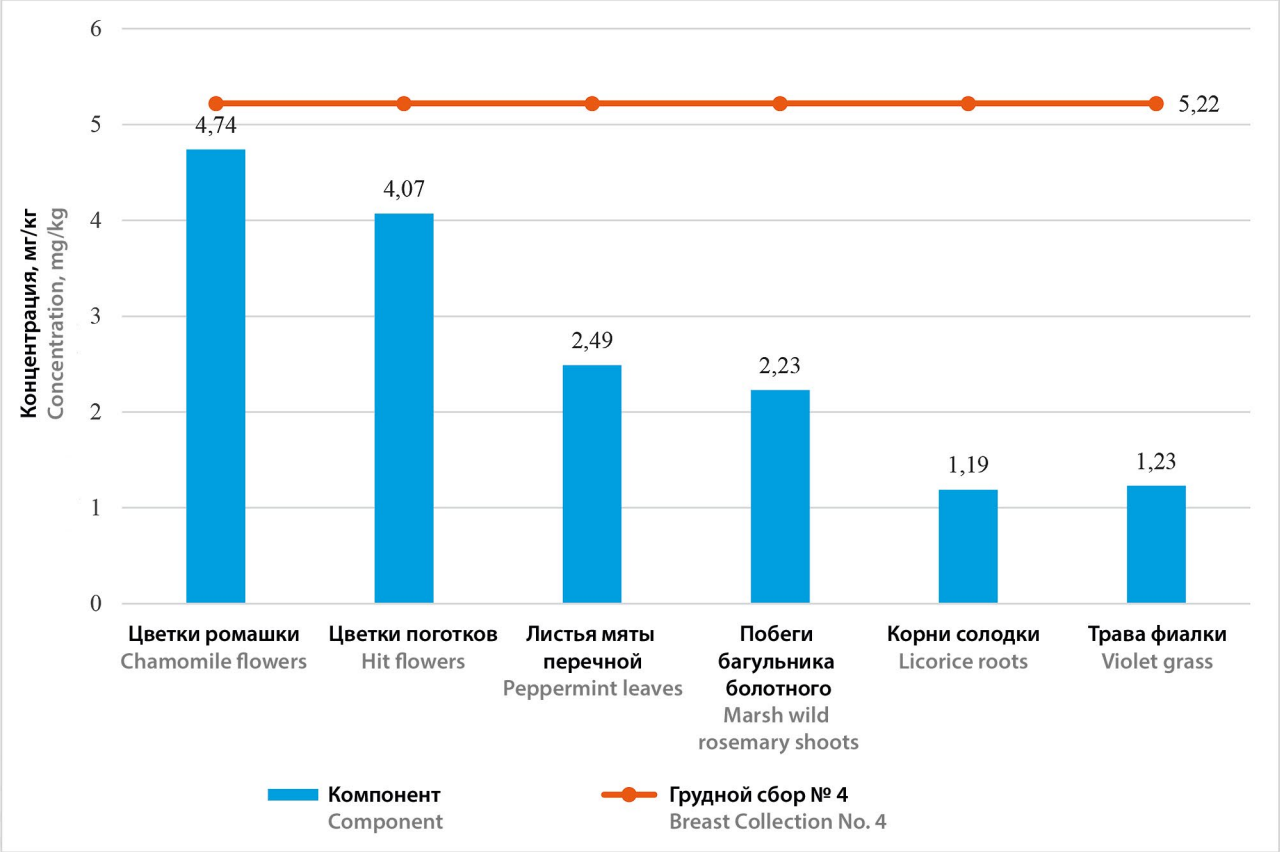


Рисунок 4. Содержание бора в водных извлечениях, мг/кг

Figure 4. The content of B in aqueous extracts, mg/kg

побегов багульника болотного, а в минимальных – из календулы лекарственной цветков. Установлено, что концентрация Ba в настое из багульника болотного побегов в 1,36 раз выше, чем в настоях из грудного сбора № 4.

Содержание Ti в водных извлечениях варьировало в диапазоне 0,03–2,26 мг/кг. Ti найден в максимальных концентрациях в водном извлечении из календулы лекарственной цветков, а в минимальных – из багульника болотного побегов. Исследования показали, что содержание Ti в настое из календулы лекарственной цветков в 3,58 раз выше, чем в настоях из грудного сбора № 4.

Степени перехода элементов из лекарственного растительного сырья в водные извлечения варьировали в диапазонах (в %): Si – 2,14–10,09; Al – 0,74–5,57; B – 11,84–34,22; Sr – 4,69–18,94; Ba – 3,14–8,08; Ti – 0,39–1,16 (таблица 6). Максимальный переход элемента в настой был обнаружен из календулы лекарственной цветков (Si), мяты перечной листьев (Ba), багульника болотного побегов (Al, B, Sr, Ti). Минимальный переход элементов в настой отмечен из солодки корней (Si, Sr), мяты перечной листьев (A, Ti) и календулы лекарственной цветков (B, Ba). Для грудного сбора переход элементов в водные извлечения составил: Si – 7,21 %; Al – 2,95 %; B – 39,3 %; Sr – 15,64 %; Ba – 12,87 %; Ti – 2,04 %.

Проведенный анализ показал, что концентрации микроэлементов в лекарственном растительном сырье и препаратах из них варьируют в широких диапазонах в зависимости от вида сырья и производящих растений. Обнаружено, что в местах обитания с экологическими особенностями растения содержат наименьшее количество микроэлементов. Так, в багульнике болотном, произрастающий на болотистых почвах, концентрации Si, Al, B, Sr, Ti были ниже, чем в других видах лекарственного растительного сырья.

В целом для рядов убывания содержания элементов в настоях сохраняются закономерности, характерные и для отдельных компонентов сбора. В частности, в водных извлечениях и отдельных компонентах максимальные концентрации элементов были обнаружены в корнях солодки (Sr), цветках календулы лекарственной (Ti) и побегах багульника болотного (Ba). И в настоях, и в компонентах сбора минимальные концентрации микроэлементов отмечены в побегах багульника болотного (Si, Al, Sr, Ti) и цветках календулы лекарственной (Ba). В рядах убывания содержания элементов сохранялась общая последовательность компонентов сбора.

Таблица 6. **Переход микроэлементов в водные извлечения из ЛРС/ЛРП**

Table 6. **Transition of trace elements to aqueous extracts from raw materials/preparation**

ЛРС/ЛРП LRS/LRP	Переход микроэлемента, % Trace element transition, %					
	Si	Al	B	Sr	Ba	Ti
Цветки ромашки аптечной Chamomillae recutita flores	8,06	1,76	16,52	18,5	5,67	0,69
Цветки календулы лекарственной Calendulae officinalis flores	10,09	2,94	11,84	7,51	3,14	2,32
Листья мяты перечной Menthae piperitae folia	4,45	0,74	20,91	16,58	8,08	0,39
Побеги багульника болотного Ledi palustris cormus	5,29	5,57	34,22	18,94	7,65	1,16
Корни солодки Glycyrrhizae radices	2,14	0,82	14,07	4,69	4,21	0,97
Трава фиалки Violae herba	3,74	2,23	13,82	9,11	4,38	1,11
Грудной сбор № 4 Breast collection No. 4	7,21	2,95	39,3	15,64	12,87	2,04

Установлено, что наибольшее количество B содержится в образцах лекарственного растительного сырья, относящемуся к морфологической группе цветки (цветки календулы лекарственной и цветки ромашки аптечной), что согласуется с литературными данными.

Выявлены компоненты грудного сбора № 4, которые вносят наибольший вклад в содержание каждого из элементов: корни солодки накапливают в большом количестве Sr, а цветки календулы лекарственной – *Ti*.

Установлено, что водные извлечения из отдельных компонентов содержат микроэлементы в 5–10 раз выше, чем из сбора: настой цветков календулы лекарственной богат Al и Ti, а настой побегов багульника болотного – Ba.

Отмечен наибольший переход элементов для тех видов лекарственного растительного сырья, где содержание элемента невелико. Это хорошо видно на примере водных извлечений из багульника, где концентрация большинства элементов была самой низкой (2,94–282,30 мг/кг), а переход в настои наивысшим (0,4–20,9 %). Переход Al и бора из грудного сбора в настои был выше, чем переход из компонентов. Это свидетельствует о том, что с грудным сбором поступает больше данных элементов и он может использоваться при их дефиците.

Согласно Методическим рекомендациям провели расчет поступления в организм человека [11]. Получено, что поступление с настоем из грудного сбора № 4 Si – 13,2 мг/сут, B – 1 мг/сут, что составляет соответственно 264 и 50 % от адекватного уровня потребления (таблица 7). Это позволяет рассматривать грудной сбор № 4 в качестве источника поступления этих микроэлементов в организм человека.

Таблица 7. **Разовое и суточное поступление микроэлементов с настоем из грудного сбора № 4**

Table 7. **Single and daily intake of trace elements with infusion from breast collection No. 4**

Элемент Trace elements	Разовое поступление с настоем грудного сбора № 4, мг One-time intake with infusion of breast collection No. 4, mg	Суточное поступление с настоем грудного сбора № 4, мг Daily intake with infusion of breast collection No. 4, mg	Адекватный уровень потребления, мг/сут [11] Adequate level of consumption, mg/day [11]	Процент от адекватного уровня потребления, % Percentage of an adequate level of consumption, %
Кремний Silicium	4,4	13,2	5	264
Бор Borum	0,46	1,38	2	50
Алюминий Aluminum	0,35	1,05	Не установлено Not installed	Не применимо Not applicable
Стронций Strontium	0,54	1,61	Не установлено Not installed	Не применимо Not applicable
Барий Barium	0,31	0,94	Не установлено Not installed	Не применимо Not applicable
Титан Titanium	0,04	0,13	Не установлено Not installed	Не применимо Not applicable

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало высокое содержание микроэлементов, как в грудном сборе № 4, так и в его компонентах. Концентрации изученных элементов в отдельных компонентах варьировали в диапазоне 2,94–1239,24 мг/кг, а в сборе – 13,27–920,67 мг/кг.

Для настоев сохраняются закономерности содержания элементов, характерные и для отдельных компонентов сбора. Концентрации микроэлементов в водных извлечениях из компонентов достигали 86,83 мг/кг, а из сбора – 66,36 мг/кг.

Установлено, что переход минеральных веществ в водные извлечения из грудного сбора № 4 был наибольшим и достигал 39,3 %. При курсовом приеме грудного сбора № 4 может поступать до 264 и 50 % от адекватного уровня потребления Si и B. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования грудного сбора № 4 как дополнительного источника микроэлементов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Egami F. Minor elements and evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 1974;4(2):113–120. DOI: 10.1007/BF01732017.
2. Авцын А. П., Жаворонков А. А., Риш М. А., Строчкова Л. С. Микроэлементозы человека. М.: Медицина; 1991. 496 с.
3. Attar T. A mini-review on importance and role of trace elements in the human organism. *Chemical Review and Letters*. 2020;3(3):117–130. DOI: 10.22034/CRL.2020.229025.1058.
4. Битюцкий Н. П. Микроэлементы высших растений. СПб.: Санкт-Петербургского Государственного Университета; 2011. 368 с. (In Russ.)
5. Кульчавеня Е. В. Роль микроэлементов в здоровье и благополучии человека. *Клинический разбор в общей медицине*. 2021;1:58–64.
6. Мансурова Л. А. Физиологическая роль кремния. *Сибирский медицинский журнал*. 2009;90(7):16–18. DOI: 10.22034/CRL.2020.229025.1058.
7. Непомнящих С. Ф. Роль некоторых микроэлементов в метаболизме организма человека. *Редакционная коллегия*. 2016;3:92.
8. Pérez-Granados A. M., Vaquero M. P. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications. *Journal of Nutrition Health and Aging*. 2002;6.2:154–162.
9. Лысиков Ю. А. Роль и физиологические основы обмена макро- и микроэлементов в питании человека. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2009;2:120–131.
10. Дыдыкина И. С., Дыдыкина П. С., Алексеева О. Г. Вклад микроэлементов (меди, марганца, цинка, бора) в здоровье кости: вопросы профилактики и лечения остеопении и остеопороза. *Эффективная фармакотерапия*. 2013;38:42–49.
11. Рациональное питание. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ. Москва: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004. 46 с.
12. Женихов Н. А., Дианова Д. Г. Металлы в окружающей среде и их влияние на здоровье человека. *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. 2017;4:72–74.
13. Exley C. Human exposure to aluminium. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 2013;15(10):1807–1816. DOI: 10.1039/c3em00374d.
14. Минтель М. В., Землянова М. А., Жданова-Заплесвичко И. Г. Некоторые аспекты совместного действия алюминия и фтора на организм человека (обзор литературы). *Экология человека*. 2018;9:12–17.
15. Новиков В. С., Шустов Е. Б. Роль минеральных веществ и микроэлементов в сохранении здоровья человека. *Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук*. 2017;3:5–16. DOI: 10.26163/raen.2021.53.71.001.
16. Багрянцева О. В., Шатров Г. Н., Хотимченко С. А., Бессонов В. В., Арнаутов О. В. Алюминий: оценка риска для здоровья потребителей при поступлении с пищевыми продуктами. *Анализ риска здоровью*. 2016;1:59–68. DOI: 10.21668/health.risk/2016.1.07.
17. Полякова Е. В. Стронций в источниках водоснабжения Архангельской области и его влияние на организм человека. *Экология человека*. 2012;2:9–14. DOI: 10.18411/spc-22-12-2017-15.
18. Nielsen S. Pors. The biological role of strontium. *Bone*. 2004;35(3):583–588. DOI: 10.1016/j.bone.2004.04.026.
19. Чащин В. П., Иванова О. М., Иванова М. А. Медико-экологические аспекты связи расстройств функциональных систем человека с содержанием микроэлементов бария и стронция в организме. Обзор литературы. *Экология человека*. 2019;4:39–47.
20. Schroeder H. A., Isabel H. T., Alexis P. N. Trace metals in man: strontium and barium. *Journal of chronic diseases*. 1972;25(9):491–517. DOI: 10.1016/0021-9681(72)90150-6.
21. Масловская В. М. Биологические свойства титана и его роль в функционировании организма человека и медицине. *Актуальные проблемы современной медицины и фармации*. 2015;1:1531.
22. Kim K. T., Eo M. Y., Nguyen T. T. H., Kim S. M. General review of titanium toxicity. *International journal of implant dentistry*. 2019;5(1):10. DOI: 10.1186/s40729-019-0162-x.
23. Бархина Т. Г., Гущин М. Ю., Гусниев С. А., Польнер С. А., Хайруллин Р. М. Роль макро- и микроэлементов в этиологии и развитии аллергических заболеваний дыхательных путей. *Морфологические ведомости*. 2016;24(3):99–106.
24. Ахмедли К. Н. Особенности дефицита макро- и микроэлементов при дисплазии соединительной ткани. *Современная педиатрия*. 2017;4:117–119. DOI: 10.15574/SP.2017.84.117.
25. Шевцова В. И., Зуйкова А. А., Пашков А. Н. Раннее выявление хронической обструктивной болезни легких-вектор на биомаркеры. *Архивъ внутренней медицины*. 2016;4:47–52. DOI: 10.18411/spc-18-01-2018-12
26. Лучанинова В. Н., Транковская Л. В., Зайко А. А. Характеристика и взаимосвязь элементного статуса и некоторых иммунобиологических показателей у детей, часто болеющих острыми респираторными заболеваниями. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*. 2004;83(4):22–26.
27. Коровина Н. А., Захарова И. Н., Заплатников А. Л., Обыночная Е. Г. Коррекция дефицита витаминов и микроэлементов у детей. *Медицинский совет*. 2013;8:94–98.
28. Pohl P., Dzimitrowicz A., Jedryczko D., Szymczycha-Madeja A., Welna M., Jamroz P. The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016;130:326–335. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.01.042.

REFERENCES

1. Egami F. Minor elements and evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 1974;4(2):113–120. DOI: 10.1007/BF01732017.
2. Avtsyn A. P., Zhavoronkov A. A., Rish M. A., Strochkova L. S. Human trace elements. M.: Medicine; 1991. 496 p. (In Russ.)
3. Attar T. A mini-review on importance and role of trace elements in the human organism. *Chemical Review and Letters*. 2020;3(3):117–130. DOI: 10.22034/CRL.2020.229025.1058.
4. Bitutsky N. P. Trace elements of higher plants. St. Petersburg: Publishing House of St. Petersburg State University; 2011. 368 p. (In Russ.)
5. Kulchavenya E. V. The role of trace elements in human health and well-being. *Clinical analysis in general medicine*. 2021;1:58–64. (In Russ.)
6. Mansurova L. A. The physiological role of silicon. *Siberian Medical Journal*. 2009;90(7):16–18. (In Russ.) DOI: 10.22034/CRL.2020.229025.1058.
7. Nepomnyashchikh S. F. The role of certain trace elements in the metabolism of the human body. *Editorial Board*. 2016;3:92. (In Russ.)
8. Pérez-Granados A. M., Vaquero M. P. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications. *Journal of Nutrition Health and Aging*. 2002;6.2:154–162.

9. Lysikov Y. A. The role and physiological basis of the exchange of macro- and microelements in human nutrition. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2009;2:120–131. (In Russ.)
10. Dydykina I. S., Dydykina P. S., and Alekseeva O. G. The contribution of trace elements (copper, manganese, zinc, boron) to bone health: issues of prevention and treatment of osteopenia and osteoporosis. *Effective pharmacotherapy*. 2013;38:42–49. (In Russ.)
11. Balanced diet. Recommended levels of consumption of food and biologically active substances. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of Russia; 2004. 46 p. (In Russ.)
12. Grooms N. A., Dianova D. G. Metals in the environment and their impact on human health. *Actual problems of humanities and natural sciences*. 2017;4:72–74. (In Russ.)
13. Exley C. Human exposure to aluminium. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 2013;15(10):1807–1816. DOI: 10.1039/c3em00374d.
14. Mintel M. V., Zemlyanova M. A., Zhdanova-Zaplesvichko I. G. Some aspects of the joint action of aluminum and fluorine on the human body (literature review). *Human ecology*. 2018;9:12–17. (In Russ.)
15. Novikov V. S., Shustov E. B. The role of minerals and trace elements in maintaining human health. *Bulletin of Education and Development of Science of the Russian Academy of Natural Sciences*. 2017;3:5–16. (In Russ.) DOI: 10.26163/raen.2021.53.71.001.
16. Bagriantseva O. V., Shatrov G. N., Khotimchenko S. A., Bessonov V. V., Arnautov O. V. Aluminum: assessment of the risk to consumer health when ingested with food. *Health risk analysis*. 2016;1:59–68. (In Russ.) DOI: 10.21668/health.risk/2016.1.07.
17. Polyakova E. V. Strontium in the water supply sources of the Arkhangelsk region and its effect on the human body. *Human ecology*. 2012;2:9–14. (In Russ.) DOI: 10.18411/spc-22-12-2017-15.
18. Nielsen S. Pors. The biological role of strontium. *Bone.* 2004;35(3): 583–588. DOI: 10.1016/j.bone.2004.04.026.
19. Chashchin V. P., Ivanova O. M., Ivanova M. A. Medical and ecological aspects of the relationship of disorders of human functional systems with the content of trace elements barium and strontium in the body. Literature review. *Human ecology*. 2019;4:39–47. (In Russ.)
20. Schroeder H. A., Isabel H. T., Alexis P. N. Trace metals in man: strontium and barium. *Journal of chronic diseases*. 1972;25(9):491–517. DOI: 10.1016/0021-9681(72)90150-6.
21. Maslovskaya V. M. Biological properties of titanium and its role in the functioning of the human body and medicine. *Actual problems of modern medicine and pharmacy*. 2015;1:1531. (In Russ.)
22. Kim K. T., Eo M. Y., Nguyen T. T. H., Kim S. M. General review of titanium toxicity. *International journal of implant dentistry*. 2019;5(1):10. DOI: 10.1186/s40729-019-0162-x.
23. Barkhina T. G., Gushchin M. Yu., Gusniev S. A., Polner S. A., Khayrullin R. M. The role of macroand microelements in etiology and development of allergic diseases of respiratory ways. *Morphological newsletter*. 2016;24(3):99–106. (In Russ.)
24. Akhmedli K. N. Features of macro- and microelement deficiency in connective tissue dysplasia. *Modern pediatrics*. 2017;4:117–119. (In Russ.) DOI: 10.15574/SP.2017.84.117.
25. Shevtsova V. I., Zuikova A. A., Pashkov A. N. Early detection of chronic obstructive pulmonary disease is a vector for biomarkers. *Archive of Internal Medicine*. 2016;4:47–52. (In Russ.) DOI: 10.18411/spc-18-01-2018-12
26. Luchaninova V. N., Trankovskaya L. V., Zaiko A. A. Characteristics and interrelation of the elemental status and some immunobiological indicators in children often suffering from acute respiratory diseases. *Pediatrics. The journal named after G. Speransky*. 2004;83(4):22–26. (In Russ.)
27. Korovina N. A., Zakharova I. N., Platnikov A. L., Obynochnaya E. G. Correction of vitamin and trace element deficiency in children. *Medical advice*. 2013;8:94–98. (In Russ.)
28. Pohl P., Dzimitrowicz A., Jedryczko D., Szymczycha-Madeja A., Welna M., Jamroz P. The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016;130:326–335. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.01.042.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-124-134
УДК 615.011: 576.08

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Физико-химическая и функциональная характеризация лекарственного препарата Ринсулин® Р

А. В. Бабина✉, Р. В. Драй, В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, П. Г. Заикин, В. И. Шмурак, Т. Э. Елтышева, И. Е. Макаренко

ЗАО «Фарм-Холдинг», 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34-А

✉ **Контактное лицо:** Бабина Анна Владимировна. **E-mail:** Anna.Babina@geropharm.com

ORCID: А. В. Бабина – https://orcid.org/0000-0003-3024-4009; Р. В. Драй – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097; В. Б. Сапарова – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129; А. Н. Афанасьева – https://orcid.org/0000-0002-1443-4294; П. Г. Заикин – https://orcid.org/0009-0008-8467-9781; В. И. Шмурак – https://orcid.org/0000-0003-0282-9843; Т. Э. Елтышева – https://orcid.org/0000-0002-1931-9455; И. Е. Макаренко – https://orcid.org/0000-0003-2308-0608.

Статья поступила: 10.08.2022 **Статья принята в печать:** 19.05.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. В настоящее время биосимиляры обрели довольно широкое применение в терапии ряда хронических и опасных для жизни заболеваний. Благодаря им происходит значительное снижение экономического давления биологических препаратов на систему здравоохранения и обеспечивается широкая доступность пациентов к эффективным и безопасным лекарственным средствам. Одним из важнейших этапов доказательства биосимилярности является проведение физико-химической и функциональной характеризации белков. Данный комплекс исследований является общепринятым, максимально чувствительным и позволяет дать заключение о соответствии биосимиляра оригинальному препарату.

Цель. Проведение физико-химической и функциональной характеризации препарата Ринсулин® Р (GP40051) в сравнении с оригинальным препаратом Хумулин® Регуляр.

Материалы и методы. Первичная структура была исследована методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации. Идентичность более высоких белковых структур была доказана методами кругового дихроизма, капиллярного изофокусирования, спектрометрии и динамического рассеяния света. Сопоставимость профилей примесей препаратов оценивали при помощи методов эксклюзионной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Функциональная характеризация включала в себя метаболический клеточный тест «захват глюкозы» и анализы связывания с рецептором инсулина (кинетика связывания с рецепторами типа А и В, фосфорилирование инсулинового рецептора).

Результаты и обсуждение. В ходе данной работы была показана идентичность физико-химических и функциональных характеристик GP40051. Между препаратом сравнения GP40051 и референтным препаратом Хумулин® Регуляр было продемонстрировано полное совпадение первичной последовательности, структур высокого порядка и профилей примесей. Функциональные исследования показали, что GP40051 и Хумулин® Регуляр обладают одинаковой активностью.

Заключение. По результатам исследования подтверждена аналитическая биосимилярность препарата Ринсулин® Р (GP40051) оригинальному препарату Хумулин® Регуляр, что обеспечило научную основу для проведения специально разработанной клинической программы, и явилось основанием для регистрации в РФ.

Ключевые слова: аналитическая сопоставимость, биоаналог, биосимиляр, генно-инженерный инсулин человека, ГИИЧ

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

Вклад авторов. А. В. Бабина, И. Е. Макаренко осуществляли разработку программы исследования. В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, П. Г. Заикин, В. И. Шмурак, Т. Э. Елтышева являются исполнителями исследования. Все авторы проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Спонсор данного исследования ООО «ГЕРОФАРМ».

Для цитирования: Бабина А. В., Драй Р. В., Сапарова В. Б., Афанасьева А. Н., Заикин П. Г., Шмурак В. И., Елтышева Т. Э., Макаренко И. Е. Физико-химическая и функциональная характеризация лекарственного препарата Ринсулин® Р. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):124–134. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-124-134

Physicochemical and Functional Characterization of Medicinal Product Rinsulin® R

Anna V. Babina✉, Roman V. Drai, Valerya B. Saparova, Alina N. Afanasyeva, Pavel G. Zaikin, Vladimir I. Shmurak, Tatyana E. Eltysheva, Igor E. Makarenko

CJSC "Pharm-Holding", 34-A, Svyazi str., Strel'na settlement, Saint-Petersburg, 198515, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna V. Babina. **E-mail:** Anna.Babina@geropharm.com

© Бабина А. В., Драй Р. В., Сапарова В. Б., Афанасьева А. Н., Заикин П. Г., Шмурак В. И., Елтышева Т. Э., Макаренко И. Е., 2023
© Babina A. V., Drai R. V., Saparova V. B., Afanasyeva A. N., Zaikin P. G., Shmurak V. I., Eltysheva T. E., Makarenko I. E., 2023

ORCID: Anna V. Babina – https://orcid.org/0000-0003-3024-4009; Roman V. Drai – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097; Valerya B. Saparova – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129; Alina N. Afanasyeva – https://orcid.org/0000-0002-1443-4294; Pavel G. Zaikin – https://orcid.org/0009-0008-8467-9781; Vladimir I. Shmurak – https://orcid.org/0000-0003-0282-9843; Tatyana E. Eltysheva – https://orcid.org/0000-0002-1931-9455; Igor E. Makarenko – https://orcid.org/0000-0003-2308-0608.

Received: 10.08.2022 **Revised:** 19.05.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Currently, biosimilars have found quite widespread use in the treatment of a number of chronic and life-threatening diseases. Thanks to them, there is a significant decrease of the economic pressure of biological drugs on the health care system and wide access of patients to effective and safe medicines is ensured. One of the most important stages of proving biosimilarity is the physicochemical and functional characterization of proteins. This set of studies is generally accepted, as sensitive as possible and allows us to give a conclusion about the compliance of the biosimilar with the original drug.

Aim. Conducting physicochemical and functional characterization of medicinal product Rinsulin® R (GP40051) in comparison with the original drug Humulin® Regular.

Materials and methods. Primary structure was analyzed by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection and matrix assisted laser desorption/ionization. The identity of the higher protein structures was proved by the methods of circular dichroism, capillary isoelectric focusing, spectrometry and dynamic light scattering. The comparability of the impurity profiles of the preparations was evaluated using the methods of exclusive chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography. Functional characterization included a metabolic cell test "glucose uptake" and insulin receptor–binding assay (kinetics of binding to type A and B receptors, phosphorylation of insulin receptor).

Results and discussion. In the course of this research, the identity of the physicochemical and functional characteristics of GP40051 was shown. A complete overlap of primary sequence, high-order structures and impurity profiles was demonstrated between the comparison drug GP40051 and the reference drug Humulin® Regular. Functional studies have shown that GP40051 and Humulin® Regulars have the same activity.

Conclusion. The results of the quality comparability study demonstrated similarity of Rinsulin® R to the reference medicinal product Humulin® Regular, providing the scientific basis for conducting a specifically designed clinical programme, and supported registration in Russian Federation.

Keywords: analytical comparability, biosimilar, genetically engineered human insulin

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

Contribution of the authors. Anna V. Babina, Igor E. Makarenko carried out the development of the research program. Valerya B. Saparova, Alina N. Afanasyeva, Pavel G. Zaikin, Vladimir I. Shmurak, Tatyana E. Eltysheva are reseachers. All authors interpreted the results. All the authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. The sponsor of this study is LLC "GEROPHARM".

For citation: Babina A. V., Drai R. V., Saparova V. B., Afanasyeva A. N., Zaikin P. G., Shmurak V. I., Eltysheva T. E., Makarenko I. E. Physicochemical and functional characterization of medicinal product Rinsulin® R. *Drug development & registration*. 2023;12(2):124–134. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-124-134

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря достижениям в области биотехнологий стало возможным разрабатывать специализированные препараты, используемые в различных областях медицины, таких как эндокринология, ревматология, дерматология, гастроэнтерология и онкология [1]. Их появление значительно изменило прогноз многих тяжелых заболеваний. Создание биофармацевтических препаратов сопряжено с высокими затратами на разработку, производство, оборудование, клинические и неклинические испытания. Вследствие чего они становятся менее доступны широкому потребителю. Эту проблему решает разработка биосимиляров. Биоаналоги имеют более короткий срок утверждения, а стоимость разработки может составлять 10–20 % от стоимости инновационного препарата [2]. Благодаря этому препараты выпускаются по сниженным ценам по сравнению с эталонными, что обычно приводит к снижению стоимости биологического лечения в целом без снижения качества медицинской помощи, тем самым оказывая чистый положительный эффект на устойчивость здравоохранения [3].

По определению *биосимиляр* – это биологический лекарственный препарат, который содержит версию действующего вещества, зарегистрированного биологического оригинального препарата, и для которого продемонстрировано сходство (подобие) на основе сравнительных исследований с оригинальным средством по показателям качества, функциональной активности, эффективности и безопасности [4]. Создание подобных препаратов является жестко регулируемым процессом, регламенти-

руемым большим количеством как российских, так и зарубежных руководств, таких как Решение ЕЭК[1], руководства FDA[2], EMA[3, 4, 5], ICH[6].

В отличие от генериков лекарственных препаратов, где воспроизведение лекарственной структуры является относительно простой задачей, доказательство структуры биологических препаратов значительно затруднено. В первую очередь это обусловлено размерами биоаналогов, которые превосходят генерики в сотни, а нередко и в тысячи раз. С увеличением молекулы приходит усложнение строения и появление вариантов пространственной укладки, что также требует полного подтверждения сопоставимости [5]. Это накладывает отпечаток на взаимосвязь структуры и функции. Усложнение строения влечет за собой снижение стабильности и сильную подверженность внешним влияниям [6].

Как правило, терапевтические белки производятся в живых системах, например *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*. Благодаря чему крупные, более 80 кДА молекулы, всегда обладают большой вариабельностью и точное повторение их структуры не всегда возможно [7–9]. Это объясняется явлением микрогетерогенности, возникающим вследствие модификации клеткой-продуцентом (гликозилирование, протеолиз и т. д.), особенностей условий процесса (окисление, дезаминирование), реакций со вспомогательными веществами, частичной денатурации и агрегации [2, 10, 11]. Дальнейшая гетерогенность может возникнуть, если белок намеренно модифицирован, например путем многоузлового пегилирования [12]. Исходя из этого, даже высокоочищенные белки никогда не состоят из одного молекулярного образования, а представляют собой смеси многих близкородственных молекулярных соединений [6]. При этом вариабельность наблюдается даже в оригинальном препарате от серии к серии [11]. Таким образом, принцип молекулярной идентичности, который используется при разработке генериков, не применим к биологическим лекарственным средствам.

Мономер инсулина состоит из 51 аминокислотного остатка, то есть его молекулярная масса составляет около 5,8 кДа [13]. Такие сравнительно небольшие размеры белка позволяют стабилизировать его производственный процесс и получать максимально идентичные молекулы.

Учитывая данные особенности биологических препаратов, становится необходимым утверждение их сходства с эталонным лекарственным средством как с точки зрения физико-химических, так и функциональных свойств. Аналитическое сходство структурных и функциональных показателей имеет решающее значение и для того, чтобы мы могли предполагать отсутствие значимых различий в клинических результатах [14, 15].

Таким образом, при планировании и проведении любого исследования сопоставимости необходимо соблюдение ряда принципов, без которых невозможно объективно оценить сходство или различие испытуемых препаратов [15–17]:

1. Характеризация должна быть всесторонней и включать как физико-химические, так и функциональные показатели.
2. Использование специфичных и чувствительных методик.
3. Достаточность методов исследования.
4. Анализ препаратов проводится параллельно в одном эксперименте.
5. Необходимо оценить вариативность продукта.
6. Использование ортогональных методов.

Полная панель аналитических методов насчитывала более 20 показателей качества. В настоящей статье представлены наиболее показательные и информативные результаты.

Цель

Проведение физико-химической и функциональной характеризации препарата Ринсулин® Р в сравнении с оригинальным препаратом Хумулин® Регуляр.

[1] Решение № 89 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», глава 15.7 «Доклиническая и клиническая разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd_21112016_89. Ссылка активна на 23.06.2022.

[2] Guidance for Industry: Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations. Available at: https://www.fda.gov/media/125484/download. Accessed: 23.06.2022.

[3] Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products-containing_en-0.pdf. Accessed: 23.06.2022.

[4] Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf. Accessed: 23.06.2022.

[5] Reflection paper on statistical methodology for the comparative assessment of quality attributes in drug development. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-statistical-methodology-comparative-assessment-quality-attributes-drug-development_en.pdf. Accessed: 23.06.2022.

[6] ICH Topic Q 5 E Comparability of Biotechnological/Biological Products. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-e-comparability-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf. Accessed: 23.06.2022.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты

Объектом исследования аналитической сопоставимости в качестве тестируемого препарата выступил Ринсулин® Р (GP40051), раствор для инъекций, 100 МЕ/мл. Это препарат, содержащий в качестве активной фармацевтической субстанции генно-инженерный инсулин человека, разработанный ООО «ГЕРОФАРМ» (Россия). Разработка GP40051 была проведена в R&D центре ООО «ГЕРОФАРМ» (ЗАО «ФармХолдинг»). Полный цикл производства осуществляется на принадлежащем ООО «ГЕРОФАРМ» заводу в России.

В качестве референтного был использован Хумулин® Регуляр, раствор для инъекций, 100 МЕ/мл, производства Lilly France (Франция). Препарат был приобретен у местных дистрибьюторов и хранился в соответствии с инструкциями производителя.

Оценка аналитической сопоставимости включала анализ в общей сложности 9 серий Ринсулин® Р (GP40051) и 6 серий Хумулин® Регуляр.

Структура белка

Первичная структура. Определение массы нативного белка и его субъединиц проводили с использованием MALDI-времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker, США). Для получения спектров цепей инсулина молекулярные массы были проанализированы путем получения спектров образцов после восстановления дисульфидных связей дитиотреитолом. Протеолиз белка осуществлялся при помощи ферментативного гидролиза эндопротеиназой Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки составляла 0,003 % (30ppm).

Первичная структура инсулина в GP40051 и Хумулин® Регуляр была подтверждена сравнительным пептидным картированием. Этот подход обеспечил полный охват аминокислотной последовательности. Картирование проводилось в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на масс-спектрометре Varian 500-MS IT (ионная ловушка) и хроматографе Waters ACQUITY UPLC с использованием колонки Waters ACQUITY BEH300 C18, 2.1 × 50 мм. Регистрируемые длины волн – 205 и 280 нм. Для предотвращения дисульфидного обмена ферментативный гидролиз инсулина протеазой V8 проводился в кислой среде.

Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Германия). При помощи программы Biotools 3.2 (Bruker Daltonics GmbH, Германия) (опция «пептидный фингерпринт») провели идентификацию в локальной базе.

Высшие структуры. Вторичная структура GP40051 была охарактеризована с помощью спектроскопии кругового дихроизма (178–260 нм). Эксперименты проводились на спектрометре Chirascan CD Spectrometer (Applied Photophysics Ltd., Англия). Измерение исследуемых образцов проводилось в 3 повторениях. Перед проведением анализа препараты инсулина были обессолены. Обработка полученных данных осуществлялась в программах Origin 8.1 и MS Excel 2016, усреднены и сглажены по методу Савитского – Голея.

Для анализа третичной структуры использовалась оценка флуоресценции спектрофотометрическим методом. Измерения проводили на спектрофлуориметре FluoroMax Plus (HORIBA Scientific, Франция – Япония) и спектрофотометре Carry 300 Bio (Varian Australia Pty Ltd., Австралия) в пределах 250–300 нм. Так как в исследуемом веществе присутствуют аминокислотные остатки тирозина, в качестве стандартного раствора сравнения был выбран раствор тирозина, спектры поглощения и флуоресценции которого практически совпадают с спектрами исследуемого вещества. В качестве ортогонального метода, характеризующего третичную структуру белка, был использован метод капиллярного изофокусирования.

Полидисперсность и гидродинамические параметры образцов были изучены методом динамического рассеяния света (DLS) посредством лазерного анализатора размера частиц Zetasizer Nano (Malvern Panalytical, Великобритания).

Определение родственных примесей

Характеристика примесей с молекулярной массой, превышающей молекулярную массу инсулина (высокомолекулярные белки), проводилась методом эксклюзионной жидкостной хроматографии. Для эксперимента была выбрана колонка Insulin HMWP (Waters Corporation, США) (300 × 7,8 мм, размер частиц 10 мкм, диаметр пор 125 Å). Детектирование осуществлялось на жидкостном хроматографе LC-30 Nexera (Shimadzu, Япония) при температуре колонки 25 °C со скоростью потока 0,5 мл/мин в течение 35 мин. Спектры снимались при длине волны 276 нм.

Для идентификации A21-дезамидоинсулина и других родственных примесей был выбран метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Разделение проводили в колонке Luna C18(2) (Phenomenex, США) (250 × 4,6 мм, C18, размер частиц 5 мкм, диаметр пор 100 Å) при температуре 40 °C со скоростью потока 1,0 мл/мин в течение 50 мин.

Функциональная характеризация in vitro

Исследование кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия с рецепторами IR-A и IR-B проводили с использованием метода безмаркерной интерферометрии на планшетном интерферометре Octet RED96. Анализ основан на оценке равновесной константы KD в сравнительном аспекте между исследуе-

мыми препаратами. Для оценки связывания готовили растворы инсулинового рецептора типа А и типа В в одинаковой концентрации. Перед выполнением анализа сенсоры гидратировали в фосфатно-солевом буфере.

Фосфорилирование инсулинового рецептора проводили на клеточной линии миоцитов L6J1, дифференцированных в миотубулы, методом Вестерн-блоттинга (Western blot). Поскольку данный метод является полуколичественным, статистическую обработку данных не проводили. В качестве критерия приемлемости использовали наличие специфического дозозависимого отклика.

Метаболический тест «захват глюкозы» был проведен на клеточной линии миоцитов L6J1, дифференцированных в миотубулы, как было описано ранее [18]. Стимуляция захвата глюкозы проводилась посредством внесения в лунки испытуемых образцов инсулина человека. Измерение концентрации глюкозы проводили при помощи набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP (ООО НПФ «АБРИС+», Россия). Количество поглощенной глюкозы в % оценивали как разность между концентрациями глюкозы в культуральной среде клеток, обработанных препаратами инсулина, и контрольных клеток.

Статистическая обработка данных

Итоговый анализ данных проводили с использованием метода ±3SD. При нормальном гауссовском распределении он включает в себя >99 % всей генеральной совокупности и, таким образом, полученные значения могут быть экстраполированы на все серии препарата. Интервальные границы ±3SD от среднего значения референтных препаратов были использованы для оценки сопоставимости исследуемого препарата. В тех случаях, где оценка диапазона, основанная на среднем ±3SD, не была приемлема, как, например, в случае подтверждения молекулярной массы, был применен заранее определенный диапазон.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Детальная структурная характеризация GP40051 и Хумулин® Регуляр была выполнена с использованием современных аналитических методов, которые предоставили информацию о первичных, вторичных и высших структурах, а также о родственных примесях. В таблице 1 представлены краткие результаты физико-химического исследования.

Первичная структура и молекулярная масса

Одним из общих требований, предъявляемым к биоаналогичным препаратам, является соответствие первичной структуры эталонному лекарственному средству [14]. Методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) были подтверждены массы интактного белка и цепей А и В GP40051 и эталонного инсулина с точностью до ±0,03 % (см. таблицу 1). Средние молекулярные массы, полученные в результате этих экспериментов, были идентичны теоретически рассчитанным для всех исследуемых продуктов.

Аминокислотная последовательность была определена при помощи пептидного картирования путем протеолитического расщепления полипептидов с последующим сравнением. В 100 % измерений была показана полная сопоставимость образуемых фрагментов. В таблице 1 представлены массы фрагментов, детектируемых после протеолиза белка в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. Во всех сериях препаратов произошло образование 9 прогнозируемых пептидов. В спектрах присутствовали сигналы масс 1376,5 Да, 2967,4 Да, 3365,4 Да, 4707,0 Да и 5806,5 Да, соответствующие заявленным дисульфидным связям. Также выявлены сигналы масс 866,5 Да, 1481,7 Да и 1886,8 Да, соответствующие фрагментам, содержащим цистеин. Их присутствие может быть обусловлено разрушением дисульфидной связи между цепями белка под воздействием ионизации. Все значения масс пептидов для GP40051 были аналогичны значениям для Хумулина® Регуляр.

Наложение профилей хроматографических пиков после проведения гидролиза инсулина протеазой V8 демонстрировало высокое сходство между препаратами (рисунок 1).

Основываясь на результатах пептидного картирования и аминокислотной последовательности инсулина в GP40051 и Хумулин® Регуляр можно судить о идентичности их первичной структуры.

Анализ высоких структур белка

От правильности дальнейшей упаковки пептидной цепи в пространственные структуры зависит то, какими функциональными и иммунологическими свойствами будет обладать данный белок. Оценка вторичных структурных элементов производилась путем снятия спектров кругового дихроизма (рисунок 2) с дальнейшим вычислением процентного содержания компонентов (см. таблицу 1).

После расчета интервальных границ ±3SD в обеих группах исследованных образцов GP40051 и Хумулин® Регуляр была продемонстрирована сходная склонность к образованию как спиралей, так и слоев.

Информация о структурах более высокого порядка была получена с использованием нескольких ортогональных методов, включая метод флуоресценции, капиллярное изоэлектрофокусирование и DLS.

Для характеризации третичной структуры и уточнения пространственного расположения отдельных аминокислотных остатков были сняты спектры флуоресценции стандартного раствора тирозина и исследуемых образцов (рисунок 3).

Таблица 1. Физико-химическая характеризация

Table 1. Physico-chemical characterization

Атрибут **Attribute**	**Аналитический метод** **Analytical method**	**GP40051**	**Хумулин® Регуляр** **Humulin® Regular**
Первичная структура *Primary structure*			
Масса нативного белка Intact protein mass	МАЛДИ MALDI	5804,6 Да ± 0,003 % 5804.6 Da ± 0.003 %	5804,6 Да ± 0,003 % 5804.6 Da ± 0.003 %
Масса А цепи A-chain mass	МАЛДИ MALDI	2383,0 Да ± 0,003 % 2383,0 Da ± 0.003 %	2383,0 Да ± 0,003 % 2383.0 Da ± 0.003 %
Масса В цепи B-chain mass	МАЛДИ MALDI	3428,7 Да ± 0,003 % 3428.7 Da ± 0.003 %	3428,7 Да ± 0,003 % 3428.7 Da ± 0.003 %
Первичная структура Primary structure	Пептидное картирование Peptide mapping	416,2 Да ± 0,003% 416.2 Da ± 0.003%	416,2 Да ± 0,003 % 416.2 Da ± 0.003 %
		1115,6 Да ± 0,003 % 1115.6 Da ± 0.003 %	1115,6 Да ± 0,003 % 1115.6 Da ± 0.003 %
		2967,4 Да ± 0,003 % 2967.4 Da ± 0.003 %	2967,4 Да ± 0,003 % 2967.4 Da ± 0.003 %
		1376,5 Да ± 0,003 % 1376.5 Da ± 0.003 %	1376,5 Да ± 0,003 % 1376.5 Da ± 0.003 %
		3365,4 Да ± 0,003 % 3365.4 Da ± 0.003 %	3365,4 Да ± 0,003 % 3365.4 Da ± 0.003 %
		1489,7 Да ± 0,003 % 1489.7 Da ± 0.003 %	1489,7 Да ± 0,003 % 1489.7 Da ± 0.003 %
		512,1 Да ± 0,003 % 512.1 Da ± 0.003 %	512,1 Да ± 0,003 % 512.1 Da ± 0.003 %
		1481,7 Да ± 0,003 % 1481.7 Da ± 0.003 %	1481,7 Да ± 0,003 % 1481.7 Da ± 0.003 %
		866,5 Да ± 0,003 % 866.5 Da ± 0.003 %	866,5 Да ± 0,003 % 866.5 Da ± 0.003 %
		5806,5 Да ± 0,003 % 5806.5 Da ± 0.003 %	5806,5 Да ± 0,003 % 5806.5 Da ± 0.003 %
Аминокислотная последовательность Amino acid sequence	Пептидное картирование Peptide mapping	Подтверждена Confirmed	Подтверждена Confirmed
Структуры высокого порядка *Higher order structure*			
Вторичная структура The secondary structure	Круговой дихроизм Circular dichroism spectroscopy	α-спираль 39–42 % α-helix 39–42 %	α-спираль 40–42 % α-helix 40–42 %
		β-слой 18–19 % β-sheet 18–19 %	β-слой 11–16 % β-sheet 11–16 %
Изоэлектрическая точка Isoelectric point	Капиллярное изоэлектрофокусирование Capillary isoelectrofocusing	6,2	6,2
Квантовый выход флуоресценции Fluorescence quantum yield	Спектрофотометрия Spectrophotometry	0,11–0,14	0,11–0,13
Пик распределения частиц Peak of particle distribution	Динамическое рассеяние света Dynamic light scattering	3,80–4,30 нм 3.80–4.30 nm	3,90–4,50 нм 3.90–4.50 nm
Родственные примеси *Product-related impurities*			
Содержание ВМБ The content of HMP	Эксклюзионная хроматография Exclusive chromatography	0,16–0,20 %	0,09–0,21 %
A21-дезамидоинсулин A21-deamidoinsulin	Обращенно-фазная ВЭЖХ Reversed-phase chromatography	0,16–0,18 %	0,21–0,24 %

Примечание. Представлены минимальные и максимальные показатели для каждого из исследуемых препаратов.

Note. The minimum and maximum values for each of the studied drugs are presented.

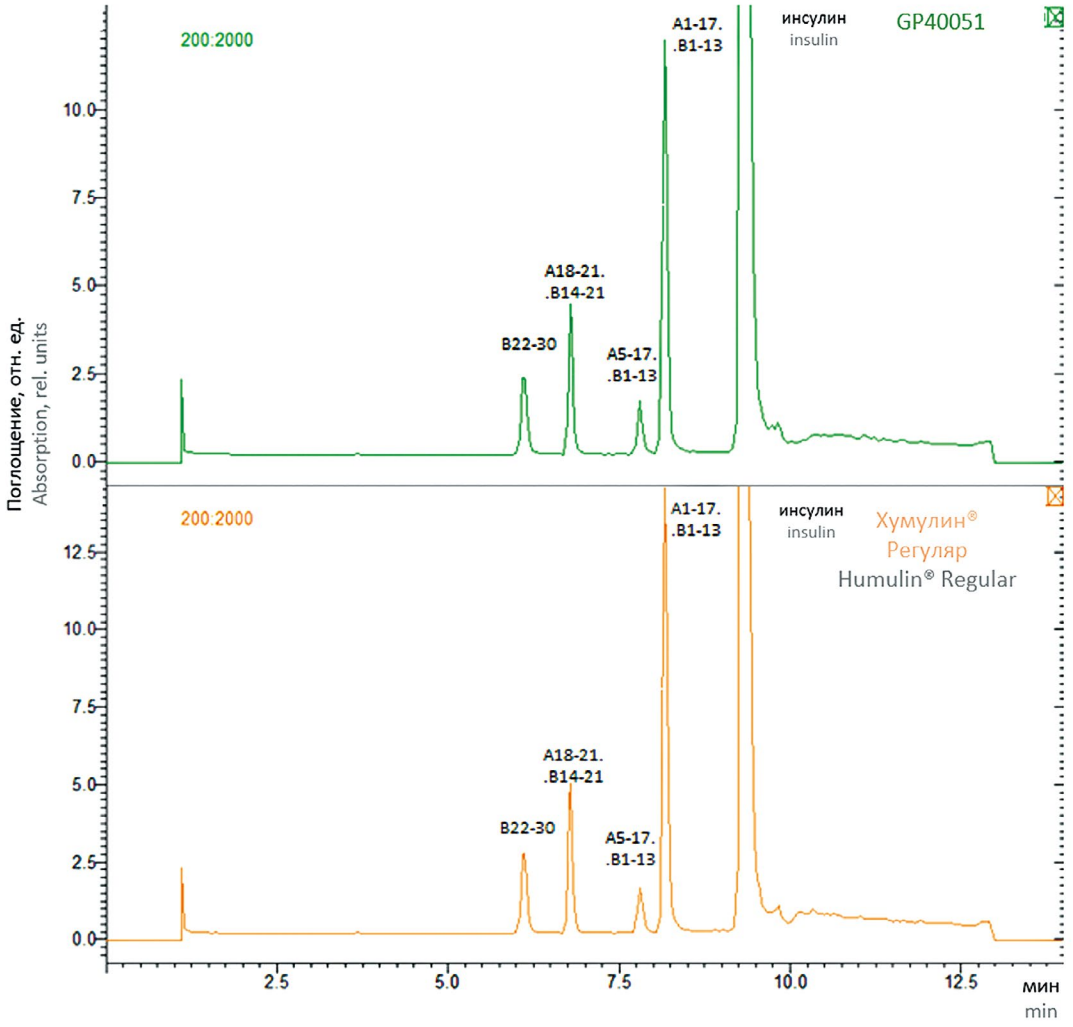


Рисунок 1. **Хроматограммы продуктов гидролиза инсулина в невосстанавливающих условиях**

Figure 1. **Chromatograms of insulin hydrolysis products under non-reducing conditions**

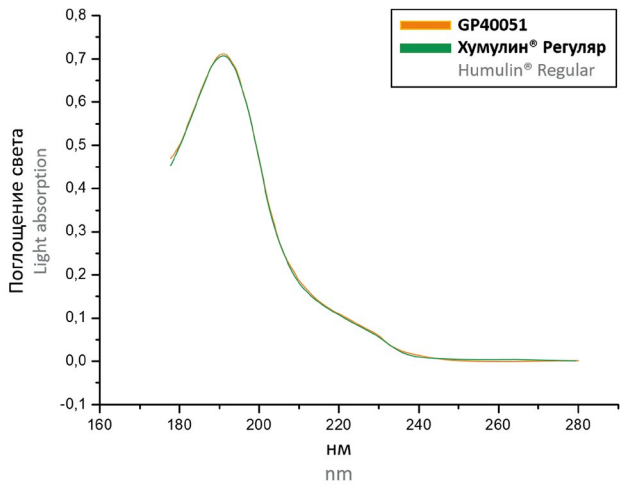


Рисунок 2. **Сравнение поглощения света в препаратах GP40051 и Хумулин® Регуляр**

Figure 2. **Comparison of light absorption in GP40051 and Humulin® Regular**

Исходя из расчетов, обобщенные квантовые выходы препаратов (см. таблица 1) сопоставимы с квантовым выходом чистого тирозина и между собой (диапазон допустимых значений 0,09–0,15 Flu). Таким образом, можно предположить, что остатки тирозина действительно расположены на поверхностных областях молекулы, а анализируемые белки имеют сопоставимую третичную структуру. Это факт так же подтверждается данными капиллярного изоэлектрофокусирования, продемонстрировавшими идентичные значения изоэлектрической точки для GP40051 и Хумулин® Регуляр, равные 6,2 pI (см. таблицу 1).

С помощью графиков зависимости интенсивности рассеяния от гидродинамического диаметра частиц методом DLS были определены гидродинамические диаметры препаратов и пики распределения частиц (рисунок 4, см. таблицу 1).

При вычислении статистических параметров было получено полное перекрытие значений GP40051

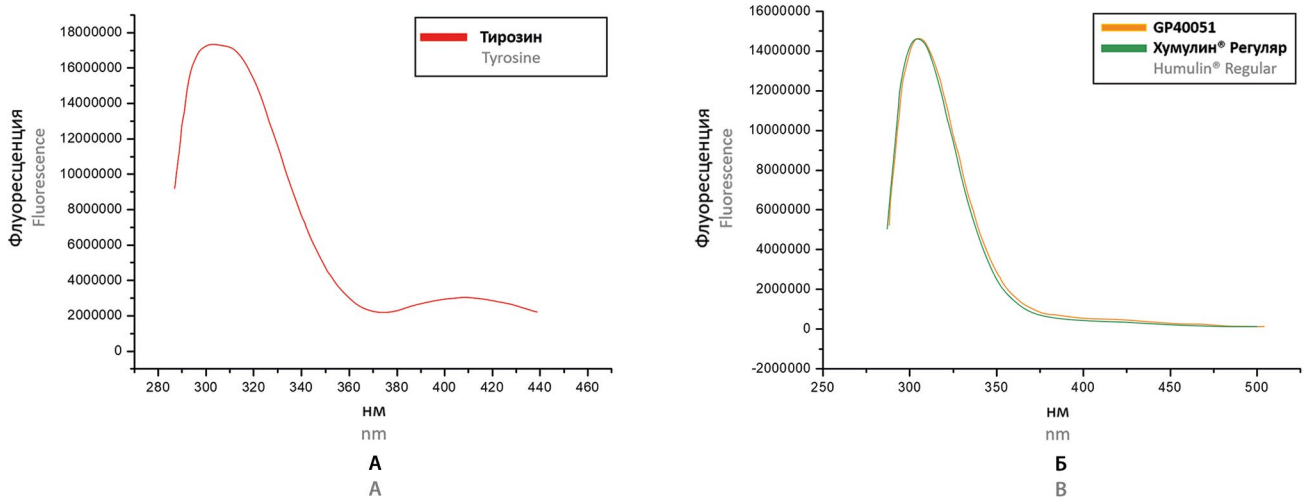


Рисунок 3. **Спектры флуоресценции:**
А – тирозин; Б – GP40051 и Хумулин® Регуляр

Figure 3. **Fluorescence spectra:**
A – tyrosine; B – GP40051 and Humulin® Regular

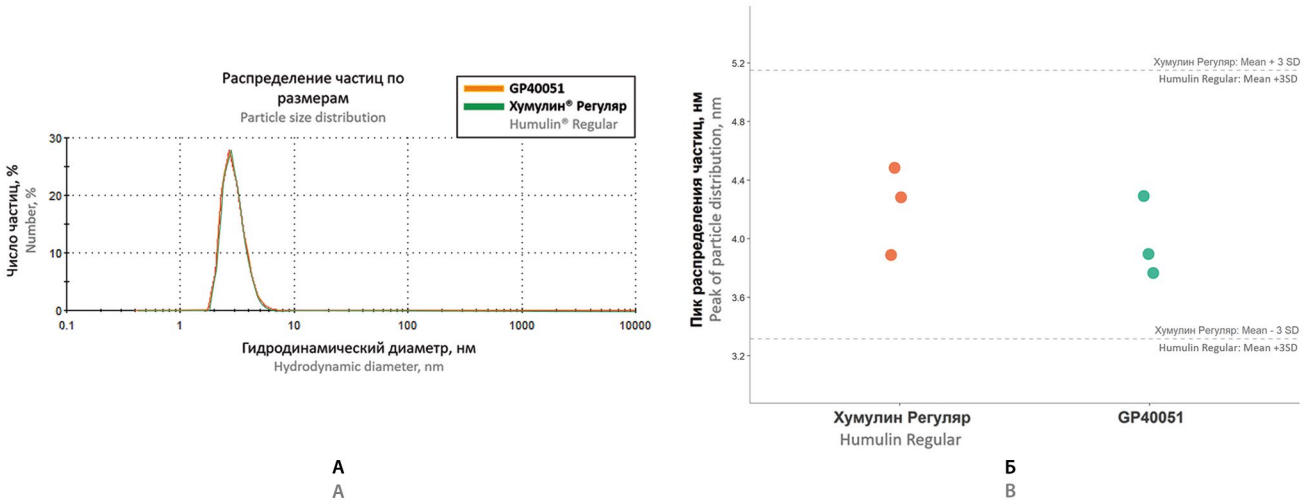


Рисунок 4. **Результаты определения гидродинамических параметров:**
А – гистограмма зависимости числа частиц от гидродинамического диаметра; Б – точечное распределение значений пика распределения частиц

Figure 4. **Results of determination of hydrodynamic parameters:**
A – histogram of the dependence of the number of particles on the hydrodynamic diameter; B – point distribution of the values of the particle distribution time

диапазоном допустимых значений (3,32–5,15 нм), что может служить косвенным подтверждением сопоставимости четвертичных структур исследуемых белков.

Определение родственных примесей

Содержание родственных примесей это один из важнейших параметров качества и стабильности лекарственных препаратов. Повышенное содержание примесей потенциально может повлиять как на эффективность, так и на безопасность препарата. На рисунке 5 представлены данные ВЭЖХ.

По результатам анализа препараты полностью сопоставимы по содержанию ВМБ. Однако были выявлены отличия в процентном содержании А21-дезамидоинсулина. Учитывая, что значения исследуемого препарата оказались ниже допустимого диапазона значений (0,16 %, допустимый диапазон 0,17–0,27 %), это свидетельствует о чуть более чистом составе GP40051 и не снижает качества препарата.

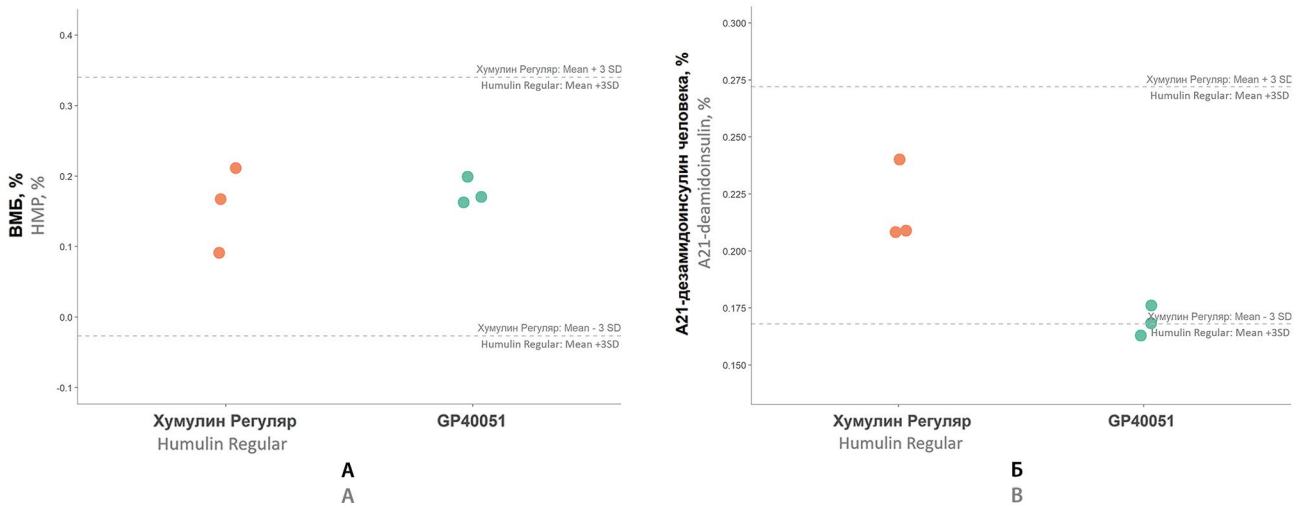


Рисунок 5. **Родственные примеси:**
А – высокомолекулярные белки (ВМБ); Б – А21-дезамидоинсулин

Figure 5. **Related impurities:**
A – high-molecular impurities; B – A21-deamidoinsulin

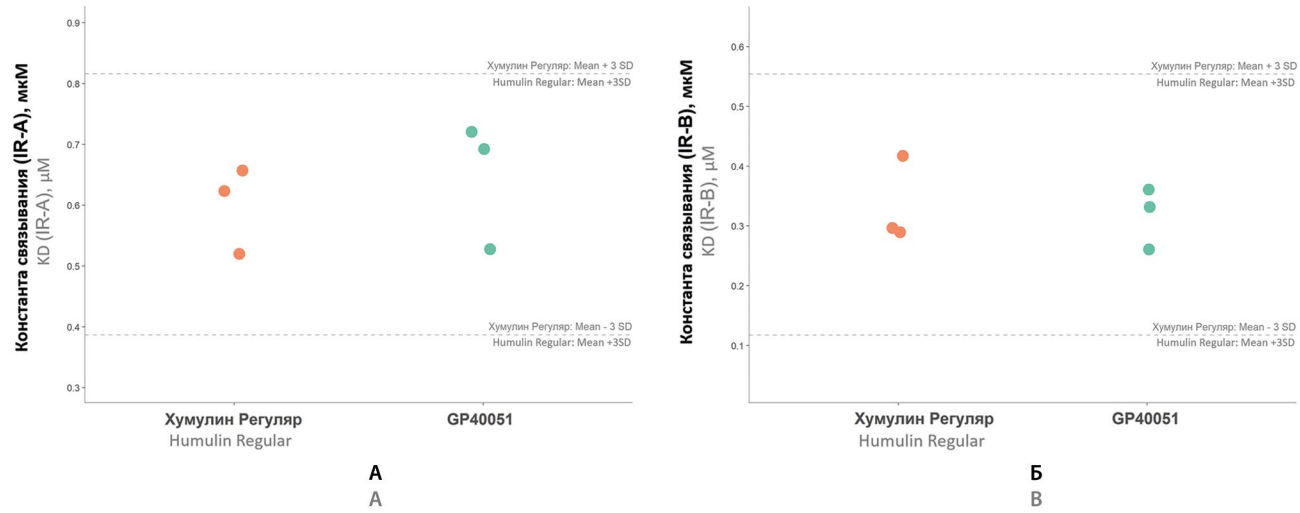


Рисунок 6. **Значения равновесной константы связывания (KD) с инсулиновыми рецепторами типа А (А) и типа В (Б)**

Figure 6. **Values of the affinity constant (KD) with insulin receptors of type A (A) and type B (B)**

Функциональная характеризация

Согласно правилам организации исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза[1], функциональная характеризация препаратов проводилась на двух уровнях: аутофосфорилирование рецептора и метаболическая активность. Обе группы препаратов продемонстрировали идентичную способность к связыванию и активность в клеточных тестах *in vitro*.

Результаты исследования кинетики связывания с рецепторами инсулина IR-A и IR-B представлены на рисунке 6. Была оценена равновесная константа KD между ассоциацией и диссоциацией комплексов «препарат-рецептор».

Значения для GP40051 полностью вошли в диапазоны допустимых значений, рассчитанные по показателям оригинального препарата, что свидетельствует о сопоставимости серий GP40051 и Хумулин® Регуляр.

[1] Решение № 89 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», глава 15.7 «Доклиническая и клиническая разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd_21112016_89. Ссылка активна на 23.06.2022.

Для оценки клеточного ответа на связывание инсулина с рецептором был проведен тест фосфорилирование инсулинового рецептора (рисунок 7). В отличие от метода безмаркерной интерферометрии клеточная стенка имеет заряд, с которым взаимодействуют заряженные части молекулы инсулина. При неправильном сворачивании белковой молекулы возможно изменение заряда, приводящее к отсутствию связывания. И как следствие его реализации в виде фосфорилирования инсулинового рецептора, выражающееся на рисунке в появлении сигнала.

Чем больше концентрация инсулинов, тем сильнее детектируемый ответ. Таким образом, по результатам определения была установлена сопоставимая для всех серий GP40051 и Хумулин® Регуляр специфическая дозозависимая способность активировать (фосфорилировать) инсулиновый рецептор.

Показатели относительной метаболической активности оценивались в клеточном тесте «захват глюкозы» (рисунок 8).

Исходя из результатов точеченого распределения, а также кривой «доза-эффект», можно судить о полной сопоставимости полученных значений EC_{50} между сериями препаратов GP40051 и Хумулин® Регуляр.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было проведено обширное сравнительное физико-химическое и функциональное исследование препаратов Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр.

Исследование было разработано для всестороннего изучения критических показателей белка. Были проведены тесты, направленные на детальный анализ первичной структуры, структур более высокого порядка и содержания примесей. В соответствии с регуляторными требованиями для каждого из физико-химических атрибутов было использовано несколько ортогональных методов, благодаря чему были получены максимально информативные данные, позволившие сделать вывод об идентичности молекул. Также акцент был сделан на изучении функциональной характеризации препаратов, основанной на механизме действия инсулина. Изучение проводилось на уровне рецептора и метаболической активно-

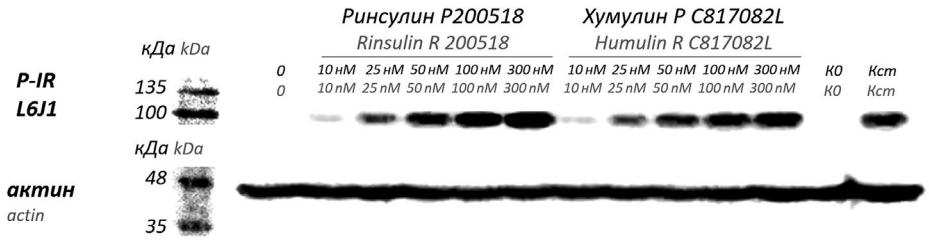


Рисунок 7. Результаты изучения фосфорилирования инсулинового рецептора (GP40051/Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр)

Figure 7. Results of the study of phosphorylation of the insulin receptor (GP40051/Rinsulin® R and Humulin® Regular)

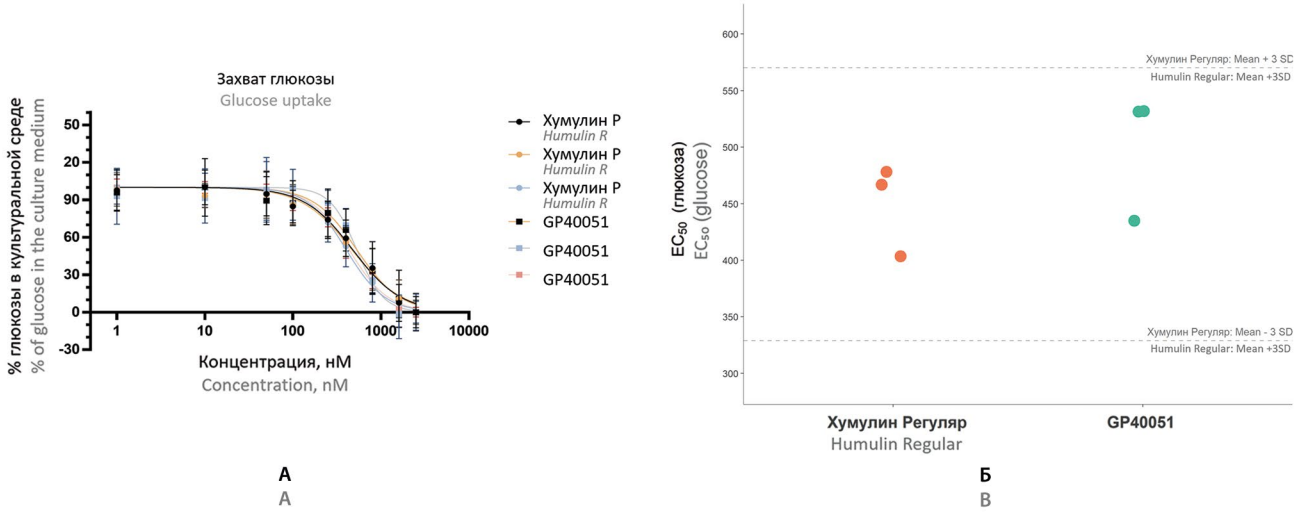


Рисунок 8. Результаты метаболического теста «захват глюкозы» (клетки L6J1):
А – график кривой «доза-эффект»; Б – точечное распределение EC_{50}

Figure 8. Results of the metabolic test "glucose capture" (L6J1 cells):
A – graph of "dose-effect" curve; B – point distribution of EC_{50}

сти, что исчерпывающе отвечает на вопрос о функциональной состоятельности GP40051.

Благодаря небольшим размерам и отсутствию вариабельности инсулин является одной из немногих молекул, которую можно охарактеризовать в мельчайших деталях и доказать полную биосимилярность, что и было продемонстрировано в данной работе.

По результатам проведенных исследований была показана полная идентичность между сериями препаратов Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр. В дальнейшем полученные данные легли в основу комплекта документов, необходимых для получения разрешения на проведение клинического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zalcberg J. Biosimilars are coming: ready or not. *Internal Medicine Journal*. 2018;48(9):1027–1034. DOI: 10.1111/imj.14033.
2. Agbogbo F. K., Ecker D. M., Farrand A., Han K., Khoury A., Martin A., McCool J., Rasche U., Rau T. D., Schmidt D., Sha M., Treuheit N. Current perspectives on biosimilars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2019;46(9–10):1297–1311. DOI: 10.1007/s10295-019-02216-z.
3. de Mora F. Biosimilars: A Value Proposition. *BioDrugs*. 2019;33(4): 353–356. DOI: 10.1007/s40259-019-00360-7.
4. Бабенко А. Ю., Драй Р. В., Каронова Т. Л., Макаренко И. Е. Подходы доказательной медицины при разработке и регистрации фармакологических препаратов для лечения сахарного диабета. *Русский медицинский журнал*. 2018;1(I):48–54.
5. Dranitsaris G., Amir E., Dorward K. Biosimilars of biological drug therapies: regulatory, clinical and commercial considerations. *Drugs*. 2011;71(12):1527–1536. DOI: 10.2165/11593730-000000000-00000.
6. Kresse G. B. Biosimilars – science, status, and strategic perspective. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;72(3):479–486. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.02.014.
7. Шестакова М. В., Викулова О. К. Биосимиляры: презумпция «виновности». *Сахарный диабет*. 2011;14(4):91–99.
8. Harvey R. D. Science of Biosimilars. *Journal of Oncology Practice*. 2017;13(9):17–23. DOI: 10.1200/JOP.2017.026062.
9. Tariman J. D. Biosimilars: Exploring the History, Science, and Progress. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2018;22(5):5–12. DOI: 10.1188/18.CJON.S1.5-12.
10. Jenkins N., Murphy L., Tyther R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Molecular Biotechnology*. 2008;39(2):113–118. DOI: 10.1007/s12033-008-9049-4.
11. Gámez-Belmonte R., Hernández-Chirlaque C., Arredondo-Amador M., Aranda C. J., González R., Martínez-Augustin O., Sánchez de Medina F. Biosimilars: *Concepts and controversies. Pharmacological Research*. 2018;133:251–264. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.01.024.
12. Caliceti P., Veronese F. M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(10):1261–1277. DOI: 10.1016/s0169-409x(03)00108-x.
13. Hossain M. A., Bathgate R. A. D. Challenges in the design of insulin and relaxin/insulin-like peptide mimetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(10):2827–2841 DOI: 10.1016/j.bmc.2017.09.030.
14. Soldatov A. A., Avdeeva J. I., Kryuchkov N. A., Skosyreva E. S. Safety concerns of biosimilar hormone products. *Current Medical Research and Opinion*. 2019;35(6):1003–1009. DOI: 10.1080/03007995.2018.1552041.
15. Kang H. N., Knezevic I. Regulatory evaluation of biosimilars throughout their product life-cycle. *Bulletin World Health Organization*. 2018;96(4):281–285. DOI: 10.2471/BLT.17.206284.
16. Ishii-Watabe A., Kuwabara T. Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2019;34(1):64–70. DOI: 10.1016/j.dmpk.2018.11.004.
17. Rahalkar H., Cetintas H. C., Salek S. Quality, Non-clinical and Clinical Considerations for Biosimilar Monoclonal Antibody Development: EU, WHO, USA, Canada, and BRICS-TM Regulatory Guidelines. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1079. DOI: 10.3389/fphar.2018.01079.
18. Афанасьева А. Н., Сапарова В. Б., Макаренко И. Е., Драй Р. В., Сельменских Т. А. Опыт проведения валидации *in vitro* методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):77–88. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-398.

REFERENCES

1. Zalcberg J. Biosimilars are coming: ready or not. *Internal Medicine Journal*. 2018;48(9):1027–1034. DOI: 10.1111/imj.14033.
2. Agbogbo F. K., Ecker D. M., Farrand A., Han K., Khoury A., Martin A., McCool J., Rasche U., Rau T. D., Schmidt D., Sha M., Treuheit N. Current perspectives on biosimilars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2019;46(9–10):1297–1311. DOI: 10.1007/s10295-019-02216-z.
3. de Mora F. Biosimilars: A Value Proposition. *BioDrugs*. 2019;33(4): 353–356. DOI: 10.1007/s40259-019-00360-7.
4. Babenko A. Yu., Drai R. V., Karonova T. L., Makarenko I. E. Evidence-based approaches for development and marketing authorization of diabetes drugs. *Russian medical journal*. 2018;1(I):48–54. (In Russ.)
5. Dranitsaris G., Amir E., Dorward K. Biosimilars of biological drug therapies: regulatory, clinical and commercial considerations. *Drugs*. 2011;71(12):1527–1536. DOI: 10.2165/11593730-000000000-00000.
6. Kresse G. B. Biosimilars – science, status, and strategic perspective. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;72(3):479–486. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.02.014.
7. Shestakova M. V., Vikulova O. K. Biosimilars: presumption of guilt. *Diabetes mellitus*. 2011;14(4):91–99. (In Russ.)
8. Harvey R. D. Science of Biosimilars. *Journal of Oncology Practice*. 2017;13(9):17–23. DOI: 10.1200/JOP.2017.026062.
9. Tariman J. D. Biosimilars: Exploring the History, Science, and Progress. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2018;22(5):5–12. DOI: 10.1188/18.CJON.S1.5-12.
10. Jenkins N., Murphy L., Tyther R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Molecular Biotechnology*. 2008;39(2):113–118. DOI: 10.1007/s12033-008-9049-4.
11. Gámez-Belmonte R., Hernández-Chirlaque C., Arredondo-Amador M., Aranda C. J., González R., Martínez-Augustin O., Sánchez de Medina F. Biosimilars: *Concepts and controversies. Pharmacological Research*. 2018;133:251–264. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.01.024.
12. Caliceti P., Veronese F. M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(10):1261–1277. DOI: 10.1016/s0169-409x(03)00108-x.
13. Hossain M. A., Bathgate R. A. D. Challenges in the design of insulin and relaxin/insulin-like peptide mimetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(10):2827–2841 DOI: 10.1016/j.bmc.2017.09.030.
14. Soldatov A. A., Avdeeva J. I., Kryuchkov N. A., Skosyreva E. S. Safety concerns of biosimilar hormone products. *Current Medical Research and Opinion*. 2019;35(6):1003–1009. DOI: 10.1080/03007995.2018.1552041.
15. Kang H. N., Knezevic I. Regulatory evaluation of biosimilars throughout their product life-cycle. *Bulletin World Health Organization*. 2018;96(4):281–285. DOI: 10.2471/BLT.17.206284.
16. Ishii-Watabe A., Kuwabara T. Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2019;34(1):64–70. DOI: 10.1016/j.dmpk.2018.11.004.
17. Rahalkar H., Cetintas H. C., Salek S. Quality, Non-clinical and Clinical Considerations for Biosimilar Monoclonal Antibody Development: EU, WHO, USA, Canada, and BRICS-TM Regulatory Guidelines. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1079. DOI: 10.3389/fphar.2018.01079.
18. Afanasyeva A. N., Saparova V. B., Makarenko I. E., Drai R. V., Selmenskikh T. A. Experimental validation of an *in vitro* method for assessing insulin-dependent glucose uptake. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):77–88. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-398.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-135-145
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Совместное определение нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров[1, 3], 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»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] ООО «ПРОМОМЕД РУС», 129090, Россия, г. Москва, пр-т Мира, д. 13 стр. 1
[3] Российский университет дружбы народов, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ **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: 01.02.2023 **Статья принята в печать:** 09.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. В настоящее время предполагается, что вирус SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), вызывающий новую коронавирусную инфекцию COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) останется постоянной глобальной угрозой. В связи с этим, вопрос разработки лекарственных препаратов для лечения COVID-19 остается актуальным. Комбинация нирматрелвира с ритонавиром обладает прямым противовирусным действием: при ее применении удается повысить эффективность терапии и снизить риск осложнений COVID-19. Разработка и валидация методики совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека является необходимой задачей для проведения аналитической части клинического исследования с целью дальнейшего изучения фармакокинетических параметров.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для дальнейшего изучения фармакокинетики.

Материалы и методы. Определение нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом. Внутренний стандарт: прометазин. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А), 0,1%-й муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Колонка: Phenomenex Luna C18 50 × 2,0 мм, 5 мкм. Аналитический диапазон методики: 50,00–10000,00 нг/мл для нирматрелвира, 5,00–1000,00 нг/мл для ритонавира в плазме крови. Источник ионизации и ионизация: электроспрей, положительная. Условия детектирования: 499,90 → 110,10 m/z, 499,90 → 319,20 m/z (нирматрелвир), 720,90 → 426,00 m/z, 720,90 → 296,20 m/z, 720,90 → 268,10 m/z, 720,90 → 197,10 m/z, 720,90 → 139,90 m/z (ритонавир), 285,15 → 198,05 m/z (прометазин).

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,00–10000,00 нг/мл для нирматрелвира, 5,00–1000,00 нг/мл для ритонавира в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований комбинированных препаратов нирматрелвира и ритонавира.

Ключевые слова: нирматрелвир, ритонавир, 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 нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):135–145. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-135-145

Simultaneous Determination of Nirmatrelvir and Ritonavir in Human Plasma by HPLC-MS/MS

Timofey N. Komarov[1, 3], 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]

[1] LLC "CPHA", 8, Simferopolskiy bulv., Moscow, 117638, Russian Federation
[2] LLC "PROMOMED RUS", 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russian Federation
[3] RUDN University, 6 Miklukho-Maklaya St, Moscow, 117198, Russian Federation

© 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

✉ **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: 01.02.2023 **Revised:** 09.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) is expected to remain a persistent global threat. Therefore, development of coronavirus disease 2019 (COVID-19) drugs is the most urgent global issue. Nirmatrelvir and ritonavir combination is an oral antiviral drug combination with activity against SARS-CoV-2. Nirmatrelvir and ritonavir combination is highly efficacious in reducing the risk 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 nirmatrelvir and ritonavir in human blood plasma. The method could be applied in pharmacokinetic study of nirmatrelvir and ritonavir.

Aim. The aim of this study is to develop and validate a HPLC-MS/MS bioanalytical method for the determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma.

Materials and methods. The determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by acetonitrile protein precipitation. Internal standard: promethazine. Mobile phase: 0.1% formic acid solution in water (Eluent A), 0.1% formic acid in acetonitrile (Eluent B). Column: Phenomenex Luna C18 50 × 2.0 mm, 5 μm. Analytical range: 50.00–10000.00 ng/mL for nirmatrelvir, 5.00–1000.00 ng/mL for ritonavir in human plasma. Ionization source and ionization: electrospray ionization, positive. Detection conditions: 499.90 → 110.10 m/z, 499.90 → 319.20 m/z (nirmatrelvir), 720.90 → 426.00 m/z, 720.90 → 296.20 m/z, 720.90 → 268.10 m/z, 720.90 → 197.10 m/z, 720.90 → 139.90 m/z (ritonavir), 285.15 → 198.05 m/z (promethazine).

Results and discussion. This method was validated for selectivity, 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 nirmatrelvir and ritonavir in human plasma was developed and validated. The analytical range was 50.00–10000.00 ng/mL for nirmatrelvir, 5.00–1000.00 ng/mL for ritonavir in human plasma. This method was applied to investigate the pharmacokinetics of nirmatrelvir and ritonavir.

Keywords: nirmatrelvir, ritonavir, 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 nirmatrelvir and ritonavir in human plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(2):135–145. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-135-145

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), вызванная вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), внесла значительные коррективы в жизнь населения планеты. Значения показателей заболеваемости и смертности по всему миру достигли чрезвычайно высоких значений [1]. Согласно статистическим данным, на январь 2023 года во всем мире было зафиксировано более 663 млн случаев заражения вирусом SARS-CoV-2, из которых около 6,7 млн закончились летальным исходом. На территории России на сегодняшний день зарегистрировано более 21 млн случаев данного заболевания, число летальных исходов составляет более 394 тысяч[1]. Более миллиона человек, из числа переболевших COVID-19, страдают от долгосрочных последствий данного заболевания, которые на данный момент еще до конца не изучены [2]. Также ожидается, что COVID-19 останется постоянной глобальной угрозой [3]. По данной причине вопрос разработки лекарственных препаратов для лечения COVID-19 остается актуальным.

В настоящее время во временных методических рекомендациях Министерства здравоохранения РФ по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (версия № 17 от 14.12.2022) выделяются несколько препаратов, которые могут быть использованы при лечении COVID-19, в их число входит комбинация нирматрелвира с ритонавиром. Данная комбинация одобрена EMA и FDA для экстренного применения у пациентов с COVID-19; в России применяется для лечения COVID-19 у взрослых в легкой и среднетяжелой форме течения, в том числе у пациентов с повышенным риском прогрессирования заболевания до более тяжелой формы и не требующих дополнительной оксигенотерапии[2].

[1] WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: https://covid19.who.int/ Accessed: 19.01.2023.

[2] 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 19.01.2023.

Нирматрелвир ((1R,2S,5S)-N-[(1S)-1-циано-2-[(3S)-2-оксопирролидин-3-yl]этил]-3-[(2S)-3,3-диметил-2-[(2,2,2-трифлуороацетил)амино]бутаноил]-6,6-диметил-3-азабицикло[3.1.0]гексан-2-карбоксамид), НИРМ [Nirmatrelvir, NIRM]) – препарат, обладающий противовирусной активностью. В основе механизма действия нирматрелвира лежит ингибирование протеазы вируса SARS-CoV-2 3CL. Ингибирование данной протеазы предотвращает репликацию вируса SARS-CoV-2 [4].

Ритонавир ([(1,3-Тиазол-5-ил)метил]{N-[(2S,3S,5S)-3-гидрокси-5-[(2S)-3-метил-2-[(метил{[2-(пропан-2-ил)-1,3-тиазол-4-ил]метил}карбамоил)амино]бутанамидо]-1,6-дифенилгексан-2-ил]карбамат), РИТ [Ritonavir, RIT]) – ингибитор протеазы вируса иммунодефицита человека типа 1, вируса иммунодефицита человека типа 2 и цитохрома P450 (CYP3A4) [5].

Комбинация нирматрелвира с ритонавиром относится к препаратам прямого противовирусного действия. При применении данной комбинации удается повысить эффективность терапии и снизить риск осложнений COVID-19 [6]. В данной комбинации ритонавир выступает в качестве фармакокинетического бустера и замедляет метаболизм нирматрелвира. Благодаря этому нирматрелвир проявляет активность в течение более длительного времени, в организме сохраняются более высокие концентрации препарата, элиминация замедляется. При пероральном введении нирматрелвира в комбинации с ритонавиром удается достичь высокой биодоступности, что является значительным преимуществом, так как хорошая пероральная доступность не требует парентерального введения и позволяет использовать данный препарат не только у госпитализированных пациентов, но и среди амбулаторных больных [7].

Разработка и валидация методики совместного определения и нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека – процедура, необходимая для проведения аналитического этапа исследования с целью дальнейшего изучения фармакокинетических параметров после однократного и многократного перорального применения данной комбинации здоровыми добровольцами.

В настоящее время опубликован ряд фармакокинетических исследований по количественному определению нирматрелвира и ритонавира в биологических жидкостях человека. Для определения данных веществ 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)]. В рассмотренных методиках ионизацию проводят электрораспылением в положительном режиме. В качестве пробоподготовки используется способ осаждения белков метанолом (MeOH) или ацетонитрилом (ACN), а также способ осаждения белков ацетонитрилом с последующим разбавлением (таблица 1).

Проанализировав литературные данные о разработке методик совместного количественного определения нирматрелвира и ритонавира, было сделано заключение об отсутствии опубликованных методик одновременно с простым способом пробоподготовки и достаточной чувствительностью. В связи с этим, было принято решение самостоятельно разработать и валидировать методику совместного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR, оснащенном 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 с тройным квадруполем. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

Во время проведения исследования были использованы следующие химические реактивы: ацетонитрил (класс «UHPLC Supergradient, ACS», PanReac & AppliChem, Германия, Испания); ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО ТД «ХИММЕД», Россия); метанол (класс «х.ч.», ООО ТД «ХИММЕД», Россия); муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания); вода деминерализованная (I класс чистоты).

Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы стандартные образцы нирматрелвира (Ningbo Mindo Pharmaceutical Co., Ltd, Индия, содержание 99,50 %), ритонавира (Mylan Laboratories Limited, Индия, содержание 100,40 %) и прометазина гидрохлорида (USP reference standard, Франция, содержание 99,90 %).

Исходные стандартные растворы (ИСР) нирматрелвира и ритонавира готовили путем растворения навесок субстанций в метаноле. ИСР внутреннего стандарт (ВС [internal standard, IS]) прометазина готовили путем растворения навески субстанции прометазина гидрохлорида в ацетонитриле. Концентрация нирматрелвира в ИСР составила 400 000,00 нг/мл, ритонавира – 50 000,00 нг/мл, прометазина – 60 000,00 нг/мл. Смешанные рабочие стандартные растворы (РСР) нирматрелвира и ритонавира готовили из ИСР, путем их разведения метанолом до получения в плазме концентраций, соответствующих уровням 1–8, нижнему пределу количественного определения (НПКО) [Lower

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения нирматрелвира и ритонавира

Table 1. Bioanalytical methods of nirmatrelvir and ritonavir quantitative determination

Аналитический метод Analytical method	Объект анализа Object	Пробоподготовка Sample preparation	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/mL		Ссылка Reference
СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение Protein precipitation	РИТ RIT	10,00–1000,00	[8]
			НИРМ NIRM	40,00–4000,00	
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение MeOH Protein precipitation by methanol	РИТ RIT	2,00–2000,00	[9]
			НИРМ NIRM	10,00–10000,00	
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ACN с последующим разбавлением Protein precipitation by acetonitrile, followed by dilution	РИТ RIT	5,00–5000,00	[6]
			НИРМ NIRM	10,0–10000,00	
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека, сыворотка Human plasma, serum	Осаждение ACN Protein precipitation by acetonitrile	РИТ RIT	10,87–3516,00	[10]
			НИРМ NIRM	14,69–4753,00	
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение Protein precipitation	РИТ RIT	10,00–1000,00	[11]
			НИРМ NIRM	50,00–5000,00	
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ACN Protein precipitation by acetonitrile	РИТ RIT	10,0–50000,00	[12]
			НИРМ NIRM	10,0–50000,00	

limit of quantification (LLOQ)], низкому [L (low)], средним [M1 и M2 (middle 1, middle 2)] и высокому уровням [H (high)] (таблица 2). PCP ВС готовили путем разведения ИСР ацетонитрилом до получения в плазме концентраций, составляющих 1,00 нг/мл.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 2. 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
	НИРМ NIRM	РИТ RIT	ПРОМ PROM
1	50,00	5,00	1,00
2	250,00	25,00	1,00
3	500,00	50,00	1,00
4	1000,00	100,00	1,00
5	2500,00	250,00	1,00
6	5000,00	500,00	1,00
7	7500,00	750,00	1,00
8	10000,00	1000,00	1,00
LLOQ	50,00	5,00	1,00
L	150,00	15,00	1,00
M1	2000,00	200,00	1,00
M2	4000,00	450,00	1,00
H	8000,00	800,00	1,00

Образцы интактной плазмы, ИСР и PCP хранили в морозильной камере при температуре –42,5 ± 7,5 °C.

Пробоподготовка

В центрифужную микропробирку типа «Эппендорф» аликвотировали образец, прибавляли PCP ВС прометазина, затем проводили осаждение белков с помощью ацетонитрила (1 : 3). Далее образец перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» и проводили центрифугирование. После центрифугирования супернатант переносили в виалы и помещали в автосамплер хроматографа. Способ пробоподготовки представлен в виде схемы на рисунке 1.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Phenomenex Luna C18 50 × 2,0 мм, 5 мкм.
- Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges C18 4 × 3,0 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: элюент A: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему); элюент B: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).
- Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин.
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 3.

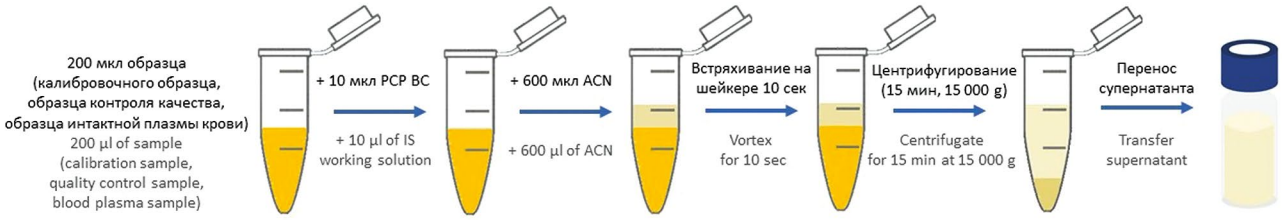


Рисунок 1. **Схема пробоподготовки**

Figure 1. **Sample preparation**

Таблица 3. **Градиентное элюирование**

Table 3. **Gradient elution**

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %
0,00	95,00	5,00
0,50	95,00	5,00
1,50	0,00	100,00
2,50	0,00	100,00
2,60	95,00	5,00
4,00	95,00	5,00

- Объем вводимой пробы: 1 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–4,00 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): 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**

Название вещества Name	Напряжение на капилляре Capillary voltage	Режим ионизации Ion mode	Условия детектирования Detection conditions
НИРМ NIRM	4,5	+	499,90 → 110,10; 499,90 → 319,20
РИТ RIT	4,5	+	720,90 → 426,00; 720,90 → 296,20; 720,90 → 268,10; 720,90 → 197,10; 720,90 → 139,90
ПРОМ PROM	4,5	+	285,15 → 198,05

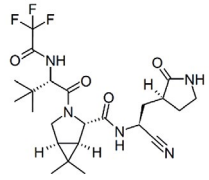
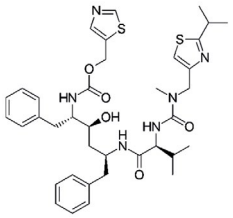
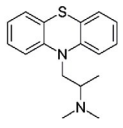
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

В качестве внутреннего стандарта (ВС) для нирматрелвира и ритонавира был выбран прометазин ((RS)-N,N,α-триметил-10H-фенотиазин-10-этанамин). Для получения необходимых хроматографических параметров подбиралось вещество, схожее с нирматрелвиром и ритонавиром по структуре и физико-химическим свойствам (таблица 5).

Таблица 5. **Структура и физико-химические свойства анализируемых веществ и внутреннего стандарта**

Table 5. **Structure and physicochemical properties of the analytes and IS**

Название вещества Name	Физико-химические свойства Physicochemical properties		Структурная формула Molecular structure
НИРМ[1] NIRM[1]	pKa	7,1	
	logP	2,12	
	Молекулярная масса Molecular weight	499,535	
РИТ[2] RIT[2]	pKa	13,68	
	logP	4,24	
	Молекулярная масса Molecular weight	720,944	
ПРОМ[3] PROM[3]	pKa	9,05	
	logP	4,29	
	Молекулярная масса Molecular weight	284,419	

Примечание. [1] Nirmatrelvir. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB16691. Ссылка активна на 19.01.2023.

[2] Ritonavir. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB00503. Ссылка активна на 19.01.2023.

[3] Promethazine. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB01069. Ссылка активна на 19.01.2023.

Note. [1] Nirmatrelvir. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB16691. Accessed: 19.01.2023.

[2] Ritonavir. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00503. Accessed: 19.01.2023.

[3] Promethazine. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB01069. Accessed: 19.01.2023.

Использовались условия масс-спектрометрического детектирования, позволяющие получить пики аналитов и ВС с наибольшей интенсивностью. Во время разработки методики были проанализированы фрагменты, получаемые при разных энергиях соударения и выбраны наиболее интенсивные переходы (см. таблица 4). Предполагаемые пути фрагментации нирматрелвира и ритонавира представлены на рисунках 2, 3.

В качестве осадителя был выбран ацетонитрил, так как при его использовании происходило наиболее полное осаждение белков плазмы крови, а также удалось добиться оптимальной формы хроматографических пиков. При этом использование данного способа пробоподготовки является наименее трудоемким, так как не требует дополнительных манипуляций и отдельных условий проведения анализа и не влияет на стабильность образцов при их хранении в автосамплере хроматографа, в отличие от ЖЖЭ, осаждения белков трифторуксусной кислотой или метанолом.

В процессе разработки методики, исходя из физико-химических свойств нирматрелвира и ритонавира для хроматографического разделения данной комбинации веществ была выбрана колонка Phenomenex Luna C18, 50 × 2,0 мм, 5 мкм.

Валидация методики

Валидация разработанной биоаналитической методики была проведена в соответствии с правилами проведения исследований биоэквивалентности

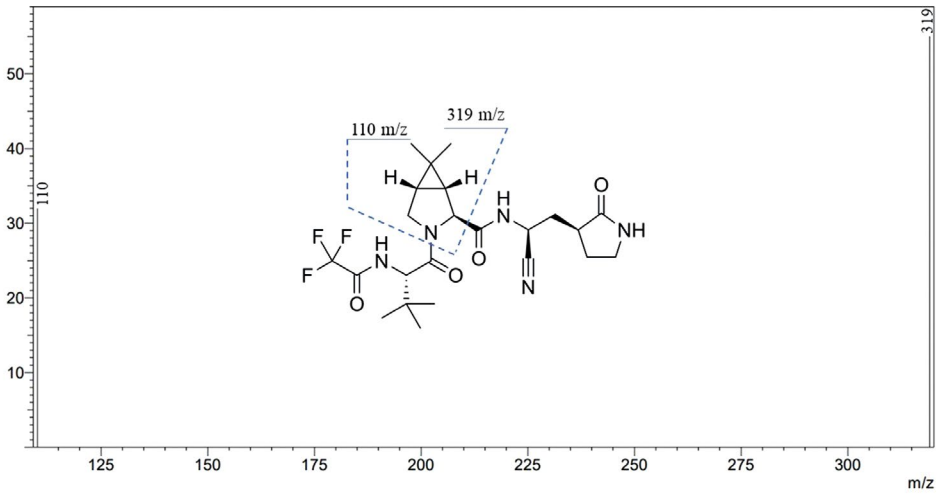


Рисунок 2. **Предполагаемые пути фрагментации нирматрелвира**

Figure 2. **MS/MS fragmentation of nirmatrelvir**

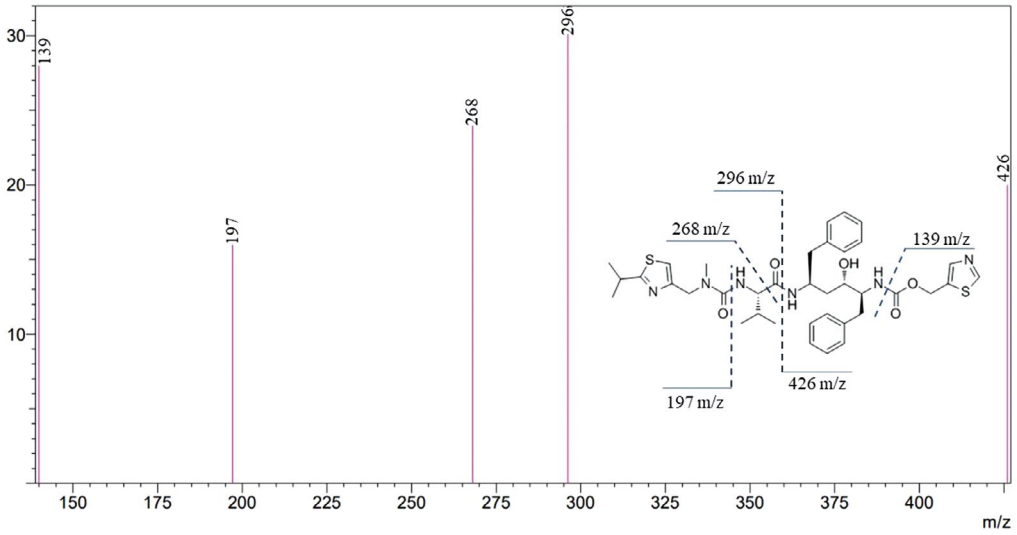


Рисунок 3. **Предполагаемые пути фрагментации ритонавира**

Figure 3. **MS/MS fragmentation of ritonavir**

в рамках Евразийского экономического союза[1] на основе правил руководств EMA[2] и FDA[3]. Методика прошла полную валидацию по следующим параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность и прецизионность, нижний предел количественного определения (НПКО), степень извлечения, эффект матрицы, перенос пробы, стабильность (краткосрочная стабильность аналита в матрице («настольная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке; стабильность ИСР и РСР; долгосрочная стабильность аналита в матрице). Основные валидационные характеристики с критериями приемлемости представлены в таблице 6.

Селективность

Были проанализированы шесть различных образцов интактной плазмы крови, по два различных образца гемолизной интактной плазмы крови и гиперлипидемической интактной плазмы крови, не содержащие анализируемых веществ, а также образцы с прибавлением РСР до концентраций, соответствующих уровню НПКО (см. таблица 2). Хроматограмма образца интактной плазмы крови человека представлена на рисунке 4.

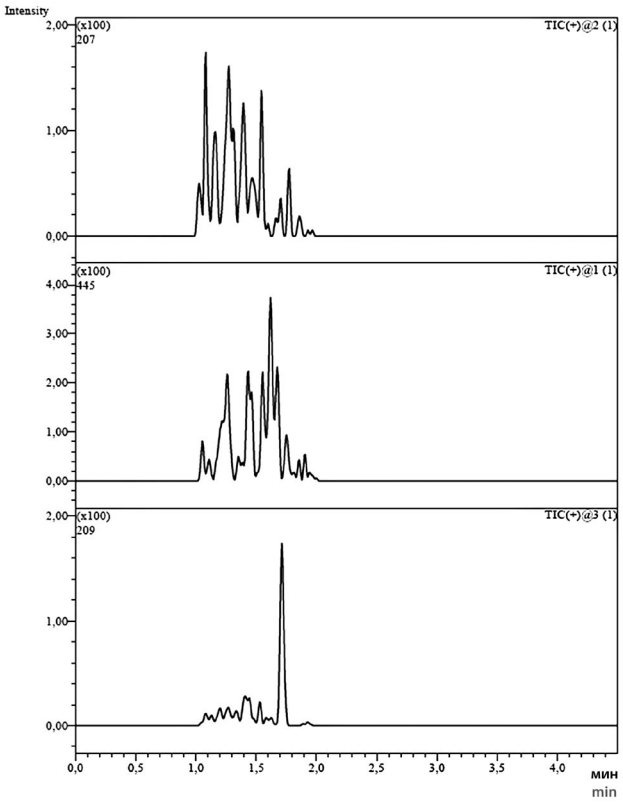


Рисунок 4. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови**

Figure 4. **Chromatogram of blank human plasma sample**

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 %
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 веществ, 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.

Калибровочная кривая

Был проведен анализ восьми образцов интактной плазмы крови с прибавлением РСР ВС прометазина до получения в образце концентрации 1,00 нг/мл и смешанных РСР нирматрелвира и ритонавира до концентраций нирматрелвира в диапазоне 50,00–10 000,00 нг/мл и ритонавира в диапазоне 5,00–

[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 19.01.2023.

[2] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/ Accessed: 19.01.2023.

[3] Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/ Accessed: 19.01.2023.

1000,00 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика нирматрелвира к площади пика прометазина от отношения концентрации нирматрелвира к концентрации прометазина в плазме крови, а также калибровочные графики в координатах отношение площади пика ритонавира к площади пика прометазина от отношения концентрации ритонавира к концентрации прометазина в плазме крови. Данные графики имели линейный вид. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции (*R*) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–4 приведены в таблице 7.

Точность и прецизионность

Были проанализированы калибровочные образцы плазмы крови, соответствующие уровням LLOQ, L, M1, M2 и H (см. таблица 2). Анализ проводили в рамках четырех последовательностей по пять вводов образца для каждого уровня концентрации нирматрелвира и ритонавира. Исследование проводили внутри циклов и между циклами в течение 1–4 последовательностей. Для расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и 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 представлены в таблице 8.

Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека составили 50,00 нг/мл для нирматрелвира и 5,00 нг/мл для ритонавира. Хроматограмма плазмы крови с содержанием нирматрелвира и ритонавира на уровне НПКО представлена на рисунке 5.

Степень извлечения

Были проанализированы по три образца, приготовленные из интактной плазмы крови, гемолизной и гиперлипидемической интактной без влияния степени извлечения (СИ) на уровнях L, M1, M2 и H (см. таблица 2), а также образцы контроля качества, приготовленные на различных видах биологической интактной матрицы для оценки СИ. Среднее значение

Таблица 7. **Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции**

Table 7. **Calibration equation and correlation coefficients**

№	НИРМ NIRM		РИТ RIT	
	Уравнение Calibration equation	R	Уравнение Calibration equation	R
1	$y = 0{,}00477758 \cdot x + 0{,}00871658$	0,9974542	$y = 0{,}0228336 \cdot x + 0{,}0752374$	0,9972169
2	$y = 0{,}00502899 \cdot x + 0{,}0104544$	0,9985304	$y = 0{,}0456889 \cdot x + 0{,}225216$	0,9958858
3	$y = 0{,}00424893 \cdot x + 0{,}00205931$	0,9984737	$y = 0{,}0320798 \cdot x + 0{,}103687$	0,9991287
4	$y = 0{,}00341493 \cdot x + 0{,}0257467$	0,9988095	$y = 0{,}0114315 \cdot x + 0{,}0427539$	0,9977584

Таблица 8. **Точность и прецизионность методики определения нирматрелвира и ритонавира**

Table 8. **Accuracy and precision of nirmatrelvir and ritonavir determination**

Введено (мкг/мл) Injected (μg/mL)	RSD, %						*E*, %					
	Внутри цикла Inter-day				Между циклами Intra-day		Внутри цикла Inter-day				Между циклами Intra-day	
	n = 5 (№ 1)	*n* = 5 (№ 2)	*n* = 5 (№ 3)	*n* = 5 (№ 4)	*n* = 15	*n* = 20	*n* = 5 (№ 1)	*n* = 5 (№ 2)	*n* = 5 (№ 3)	*n* = 5 (№ 4)	*n* = 15	*n* = 20
	НИРМ *NIRM*											
50,00	3,54	8,39	4,31	6,17	6,00	6,17	–4,71	–10,91	–7,69	–9,22	14,46	–9,22
150,00	4,75	2,95	2,54	6,61	6,88	6,61	–4,60	–9,37	4,32	–4,40	6,58	–4,40
2000,00	3,46	2,06	2,08	8,33	5,51	8,33	–4,75	–2,82	–13,07	–3,13	10,69	–3,13
4000,00	3,98	2,80	1,82	7,96	8,74	7,96	1,61	–14,57	1,92	–2,81	7,67	–2,81
8000,00	2,50	2,27	2,76	7,22	7,46	7,22	–1,49	–14,51	–0,18	–-3,67	6,35	–3,67
	РИТ *RIT*											
5,00	4,51	11,96	8,49	13,44	–7,77	13,44	13,84	–6,28	–13,36	–3,70	–1,93	–3,70
15,00	3,83	7,40	2,33	7,47	–3,22	7,47	8,68	–2,44	0,43	–0,08	2,22	–0,08
200,00	1,04	5,09	1,61	10,38	–6,88	10,38	12,76	2,71	–11,74	3,96	1,24	3,96
450,00	3,58	4,24	3,00	7,07	–3,68	7,07	14,23	–1,68	0,99	3,84	4,51	3,84
800,00	3,39	2,80	3,66	5,96	–5,40	5,96	7,75	–1,15	–5,16	1,22	0,48	1,22

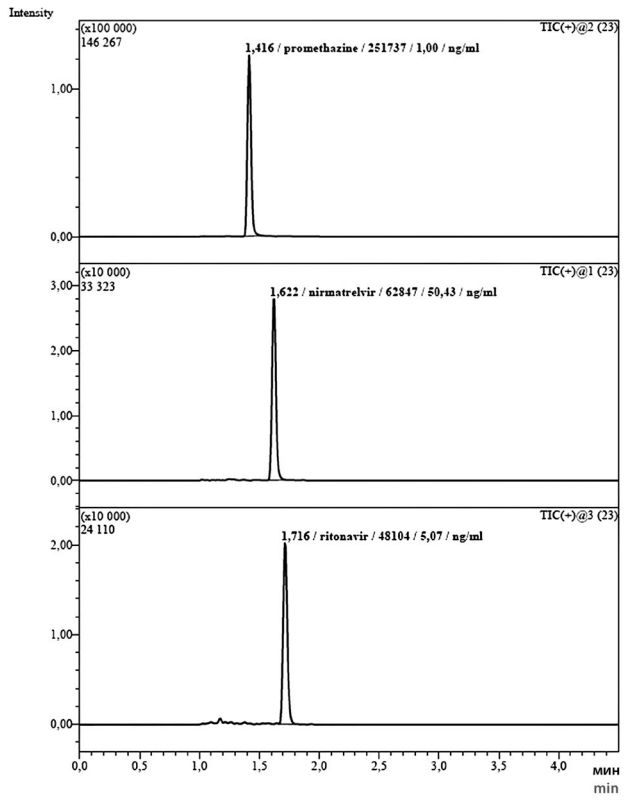


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови (НИРМ 50,00 нг/мл, РИТ 5,00 нг/мл)

Figure 5. Chromatogram of plasma sample (NIRM 50.00 ng/mL, RIT 5.00 ng/mL)

СИ нирматрелвира из различных видов интактных матриц составляет 93,85 %, ритонавира – 108,51 %. RSD рассчитанных значений СИ нирматрелвира из различных видов интактных матриц составляет 11,04 %, ритонавира – 14,64 % (таблица 9).

Эффект матрицы

Для оценки влияния биологической матрицы на количественное определение нирматрелвира и ритонавира был проведен анализ образцов с добавлением смешанных РСР без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учёта влияния степени извлечения анализируемых веществ и ВС из биологической матрицы. Эффект матрицы был оценен на уровнях L и H аналитических диапазонов концентраций нирматрелвира и ритонавира (см. таблица 2). Для ВС прометазина эффект матрицы был рассчитан на уровне 1,00 нг/мл. По полученным данным был рассчитан фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту (таблица 10).

Стабильность

Были проанализированы по три образца для оценки настольной и постпрепаративной краткосрочной стабильности, стабильности при трехкратной заморозке-разморозке, стабильности ИСР и РСР (при хранении в течение 17 дней при температуре –50 °С до –35 °С), долгосрочной стабильности аналита на уровнях L и H (см. таблица 2). Долгосрочная стабильность была оценена дважды: проводилась промежуточная оценка при хранении в течение 17 дней при температуре от –50 °С до –35 °С, а также дополнительная оценка при хранении в течение 38 дней при температуре от –50 °С до –35 °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 в рамках аналитического этапа исследования. Результаты оценки стабильности представлены в таблице 11.

Таблица 9. Оценка степени извлечения нирматрелвира и ритонавира на уровнях L, M1, M2 и H из различных видов биологической матрицы

Table 9. Calculation of nirmatrelvir and ritonavir recovery at levels L, M1, M2, H

Биологическая матрица Biological matrix	СИ НИРМ. % Recovery NIRM, %				СИ РИТ, % Recovery RIT, %			
	L	M1	M2	H	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank plasma	86,10	73,60	102,49	80,51	83,77	117,96	123,33	76,04
	85,51	74,87	100,13	93,18	87,48	118,53	123,03	89,66
	91,20	73,61	109,31	91,72	92,75	126,56	135,12	89,80
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	96,99	90,96	80,22	113,04	98,72	129,86	107,27	124,46
	88,04	98,16	82,05	105,03	87,55	132,14	105,21	118,66
	87,51	92,60	90,58	106,67	83,20	122,07	114,86	117,33
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	95,96	98,21	98,71	103,32	110,55	108,96	120,82	103,36
	99,93	107,23	89,55	94,42	106,70	118,63	106,27	94,57
	94,43	114,49	94,10	94,22	98,25	131,23	104,67	97,01
Среднее Average	93,85				108,51			
SD	10,36				15,89			
RSD	11,04				14,64			

Таблица 10. **Расчет фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта**

Table 10. **Calculation of IS-normalized matrix factors of nirmatrelvir and ritonavir**

	Интактная плазма крови Blank plasma		Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma		Гиперлипидемическая плазма Lipemic blank plasma	
	Нормализованный Mf Normalized Mf					
	L	H	L	H	L	H
НИРМ NIRM						
Среднее Average	1,20	0,95	1,16	0,81	1,09	0,81
RSD, %	4,24	9,81	4,16	5,37	3,55	5,53
РИТ RIT						
Среднее Average	1,95	1,44	1,67	1,18	1,32	1,17
RSD, %	4,22	5,39	9,95	14,12	7,57	11,09

Перенос пробы

В рамках валидационных циклов № 1–3 проводился последовательный анализ калибровочных образцов на уровне 8 (см. таблица 2) и образцов интактной плазмы крови. Результаты оценки переноса пробы представлены в таблице 12.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка и валидация методики количественного определения нирматрелвира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,00–10000,00 нг/мл для нирматрелвира и ритонавира в диапазоне 5,00–1000,00 нг/мл для ритонавира в плазме крови. Данная методика была использована в рамках проведения аналитического этапа исследования с целью изучения фармакокинетических параметров комбинированных препаратов нирматрелвира и ритонавира.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Garg I., Shekhar R., Sheikh A. B., Pal S. Impact of COVID-19 on the changing patterns of respiratory syncytial virus infections. *Infectious Disease Reports*. 2022;14(4):558–568. DOI: 10.3390/idr14040059.
2. Hiremath S., McGuinty M., Argyropoulos C., Brimble K. S., Brown P. A., Chagla Z., Cooper R., Hoar S., Juurlink D., Treleaven D., Walsh M. Prescribing nirmatrelvir/ritonavir for COVID-19 in advanced CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2022;17(8):1247–1250. DOI: 10.2215/CJN.05270522.
3. Hung Y. P., Lee J. C., Chiu C. W., Lee C. C., Tsai P. J., Hsu I. L., Ko W. C. Oral Nirmatrelvir/Ritonavir Therapy for COVID-19: The Dawn in the Dark? *Antibiotics*. 2022;11(2):220. DOI: 10.3390/antibiotics11020220.
4. Marzi M., Vakil M. K., Bahmanyar M., Zarenezhad E. Paxlovid: mechanism of action, synthesis, and in silico study. *BioMed Research International*. 2022;2022:7341493. DOI: 10.1155/2022/7341493.
5. Saravolatz L. D., Depcinski S., Sharma M. Molnupiravir and Nirmatrelvir-Ritonavir: Oral Coronavirus Disease 2019 Antiviral Drugs. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;76(1):165–171. DOI: 10.1093/cid/ciac180.
6. Toussi S. S., Neutel J. M., Navarro J., Preston R. A., Shi H., Kavetska O., LaBadie R. R., Binks M., Chan P. L., Demers N., Corrigan B. Pharmacokinetics of Oral Nirmatrelvir/Ritonavir, a Protease Inhibitor for Treatment of COVID-19, in Subjects With Renal Impair-

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, %			
		НИРМ NIRM		РИТ RIT	
		L	H	L	H
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализируются свежеприготовленными; хранение при температуре 20 ± 5 °C Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °C	4,63	8,56	13,73	12,70
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	24 часа при температуре 4 °C 24 hours at 4 °C	–10,35	–11,45	9,62	–1,44
Стабильность при трехкратной заморозке-разморозке Freeze-thaw stability	36 часа при температуре –42,5 ± 7,5 °C и 6 часов при температуре 20 ± 5°C 36 hours at –42.5 ± 7.5 °C and 6 hours at 20 ± 5 °C	2,67	3,23	3,23	–2,57
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	17 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 17 days at –42.5 ± 7.5 °C	3,16	4,69	2,67	2,65
	38 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 38 days at –42.5 ± 7.5 °C	1,10	4,89	–2,47	–2,06
Стабильность ИСР Stock solution stability	17 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 17 days at –42.5 ± 7.5 °C	0,37	4,29	–1,76	–0,93
Стабильность РСР Work solution stability	17 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 17 days at –42.5 ± 7.5 °C	–0,01	5,56	–2,36	–2,65

Таблица 12. Оценка переноса пробы

Table 12. Assessment of carry-over effect

№	Образец Sample	Значение площади Area			Отношение площадей, % Area ratio, %		
		НИРМ NIRM	РИТ RIT	ПРОМ PROM	НИРМ NIRM	РИТ RIT	ПРОМ PROM
1	НПКО LLOQ	65110	56522	275624	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	0	4358	0	0,00	7,71	0,00
2	НПКО LLOQ	66863	66863	312152	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	0	1714	0	0,00	2,56	0,00
3	НПКО LLOQ	63158	77307	318969	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	0	0	0	0,00	0,00	0,00

ment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2022;112(4):892–900. DOI: 10.1002/cpt.2688.
7. Extance A. Covid-19: What is the evidence for the antiviral Paxlovid? *BMJ*. 2022;377:o1037. DOI: 10.1136/bmj.o1037.
8. Guyon J., Novion M., Fulda V., Ducint D., Molimard M., Couzi L., Kaminski H., Salvo F., Bouchet S. A UPLC-MS/MS Method for Plasma Biological Monitoring of Nirmatrelvir and Ritonavir in the Context of SARS-CoV-2 Infection and Application to a Case. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2022;33(10):1975–1981. DOI: 10.1021/jasms.2c00204.
9. Martens-Lobenhoffer J., Böger C. R., Kielstein J., Bode-Böger S. M. Simultaneous quantification of nirmatrelvir and ritonavir by LC-MS/MS in patients treated for COVID-19. *Journal of Chromatography B*. 2022;1212:123510. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123510.
10. Lingscheid T., Kinzig M., Krüger A., Müller N., Bölke G., Tober-Lau P., Münn F., Kriedemann H., Witzenrath M., Sander L. E., Sörgel F. Pharmacokinetics of Nirmatrelvir and Ritonavir in COVID-19 Patients with End-Stage Renal Disease on Intermittent Hemodialysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2022;66(11):e01229–e01222. DOI: 10.1128/aac.01229-22.
11. Liu C., Zhu M., Cao L., Boucetta H., Song M., Hang T., Lu Y. Simultaneous determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma using LC–MS/MS and its pharmacokinetic application in healthy Chinese volunteers. *Biomedical Chromatography*. 2022;36(11):e5456. DOI: 10.1002/bmc.5456.
12. Singh R. S., Toussi S. S., Hackman F., Chan P. L., Rao R., Allen R., Van Eyck L., Pawlak S., Kadar E. P., Clark F., Shi H., Anderson A. S., Binks M., Menon S., Nucci G., Bergman A. Innovative Randomized Phase I Study and Dosing Regimen Selection to Accelerate and Inform Pivotal COVID-19 Trial of Nirmatrelvir. C *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2022;112(1):101–111. DOI: 10.1002/cpt.2603.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-146-153
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение фармакокинетики препарата для инфузионного введения Арепливир® (МНН: фавипиравир) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования

Т. Н. Комаров[1, 2]✉, Н. С. Багаева[1], К. К. Карнакова[1], И. Е. Шохин[1], К. Я. Заславская[3], П. А. Белый[3]

[1] ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] Российский университет дружбы народов, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
[3] ООО «ПРОМОМЕД РУС», 129090, Россия, г. Москва, пр-т Мира, д. 13 стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Комаров Тимофей Николаевич. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186;
К. К. Карнакова – 0000-0002-4010-1231; 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: 01.02.2023 **Статья принята в печать:** 15.03.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) вызвана оболочечным вирусом с одноцепочечной РНК позитивной полярности – SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Одним из противовирусных препаратов, рекомендованных для этиотропного лечения COVID-19, является фавипиравир. Парентеральное введение препарата имеет ряд преимуществ по сравнению с другими способами введения: отсутствует взаимодействие с пищей и пищеварительными ферментами, возможно применение для пациентов с заболеваниями пищеварительной системы и пациентов без сознания. В России для парентерального применения зарегистрирован препарат «Арепливир» с действующим веществом фавипиравир.

Цель. Целью исследования является изучение фармакокинетики препарата «Арепливир», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий (АО «Биохимик», Россия), держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», при внутривенном капельном введении здоровым добровольцам в рамках фазы I клинического исследования.

Материалы и методы. Клинический, аналитический этапы исследования, анализ фармакокинетических параметров проводился в рамках исследования различных доз препарата «Арепливир», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия). Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-2040C (Shimadzu Corporation, Япония) с встроенным УФ-детектором, четырехкомпонентным градиентным насосом низкого давления, дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и контроллером (Shimadzu Corporation, Япония). Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США). Описательная статистика фармакокинетических параметров рассчитывались с помощью IBM SPSS Statistics (версия 23.0), IBM, США. Корреляционно-регрессионный анализ проводился с помощью Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США).

Результаты и обсуждение. Для доз 400, 800, 1600 и 1800 мг при однократном введении в 4 когортах по 5 добровольцев рассчитаны фармакокинетические параметры. Для максимального значения концентрации фавипиравира (C_{max}) от вводимой дозы установлена статистически значимая прямая корреляционная связь весьма высокой тесноты по шкале Чеддока ($r = 0,98$; $p = 0,02$; r – коэффициент корреляции Пирсона; p – достигнутый уровень значимости) и статистическая значимость коэффициента детерминации ($R^2 = 0,96$; $F = 45,97$; $p = 0,02$; R^2 –коэффициент детерминации; F – фактическое значение критерия Фишера). Для площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) от вводимой дозы установлена статистически значимая прямая корреляционная связь весьма высокой тесноты по шкале Чеддока ($r = 0,97$; $p = 0,03$) и статистическая значимость коэффициента детерминации ($R^2 = 0,94$; $F = 33,54$; $p = 0,03$). Полученные результаты позволяют говорить о линейности C_{max} и AUC_{0-t} на всем изучаемом диапазоне доз (400–1800 мг).

Заключение. По полученным на аналитическом этапе исследования значениям концентраций фавипиравира были рассчитаны фармакокинетические параметры, построены усредненные фармакокинетические профили в линейных и полулогарифмических координатах после однократного введения различных доз препарата «АРЕПЛИВИР», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия). Установлена линейность C_{max} и AUC_{0-t} от вводимой дозы препарата «Арепливир» на всем изучаемом диапазоне доз (400–1800 мг) при однократном введении. Полученные результаты определяют возможность дальнейшего изучения режима дозирования с многократным введением фавипиравира, а также позволяют осуществить переход к последующим фазам клинических исследований препарата «Арепливир».

Ключевые слова: фавипиравир, COVID-19, фармакокинетика, инфузионное введение

Конфликт интересов. Клиническое исследование спонсировалось ООО «ПРОМОМЕД РУС», К. Я. Заславская и П. А. Белый являются представителями данной компании.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров участвовал в проведении аналитического этапа исследования. Н. С. Багаева, К. К. Карнакова проводили статистическую обработку данных и расчет фармакокинетических параметров. И. Е. Шохин, К. Я. Заславская, 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., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Изучение фармакокинетики препарата для инфузионного введения Арепливир® (МНН: фавипиравир) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):146–153. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-146-153

© Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А., 2023
© Komarov T. N., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., 2023

Phase I Pharmacokinetics Study of Drug for Infusion «Areplivir» (INN: Favipiravir) (LLC "PROMOMED RUS", Russia)

Timofey N. Komarov[1, 2]✉, Natalia S. Bagaeva[1], Kseniia K. Karnakova[1], Igor E. Shohin[1], Kira Ya. Zaslavskaya[3], Petr A. Bely[3]

[1] LLC "CPHA", 8, Simferopolskiy bulv., Moscow, 117638, Russian Federation
[2] RUDN University, 6 Miklukho-Maklaya St, Moscow, 117198, Russian Federation
[3] LLC "PROMOMED RUS", 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russian Federation

✉ **Corresponding author:** Timofey N. Komarov. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Kseniia K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231; 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: 01.02.2023 **Revised:** 15.03.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. The novel coronavirus infection COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) is caused by an enveloped, positive-sense, single-stranded ribonucleic acid (RNA) virus SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Favipiravir is the antiviral drug recommended for etiotropic treatment of COVID-19. Parenteral therapy has advantages over the other routes of the drug administration: there are no interaction with food and digestive enzymes, may be used for patients with diseases of the digestive system and unconscious patients. For parenteral drug administration of favipiravir the drug "Areplivir" has been registered in Russia.

Aim. The aim is pharmacokinetics study of drug "Areplivir", a lyophilisate for the preparation of a concentrate for the infusion solution (the manufacturer is JSC "Biokhimic", LLC "Promomed RUS" as registration certificate holder) by intravenous infusion in healthy volunteers in a phase I pharmacokinetics study.

Materials and methods. The clinical and analytical phases of the pharmacokinetic study as well as pharmacokinetic analyses have been performed as part of a clinical trial of the drug "Areplivir" in different doses, a lyophilisate for the preparation of a concentrate for the infusion solution (LLC "Promomed RUS", Russia). Chromatographic separation and detection were carried out on a LC-2040C high-performance liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan) with a built-in UV detector, a low-pressure four-component gradient pump, a degasser, an autosampler, a column thermostat and a controller. The pharmacokinetic parameters were calculated with the Boomer pharmacokinetic analysis add-in for Microsoft Excel (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, USA). Descriptive pharmacokinetic statistics were calculated with Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). Correlation and Regression Analysis were conducted with IBM SPSS Statistics (version 23.0), IBM, USA.

Results and discussion. For single dose administration of 400, 800, 1600 and 1800 mg in 4 cohorts of 5 volunteers pharmacokinetic parameters were calculated. For C_{max} and an administered dose the strong correlation coefficient on the Chaddock scale ($r = 0{,}98$; $p = 0{,}02$; r – Pearson correlation coefficient; p – the reached significance value) and the determination coefficient ($R^2 = 0{,}96$; $F = 45{,}97$; $p = 0{,}02$; R^2 – determination coefficient; F – the actual value of the Fisher's criterion) were statistically significant. For AUC_{0-t} and an administered dose the strong correlation coefficient on the Chaddock scale ($r = 0{,}97$; $p = 0{,}03$) and the determination coefficient ($R^2 = 0{,}94$; $F = 33{,}54$; $p = 0{,}03$) were statistically significant. The obtained results show the linearity of C_{max} and an administered dose and the linearity of AUC_{0-t} and an administered dose (400–1800 mg).

Conclusion. According to the concentrations of favipiravir from the analytical phase of the pharmacokinetic study the pharmacokinetic parameters were calculated, averaged pharmacokinetic profiles in linear and log-linear scales were plotted after single dose administrations of the drug "Areplivir" in different doses, a lyophilisate for the preparation of a concentrate for the infusion solution (LLC "Promomed RUS", Russia). The linearity of Cmax and a single administered dose and the linearity of AUC_{0-t} and a single administered dose of the drug "Areplivir" have been demonstrated for doses of 400 to 1800 mg. The results justified the study of multiple dose administration of "AREPLIVIR" and the subsequent phases of clinical trials.

Keywords: favipiravir, COVID-19, pharmacokinetics, infusion

Conflict of interest. A clinical study was sponsored by LLC "PROMOMED RUS" and authors Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely represent LLC "PROMOMED RUS".

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov participated in the clinical phase of the study. Natalia S. Bagaeva and Kseniia K. Karnakova carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A. Phase I pharmacokinetics study of drug for infusion «Areplivir» (INN: favipiravir) (LLC "PROMOMED RUS", Russia) . *Drug development & registration*. 2023;12(2):146–153. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-146-153

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), первый случай которой был зафиксирован в декабре 2019 года в Китае, своей внезапностью и быстротой распространения создала международную чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения [1–4]. В марте 2020 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила пандемию[1], которая продолжается и в настоящее время. Новый коронавирус SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус, относится к семейству Coronaviridae [2,

[1] Хронология действий ВОЗ по борьбе с COVID-19. Доступно по: https://www.who.int/ru/news-room/detail/29-06-2020-covidtimeline. Ссылка активна на 26.12.2022.

5, 6]. К концу 2022 года во всем мире зафиксировано более 650 млн подтвержденных случаев заражения вирусом SARSCoV-2, из них 6,6 млн закончились летальным исходом. На территории Российской Федерации зарегистрировано более 21 миллиона случаев заражения, скончалось более 400 тысяч человек[1]. Постановлением Правительства Российской Федерации SARS-CoV-2 включен в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих наряду с особо опасными инфекциями [6].

В актуальной версии временных методических рекомендаций[2] Министерства здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» представлен перечень лекарственных препаратов для этиотропного лечения COVID-19, одним из которых является фавипиравир. Фавипиравир – синтетический противовирусный препарат, селективный ингибитор РНК-полимеразы, активный в отношении РНК-содержащих вирусов [7–11]. Влияя на репликацию РНК вируса, фавипиравир подавляет РНК-полимеразу и блокирует размножение возбудителя [12, 13]. Парентеральное введение имеет ряд преимуществ по сравнению с другими способами введения: препарат напрямую попадают в кровь без взаимодействия с пищей и пищеварительными ферментами, поэтому обладает высокой и предсказуемой биодоступностью [8, 14]. Такой способ введения может применяться в ситуациях, когда пероральный прием затруднен или невозможен: пациент находится без сознания, в прон-позиции или подключен к искусственной вентиляции легких, страдает дисфагией или заболеваниями пищеварительной системы [8, 14]. Фавипиравир в формах для парентерального введения рекомендован пациентам со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, находящихся в стационарных условиях[3]. Первым оригинальным препаратом на основе фавипиравира для внутривенного введения стал «Арепливир» в форме лиофилизата для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий, получивший регистрационное удостоверение Минздрава России в ноябре 2021 года (РУ ЛП-007598)[3]. На сегодняшний день препарат «Арепливир» для внутривенного введения также зарегистрирован в форме концентрата для приготовления раствора для инфузий (РУ ЛП-007660)[4] и порошка для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий (РУ ЛП-007681)[5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический, аналитический этапы исследования, анализ фармакокинетических параметров проводился в рамках исследования различных доз препарата «Арепливир», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) (далее – «Арепливир») в рамках клинического исследования I фазы «Открытое нерандомизированное клиническое исследование по оценке безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров различных доз препарата «Арепливир», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) у здоровых добровольцев». Исследование одобрено Министерством здравоохранения Российской Федерации РКИ № 226 от 26.04.2021, протокол № FAV-012021[6].

Клинический этап исследования

В исследовании принимали участие 20 здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 18 до 45 лет включительно. В исследование включалось 4 когорты по 5 человек, препарат вводился добровольцам однократно внутривенно-капельно (1 когорте – 400 мг, 2 когорте – 800 мг, 3 когорте – 1600 мг, 4 когорте – 1800 мг). С целью контроля скорости введения препарата инфузия осуществлялась через инфузомат FMS (B. Braun, Германия) со скоростью 100 мл/час в течение 2 часов. Перед началом введения исследуемого препарата добровольцам устанавливался кубитальный гепаринизированный катетер на 12,5 часов. Установка кубитального катетера производилась в руку, отличную от той, в которую планировалось введение исследуемого препарата. После удаления катетера отбор крови у добровольцев проводился путем венепункции (через 16 и 24 часов по-

[1] WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: https://covid19.who.int/ Accessed: 26.12.2022.

[2] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (14.12.2022)» (утвержденные Министерством здравоохранения Российской Федерации). Доступенпо:https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/061/252/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V17.pdf. Ссылка активна на 26.12.2022.

[3] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации: Регистрационное удостоверение ЛП-007598. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=db230dd7-e82f-4890-bc87-4ae225bc9e4e. Ссылка активна на 26.12.2022.

[4] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации: Регистрационное удостоверение ЛП-007660. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=3b4285f9-f3a1-43ba-a603-972930b538f6. Ссылка активна на 26.12.2022.

[5] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации: Регистрационное удостоверение ЛП-007681. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=7f996e3d-1f19-4712-8dd4-390af761dbf2. Ссылка активна на 26.12.2022.

[6] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации: Реестр разрешений на проведение клинических исследований 226. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=144f22f8-5c12-4ba0-8811-9e924c418615&CIPermGUID=D23ECA63-6493-44C0-98DD-E5CE44C829B4. Ссылка активна на 26.12.2022.

сле начала введения препарата). После установки катетера за 5–10 минут до начала введения препарата отбиралась исходная (0) проба крови. После начала введения препарата отбор проб крови проводился через 10, 20, 30, 40 и 50 минут, далее – через 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16 и 24 часов.

Образцы крови отбирались в пробирки с антикоагулянтом K_2 или K_3ЭДТА, центрифугировались при 3000 об/мин в течение 10 минут. Полученная плазма делилась на две аликвоты (основную для анализа и контрольную для повторных анализов), замораживалась и хранилась при температуре не выше минус 20 °С. Транспортировка основных аликвот в аналитическую лабораторию осуществлялась при контролируемом температурном режиме не выше минус 18 °С.

Аналитический этап исследования

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-2040C (Shimadzu Corporation, Япония) с встроенным УФ-детектором, четырехкомпонентным градиентным насосом низкого давления, дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и контроллером (Shimadzu Corporation, Япония). Аналитический диапазон методики составляет 0,25–200,00 мкг/мл в плазме крови человека. Детальное описание методики количественного определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ и ее валидация приведены в статье [14].

Статистическая обработка данных и анализ фармакокинетики

Индивидуальные профили изменения значений фавипиравира в плазме крови добровольцев во времени, зарегистрированные после введения исследуемого препарата «Арепливир», характеризовались максимальным значением концентрации фавипиравира (C_{max}) и временем его достижения (T_{max}); площадью под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}), рассчитанной методом трапеций; площадью под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$). Дополнительно определялись следующие фармакокинетические параметры: период полувыведения фавипиравира ($T_{1/2}$); константа скорости элиминации (K_{el}), оцениваемая по угловому коэффициенту линии регрессии, рассчитанного по методу наименьших квадратов, натурального логарифмического значения концентраций фавипиравира по отношению ко времени получения последних значений концентраций фавипиравира свыше нижнего предела количественного определения; объем распределения лекарственного средства (V_d); общий клиренс (Cl); среднее время удержания лекарственного вещества в плазме крови (MRT).

Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью пакета Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США). Распределение фармакокинетических параметров описано мерами центральной тенденции (среднее арифметическое, среднее геометрическое, медиана) и мерой разброса данных (стандартное отклонение, коэффициент вариации, минимальное значение, максимальное значение) [15]. Описательная статистика фармакокинетических параметров рассчитывались с помощью Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Корреляционно-регрессионный анализ проводился с помощью IBM SPSS Statistics, версия 23.0 (IBM, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В анализ фармакокинетики были включены данные 20 добровольцев, которым однократно внутривенно-капельно вводился исследуемый препарат «Арепливир» в дозах от 400 до 1800 мг.

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата «Арепливир» при однократном введении, 1 когорта, доза 400 мг

Максимальное значение концентраций фавипиравира составило 7,92 ± 1,11 мкг/мл ($M \pm \sigma$, где M – среднее арифметическое, σ – стандартное отклонение). Значение медианы времени достижения максимальной концентрации фавипиравира составило 1,75 часа. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) составило 24,54 ± 5,96 мкг · ч/мл. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) – 25,44 ± 6,10 мкг · ч/мл. Фавипиравир элиминировался из плазмы крови со значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) 1,62 ± 0,30 часов. Общий клиренс (Cl) – 16,49 ± 4,09 л/ч. Объем распределения лекарственного средства (V_d) соответствует значению 37,57 ± 7,34 литров. Значение среднего времени удержания фавипиравира в плазме крови (MRT) составило 3,04 ± 0,43 часов (таблица 1).

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата «Арепливир» при однократном введении, 2 когорта, доза 800 мг

Максимальное значение концентраций фавипиравира составило 13,92 ± 3,86 мкг/мл. Значение медианы времени достижения максимальной концентрации фавипиравира составило 1,75 часа. Значение площади под кривой «плазменная концентра-

Таблица 1. Сводная таблица фармакокинетических параметров после однократного введения дозы исследуемого препарата «Арепливир»

Table 1. Summary data of pharmacokinetic parameters after a single dose administration of "Areplivir"

Фармакокинетический параметр препарата «АРЕПЛИВИР» Pharmacokinetic parameter of «AREPLIVIR»	Однократное введение Single dose administration			
	400 мг 400 mg	800 мг 800 mg	1600 мг 1600 mg	1800 мг 1800 mg
C_{max}, мкг/мл C_{max}, μg/mL	7,92 ± 1,11 [5]	13,92 ± 3,86 [5]	52,74 ± 14,19 [5]	51,69 ± 9,72 [5]
AUC_{0-t}, мкг · ч/мл AUC_{0-t}, μg · h/mL	24,54 ± 5,96 [5]	47,31 ± 18,46 [5]	209,86 ± 87,43 [5]	302,22 ± 118,17 [5]
$AUC_{0-\infty}$, мкг · ч/мл $AUC_{0-\infty}$, μg · h/mL	25,44 ± 6,10 [5]	48,61 ± 18,66 [5]	212,30 ± 86,92 [5]	308,37 ± 119,21 [5]
T_{max}, ч T_{max}, h	1,75 (1,75–2,00) [5]	1,75 (1,75–2,00) [5]	2,00 (1,75–2,00) [5]	2,00 (1,75–2,50) [5]
K_{el}, $ч^{-1}$ K_{el}, h^{-1}	0,44 ± 0,07 [5]	0,35 ± 0,14 [5]	0,26 ± 0,06 [5]	0,22 ± 0,07 [5]
$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h	1,62 ± 0,30 [5]	2,30 ± 0,93 [5]	2,82 ± 0,59 [5]	3,37 ± 0,94 [5]
Cl, л/ч Cl, L/h	16,49 ± 4,09 [5]	18,62 ± 7,28 [5]	8,55 ± 3,13 [5]	6,89 ± 3,53 [5]
V_d, л V_d, L	37,57 ± 7,34 [5]	59,15 ± 31,56 [5]	33,09 ± 9,12 [5]	29,97 ± 5,82 [5]
MRT, ч MRT, h	3,04 ± 0,43 [5]	3,52 ± 0,61 [5]	4,88 ± 1,38 [5]	5,78 ± 1,61 [5]

Примечание. Для всех параметров, кроме $T_{max,}$ приведены значения $M \pm \sigma$ [n] (M – среднее арифметическое, σ – стандартное отклонение, n – размер выборки). Для параметра T_{max} приведены значения Median (Min – Max) [n] (Median – медиана, Max – максимальное значение, Min– минимальное значение, n – размер выборки).

Note. For all parameters, except for T_{max}, the values $M \pm \sigma$ [n] are given (M is the arithmetic mean, σ is the standard deviation, n is the sample size). For the T_{max} parameter, the values Median (Min – Max) [n] are given (Median – median, Max – maximum value, Min – minimum value, n – sample size).

ция – время» с момента введения препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) составило 47,31 ± 18,46 мкг · ч/мл. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) – 48,61 ± 18,66 мкг · ч/мл. Фавипиравир элиминировался из плазмы крови со значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) 2,30 ± 0,93 часов. Общий клиренс (Cl) – 18,62 ± 7,28 л/ч. Объем распределения лекарственного средства (V_d) соответствует значению 59,15 ± 31,56 литров. Значение среднего времени удержания фавипиравира в плазме крови (MRT) составило 3,52 ± 0,61 часов (см. таблица 1).

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата «Арепливир» при однократном введении, 3 когорта, доза 1600 мг

Максимальное значение концентраций фавипиравира составило 52,74 ± 14,19 мкг/мл. Значение медианы времени достижения максимальной концентрации фавипиравира составило 2 часа. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) составило 209,86 ± 87,43 мкг · ч/мл. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) – 212,30 ± 86,92 мкг · ч/мл. Фавипиравир элиминировался из плазмы крови со значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) 2,82 ± 0,59 часов. Общий клиренс (Cl) – 8,55 ± 3,13 л/ч. Объем распределения лекарственного средства (V_d) соответствует значению 33,09 ± 9,12 литров. Значение среднего времени удержания фавипиравира в плазме крови (MRT) составило 4,88 ± 1,38 часов (см. таблица 1).

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата «Арепливир» при однократном введении, 4 когорта, доза 1800 мг

Максимальное значение концентраций фавипиравира составило 51,69 ± 9,72 мкг/мл. Значение медианы времени достижения максимальной концентрации фавипиравира составило 2 часа. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) составило 302,22 ± 118,17 мкг · ч/мл. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до

бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) – 308,37 ± 119,21 мкг · ч/мл. Фавипиравир элиминировался из плазмы крови со значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) 3,37 ± 0,94 часов. Общий клиренс (Cl) – 6,89 ± 3,53 л/ч. Объем распределения лекарственного средства (V_d) соответствует значению 29,97 ± 5,82 литров. Значение среднего времени удержания фавипиравира в плазме крови (MRT) составило 5,78 ± 1,61 часов (см. таблица 1).

Усредненные фармакокинетические профили (в линейных и полулогарифмических координатах) значений концентраций фавипиравира после однократного введения препарата «Арепливир» в различных дозах приведены на рисунках 1–2.

Линейность фармакокинетики при однократном введении исследуемого препарата

Значения максимальной концентраций фавипиравира в плазме крови добровольцев (C_{max}) изменялись с увеличением дозы препарата «Арепливир» при однократном введении: для дозы 400 мг – 7,92 ± 1,11 мкг/мл, для дозы 800 мг – 13,92 ± 3,86 мкг/мл, для дозы 1600 мг – 52,74 ± 14,19 мкг/мл, для дозы 1800 мг – 51,69 ± 9,72 мкг/мл. Площадь под кривой «плазменная концентрация – время» с момента введения препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t (AUC_{0-t}) возрастала с увеличением дозы препарата «Арепливир» при однократном введении: для дозы 400 мг – 24,54 ± 5,96 мкг · ч/мл, для дозы 800 мг – 47,31 ± 18,46 мкг · ч/мл, для дозы 1600 мг – 209,86 ± 87,43 мкг · ч/мл, для дозы 1800 мг – 302,22 ± 118,17 мкг · ч/мл.

Для проверки гипотезы линейности C_{max} и AUC_{0-t} от вводимой дозы проводился корреляционно-регрессионный анализ. При уровне значимости α = 0,05 проверялись нулевая гипотеза (H_0) о статистической незначимости коэффициента корреляции и нулевая гипотеза (H_0) о статистической незначимости коэффициента детерминации.

При проверке линейности C_{max} от вводимой дозы установлена статистически значимая прямая корреляционная связь весьма высокой тесноты по шкале Чеддока ($r = 0,98$; $p = 0,02$; r – коэффициент корреляции Пирсона; p – достигнутый уровень значимости) и статистическая значимость коэффициента детерминации ($R^2 = 0,96$; $F = 45,97$; $p = 0,02$; R^2 –коэффициент детерминации; F – фактическое значение критерия Фишера). При проверке линейности AUC_{0-t} от вводимой дозы установлена статистически значимая прямая корреляционная связь весьма высокой тесноты по шкале Чеддока ($r = 0,97$; $p = 0,03$) и статистическая значимость коэффициента детерминации ($R^2 = 0,94$; $F = 33,54$; $p = 0,03$).

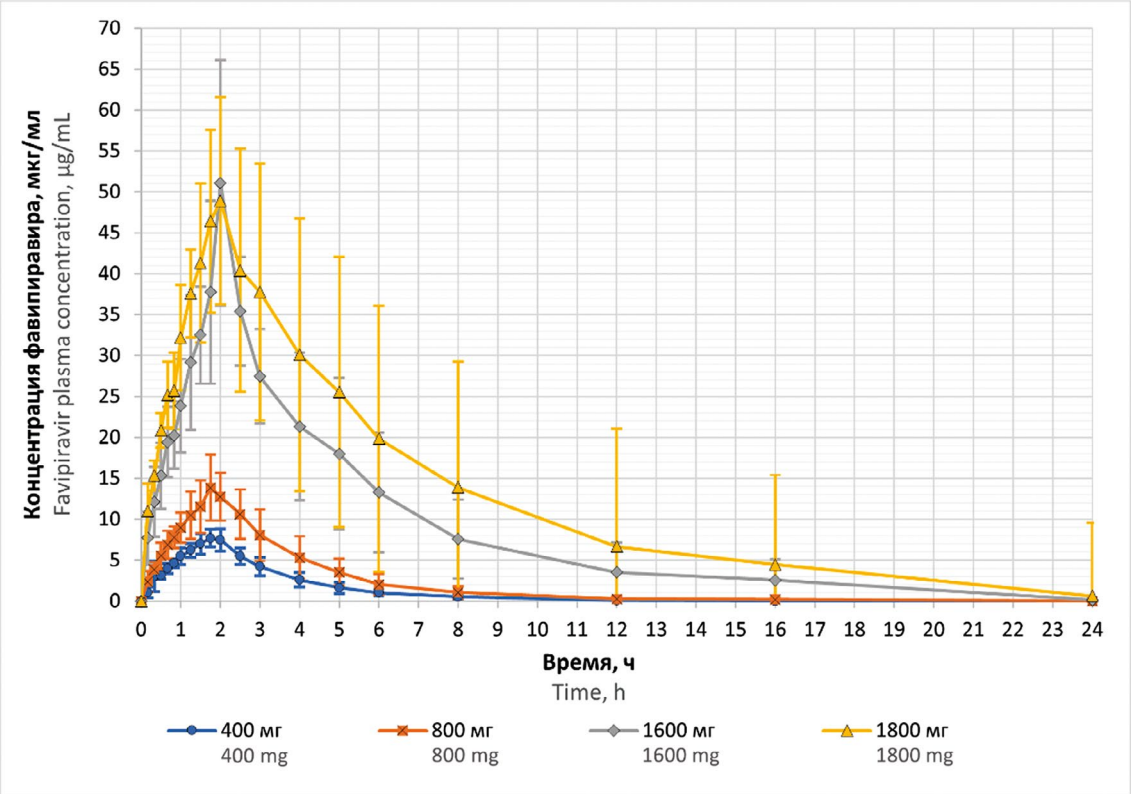


Рисунок 1. Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах со стандартными отклонениями) фавипиравира после однократного введения препарата «Арепливир»

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles (in linear scale with standard deviations) of favipiravir after single dose administration of "Areplivir"

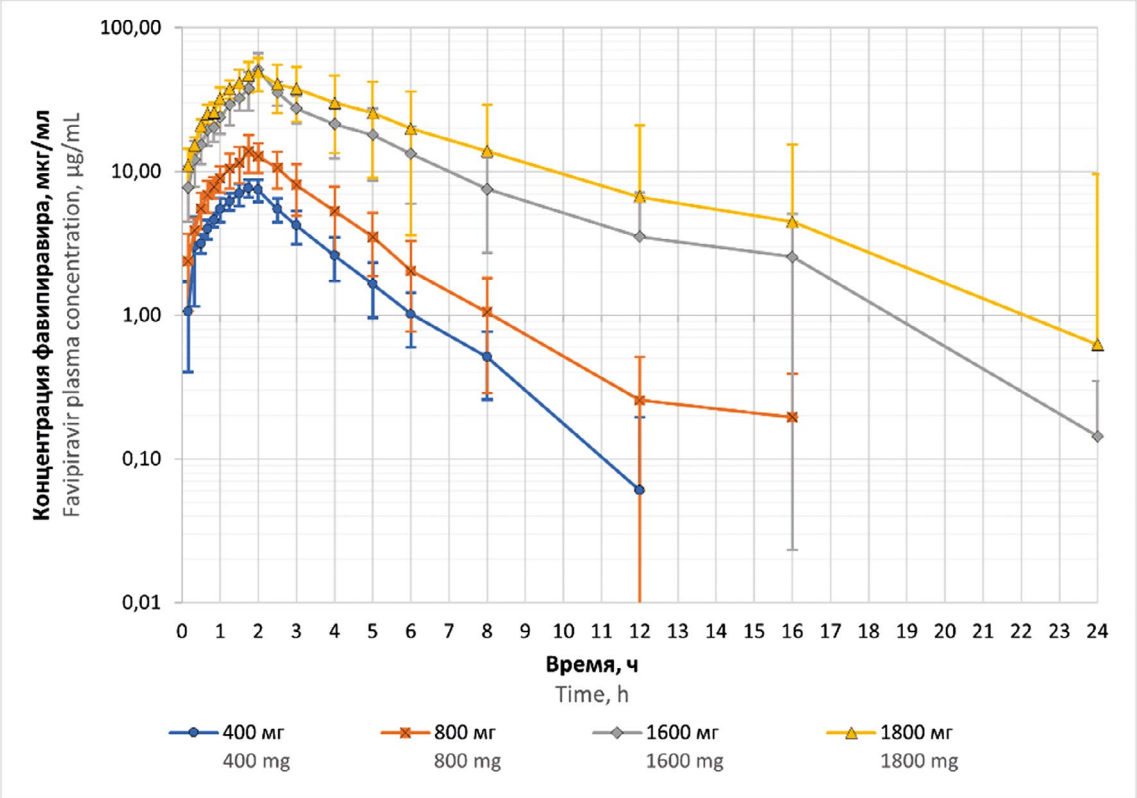


Рисунок 2. Усредненные фармакокинетические профили (в лог-линейных координатах со стандартными отклонениями) фавипиравира после однократного введения препарата «Арепливир»

Figure 2. Average pharmacokinetic profiles (in log-linear scale with standard deviations) of favipiravir after single dose administration of "Areplivir"

Полученные результаты позволяют сделать вывод о линейности C_{max} и AUC_{0-t} на всем изучаемом диапазоне доз (400–1800 мг). Линейная зависимость C_{max} от вводимой дозы препарата «Арепливир» при однократном введении показана на рисунке 3. Линейная зависимость AUC_{0-t} от вводимой дозы препарата «Арепливир» при однократном введении показана на рисунке 4.

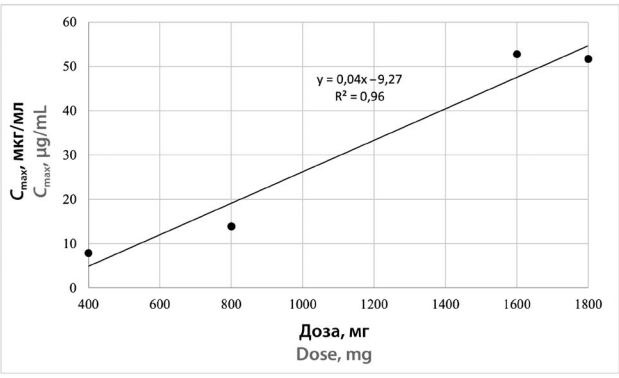


Рисунок 3. Линейная зависимость C_{max} от вводимой дозы препарата «Арепливир»

Figure 3. Linear relationship between C_{max} and an administered dose of "Areplivir"

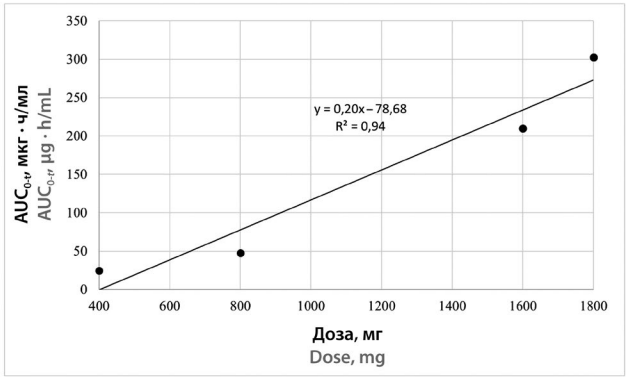


Рисунок 4. Линейная зависимость AUC_{0-t} от вводимой дозы препарата «Арепливир»

Figure 4. Linear relationship between AUC_{0-t} and an administered dose of "Areplivir"

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По полученным на аналитическом этапе исследования значениям концентраций фавипиравира были рассчитаны фармакокинетические параметры, построены усредненные фармакокинетические профили в линейных и полулогарифмических координатах после однократного введения различных доз пре-

парата «Арепливир», лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия). Установлена линейность C_{max} и AUC_{0-t} от вводимой дозы исследуемого препарата. Полученные результаты определяют возможность дальнейшего изучения режима дозирования с многократным введением фавипиравира, а также позволяют осуществить переход к последующим фазам клинических исследований препарата «Арепливир».

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang C., Horby P. W, Hayden F. G, Gao G. F. A Novel Coronavirus Outbreak of Global Health Concern. *Lancet*. 2020;395:470–473. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
2. Шамшева О. В. Новый коронавирус COVID-19 (SARS-CoV-2). *Детские инфекции*. 2020;19(1):5–6. DOI: 10.22627/2072-8107-2020-19-1-5-6.
3. Вечорко В. И., Аверков О. В., Зимин А. А. Новый штамм SARS-CoV-2 Омикрон – клиника, лечение, профилактика (обзор литературы). *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(6):3228. DOI: 10.15829/1728-8800-2022-3228.
4. Du Y., Chen X. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns About Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2020;108(2):242–247. DOI: 10.1002/cpt.1844.
5. Никифоров В. В., Суранова Т. Г., Чернобровкина Т. Я., Янковская Я. Д., Бурова С. В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. *Архивъ внутренней медицины*. 2020;10(2):87–93. DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93.
6. Баклаушев В. П., Кулемзин С. В., Горчаков А. А., Лесняк В. Н., Юсубалиева Г. М., Сотникова А. Г. COVID-19. Этиология, патогенез, диагностика и лечение. *Клиническая практика*. 2020;11(1): 7–20. DOI: 10.17816/clinpract26339.
7. Руженцова Т. А., Чухляев П. В., Хавкина Д. А., Гарбузов А. А., Плоскирева А. А., Осешнюк Р. А., Солуянова Т. Н., Шестакова И. В., Вафин А. Ю., Дмитрикова Е. П., Мустафаев Д. М., Домостроева Т. Н., Красавина Э. Н., Самсонов М. Ю., Никольская М. В., Разживина В. А., Филон О. В. Возможности этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у амбулаторных пациентов. *Медицинский оппонент*. 2020;1(9):48–58. DOI: 10.21055/preprints-3111729.
8. Балыкова Л. А., Заславская К. Я., Павелкина В. Ф., Пятаев Н. А., Селезнева Н. М., Кириченко Н. В., Иванова А. Ю., Родоман Г. В., Колонтарев К. Б., Скрупский К. С., Симакина Е. Н., Мубаракшина О. А., Таганов А. В., Пушкарь Д. Ю. Эффективность и безопасность инфузионного введения фавипиравира у пациентов, госпитализированных с COVID-19. *Фармация и фармакология*. 2022;10(1):113–126. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-113-126.
9. Константинова И. Д., Андронова В. Л., Фатеев И. В., Есипов Р. С. Фавипиравир и его структурные аналоги: антивирусная активность, способы синтеза. *Acta Naturae*. 2022;14(2(53));16–38. DOI: 10.32607/actanaturae.11652.
10. Delang L., Neyts J. Medical treatment options for COVID-19. European Heart Journal: *Acute Cardiovascular Care*. 2020;9(3):209–214. DOI: 10.1177/2048872620922790.
11. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacology & Therapeutics*. 2020;209:107512. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107512.
12. Чухляев П. В., Жанибеков Ж. Ж., Хавкина Д. А., Руженцова Т. А. Эффективность и безопасность этиотропной противовирусной терапии при COVID-19 у амбулаторных пациентов. *Медицинский алфавит*. 2022;(14):23–26. DOI: 10.33667/2078-5631-2022-18-23-26.
13. Леонова М. В. Фавипиравир как потенциальное средство противодействия при COVID-19. *Consilium Medicum*. 2020;22(11):56–60. DOI: 10.26442/20751753.2020.11.200368.
14. 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.
15. Смолянова Т. И., Багаева Н. С., Колганова М. А., Шохин И. Е., Николаева А. М., Вязникова Т. В., Панкратова А. А., Быкова Е. А. Изучение фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» (специфический иммуноглобулин человека против COVID-19) (АО «Нацимбио», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):180–186. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186.

REFERENCES

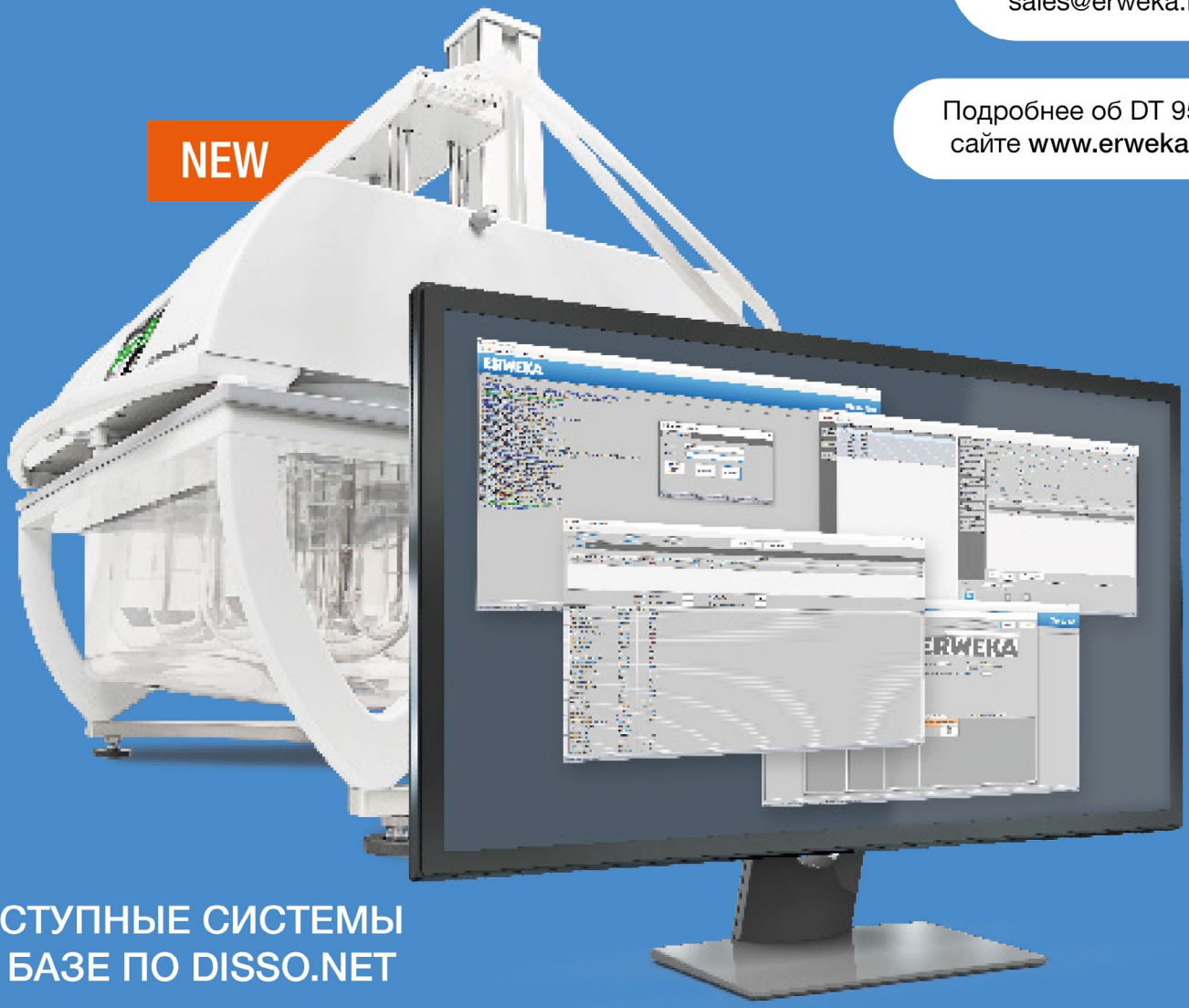
1. Wang C., Horby P. W, Hayden F. G, Gao G. F. A Novel Coronavirus Outbreak of Global Health Concern. *Lancet*. 2020;395:470–473. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
2. Shamsheva O. V. New Coronavirus COVID-19 (SARS-CoV-2). *Children infections*. 2020;19(1):5–6. (In Russ.) DOI: 10.22627/2072-8107-2020-19-1-5-6.
3. Vechorko V. I., Averkov O. V., Zimin A. A. New SARS-CoV-2 Omicron variant – clinical picture, treatment, prevention (literature review). *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(6):3228. (In Russ.) DOI: 10.15829/1728-8800-2022-3228.
4. Du Y., Chen X. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns About Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2020;108(2):242–247. DOI: 10.1002/cpt.1844.
5. Nikiforov V. V., Suranova T. G., Chernobrovkina T. Yu., Yankovskaya Y. D., Burova S. V. New Coronavirus Infection (Covid-19): Clinical and Epidemiological Aspects. *The Russian Archives of Internal Medicine*. 2020;10(2):87–93. (In Russ.) DOI: 10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93.
6. Baklaushev V. P., Kulemzin S. V., Gorchakov A. A., Lesnyak V. N., Yusubalieva G. M., Sotnikova A. G. COVID-19. Aetiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Practice*. 2020;11(1):7–20. (In Russ.) DOI: 10.17816/clinpract26339.
7. Ruzhentsova T. A., Chukhliaev P. V., Khavkina D. A., Garbuzov A. A., Ploskireva A. A., Oseshnyuk R. A., Soluyanova T. N., Shestakova I. V., Vafin A. Yu., Dmitrikova E. P., Mustafaev J. M., Domostroeva T. N., Krasavina E. N., Samsonov M. J., Nikolskaya M. V., Razzhivina V. A., Filon O. V. Potential for etiotropic therapy of SARS-CoV-2-induced coronavirus disease in outpatients. *Medical Opponent*. 2020;1(9):48–58. (In Russ.) DOI: 10.21055/preprints-3111729.
8. Balykova L. A., Zaslavskaya K. Y., Pavelkina V. F., Pyataev N. A., Selezneva N. M., Kirichenko N. V., Ivanova A. Yu., Rodoman G. V., Kolontarev K. B., Skrupsky K. S., Simakina E. N., Mubarakshina O. A., Taganov A. V., Pushkar D. Yu. Effectiveness and safety of favipiravir infusion in patients hospitalized with COVID-19. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(1):113–126. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-113-126.
9. Konstantinova I. D., Andronova V. L., Fateev I. V., Esipov R. S. Favipiravir and Its Structural Analogs: Antiviral Activity and Synthesis Methods. *Acta Naturae*. 2022;14(2):16–38. (In Russ.) DOI: 10.32607/actanaturae.11652.
10. Delang L., Neyts J. Medical treatment options for COVID-19. European Heart Journal: *Acute Cardiovascular Care*. 2020;9(3):209–214. DOI: 10.1177/2048872620922790.
11. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacology & Therapeutics*. 2020;209:107512. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107512.
12. Chuhliaev P. V., Janibekov J. J., Khavkina D. A., Ruzhentsova T. A. Efficacy and safety of etiotropic antiviral therapy in COVID-19 in outpatient patients. *Medical alphabet*. 2022;(14):23–26. (In Russ.) DOI: 10.33667/2078-5631-2022-18-23-26.
13. Leonova M. V. Favipiravir as a potential countermeasure for COVID-19. *Consilium Medicum*. 2020;22(11):56–60. (In Russ.) DOI: 10.26442/20751753.2020.11.200368.
14. 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.
15. Smolyanova T. I., Bagaeva N. S., Kolganova M. A., Shohin I. E., Nikolaeva A. M., Vyaznikova T. V., Pankratova A. A., Bykova E. A. Phase I Pharmacokinetics Study of Drug «COVID-globulin» (Specific Human Immunoglobulin Against COVID-19). *Drug development & registration*. 2022;11(2):180–186. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186.

Новые системы растворения

на базе DT 950 и ПО Disso.NET

Демонстрация
по запросу на
sales@erweka.ru

Подробнее об DT 950 на
сайте **www.erweka.ru**



ДОСТУПНЫЕ СИСТЕМЫ НА БАЗЕ ПО DISSO.NET

- Офлайн система
- Онлайн система
- Он/офлайн система с UV-Vis
- Он/офлайн система с HPLC

Аналитические методы

100% Соответствие USP/EP/ГФ РФ

Disso.NET Полный контроль ПО Disso.NET

ООО „ЭРВЕКА“

115114 Москва
Летниковская 16-103

E-Mail: sales@erweka.ru
Тел.: +7 499 110 90 60

ERWEKA

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163
УДК 615.31:661

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Взаимосвязь фармацевтической разработки и доклинических исследований (обзор)

И. Н. Ампилогова✉, М. В. Карлина✉✉, В. Г. Макаров, М. Н. Макарова

АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г. п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, корп. 245

✉ **Контактное лицо:** Ампилогова Ирина Николаевна. **E-mail:** ampilogova.in@doclinika.ru
✉✉ **Контактное лицо:** Карлина Марина Валерьевна. **E-mail:** karlina.mv@doclinika.ru

ORCID: И. Н. Ампилогова – https://orcid.org/0000-0003-0833-3371; М. В. Карлина – https://orcid.org/0000-0002-6292-8934;
В. Г. Макаров – https://orcid.org/0000-0002-2447-7888; М. Н. Макарова – https://orcid.org/0000-0003-3176-6386.

Статья поступила: 04.03.2022 **Статья принята в печать:** 18.04.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Создание инновационного высокоэффективного и конкурентоспособного лекарственного препарата является долгим и дорогостоящим процессом, результат которого достаточно сложно спрогнозировать заранее. Для ускорения выхода нового препарата на рынок и снижения материальных затрат разработчика целесообразным является включение доклинических экспериментов непосредственно в процесс лабораторной фармацевтической разработки.

Текст. Цель настоящей работы заключается в создании обоснованного подхода к осуществлению лабораторной фармацевтической разработки с привлечением исследований *in vivo*. Включение доклинических исследований в процесс лабораторной фармацевтической разработки позволит исключить негативное влияние фармацевтических факторов на биодоступность лекарственного средства (ЛС), избежать ошибок при выборе вспомогательных веществ (ВВ), а также снизить материальные и временные затраты. Перечисленные в обзоре примеры, демонстрирующие актуальность проведения доклинических экспериментов на разных этапах лабораторной фармразработки, позволили описать более четкий алгоритм действий при осуществлении лабораторной фармацевтической разработки нового лекарственного препарата с момента выбора молекулы-кандидата в ЛС.

Заключение. Для повышения вероятности успешности фармацевтической разработки на этапе выбора лекарственной формы и ее состава необходимо проведение экспериментов по изучению фармакокинетики и/или фармакодинамики, что позволит разработать лекарственный препарат с оптимальным фармакокинетическим профилем, снизить количество доклинических исследований, стоимость разработки и обеспечить успешную трансляционность данных в клиническую практику.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, доклинические исследования, Quality by Design, качество путем разработки, традиционная разработка, улучшенный подход

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

Вклад авторов. И. Н. Ампилогова, М. В. Карлина собрали и обработали материалы, написали статью. М. Н. Макарова и В. Г. Макаров редактировали и анализировали материалы. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Ампилогова И. Н., Карлина М. В., Макаров В. Г., Макарова М. Н. Взаимосвязь фармацевтической разработки и доклинических исследований. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):155–163. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163

The Interconnection Between Pharmaceutical Development and Preclinical Research (Review)

Irina N. Ampilogova✉, Marina V. Karlina✉✉, Valery G. Makarov, Marina N. Makarova

JSC "RMC "HOUSE OF PHARMACY", 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky, Vsevolozhski district, Leningrad region, 188663, Russia

✉ **Corresponding author:** Irina N. Ampilogova. **E-mail:** ampilogova.in@doclinika.ru
✉✉ **Corresponding author:** Marina V. Karlina. **E-mail:** karlina.mv@doclinika.ru

ORCID: Irina N. Ampilogova – https://orcid.org/0000-0003-0833-3371; Marina V. Karlina – https://orcid.org/0000-0002-6292-8934;
Valery G. Makarov – https://orcid.org/0000-0002-2447-7888; Marina N. Makarova – https://orcid.org/0000-0003-3176-6386.

Received: 04.03.2022 **Revised:** 18.04.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Pharmaceutical development of an innovative highly effective and competitive drug is a long and expensive process, the result of which is quite difficult to predict in advance. To speed up the entry of a new drug to the treatment and reduce the developer's material costs, it is advisable to include preclinical experiments in the process of creating a drug.

Text. The purpose of this work is to create a justified approach to the implementation of laboratory pharmaceutical development involving *in vivo* studies. The inclusion of preclinical studies in the process of laboratory pharmaceutical development will eliminate the negative impact of pharmaceutical factors on the bioavailability of a drugs and avoid errors in the selection of excipients, as well as reduce material and time costs. The review presents examples that demonstrate the relevance of conducting preclinical experiments at different stages of pharmaceutical development. These examples made it possible to describe a clearer algorithm of actions in the laboratory pharmaceutical development of a new drug from the moment a drug candidate molecule is selected.

© Ампилогова И. Н., Карлина М. В., Макаров В. Г., Макарова М. Н., 2023
© Ampilogova I. N., Karlina M. V., Makarov V. G., Makarova M. N., 2023

Conclusion. Due to increase the probability of successful pharmaceutical development at initial stage, it is necessary to carry out pharmacokinetic and/or pharmacodynamic experiments to make it possible to develop a drug with an optimal pharmacokinetic profile, reduce the number of preclinical studies, the cost of development, and ensure successful translation of data into clinical practice.

Keywords: pharmaceutical development, preclinical studies, Quality by Design, traditional development, improved approach

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 N. Ampilogova, Marina V. Karlina collected and processed materials, wrote an article. Valery G. Makarov, Marina N. Makarova edited and analyzed the materials. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Ampilogova I. N., Karlina M. V., Makarov V. G., Makarova M. N. The interconnection between pharmaceutical development and preclinical research. *Drug development & registration*. 2023;12(2):155–163. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163

ВВЕДЕНИЕ

Создание инновационного высокоэффективного и конкурентоспособного лекарственного препарата – это комплексный многостадийный процесс, состоящий из нескольких этапов. На первом этапе осуществляется поиск фармакологически активных веществ. Для этого могут проводиться фундаментальные исследования, целью которых является более глубокое изучение патогенеза заболевания, открытие новых мишеней. На этом этапе важно проанализировать все имеющиеся знания как о механизме возникновения и развития заболевания, его основных симптомах, так и о существующих лекарственных препаратах, рекомендованных для лечения данного заболевания, включая их возможные побочные реакции. Одновременно может происходить скрининг или моделирование новых соединений, способных оказать фармакологическое воздействие по уже известным механизмам. Их специфическая активность может изучаться как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. По полученным результатам исследований первого этапа выбираются и оптимизируются кандидаты, доказывается их фармакологическая активность и безопасность.

На следующем этапе осуществляется лабораторная фармацевтическая разработка готовой лекарственной формы (ГЛФ) на основе выбранной фармакологически активной субстанции (АФС). Цель фармацевтической разработки – создание препарата соответствующего качества. Применение современной концепции Quality-by-Design (QbD, «качество путем разработки»), заявленной в руководстве ICH Q8 «Фармацевтическая разработка»[1] [1], позволяет минимизировать риск производства некачественного лекарственного средства (ЛС). В данной концепции под «качеством препарата» подразумеваются технологические аспекты, обеспечивающие его стабильность в течение срока годности, при этом требования к сохранению активности АФС и ее фармакокинетическому профилю отсутствуют.

После проведения работ по разработке состава и технологии ЛС его эффективность и безопасность согласно рекомендациям[2] оценивается в результате комплексного доклинического исследования [изучение фармакокинетики (ФК), фармакодинамики (ФД) и токсичности]. Общепринятая схема начального этапа разработки лекарственного средства представлена на рисунке 1.

Несмотря на то, что на этапе лабораторной фармацевтической разработки доклинические исследования не являются обязательными, их включение в процесс создания ЛС является целесообразным, а в ряде случаев необходимым элементом разработки, так как при их проведении может быть выявлена низкая биодоступность и, как следствие, низкая эффективность препарата, отсутствие требуемых фармакокинетических характеристик и т. д. [2, 3]. Установление нежелательных характеристик нового ЛС потребует дальнейшей доработки его состава и технологии, что увеличит время выхода на рынок нового ЛС. При этом современные компании-производители ЛС нацелены на поиск всевозможных способов сокращения продолжительности различных этапов разработки препаратов [4].

Представленный обзор литературных данных посвящен вопросам актуальности проведения доклинических исследований на этапе лабораторной фармацевтической разработки ЛС.

Известно, что на биодоступность ЛС влияют факторы, связанные с биофармацевтическими характе-

[1] ICH Topic Q8 (R2). Part I. Pharmaceutical Development (EMEA/CHMP/167068/2004 Note for Guidance on Pharmaceutical Development). Part II. Annex Pharmaceutical Development (EMEA/CHMP/167068/2004 Annex to Note for Guidance on Pharmaceutical Development). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-pharmaceutical-development_en.pdf. Accessed: 12.04.2022.

[2] Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.

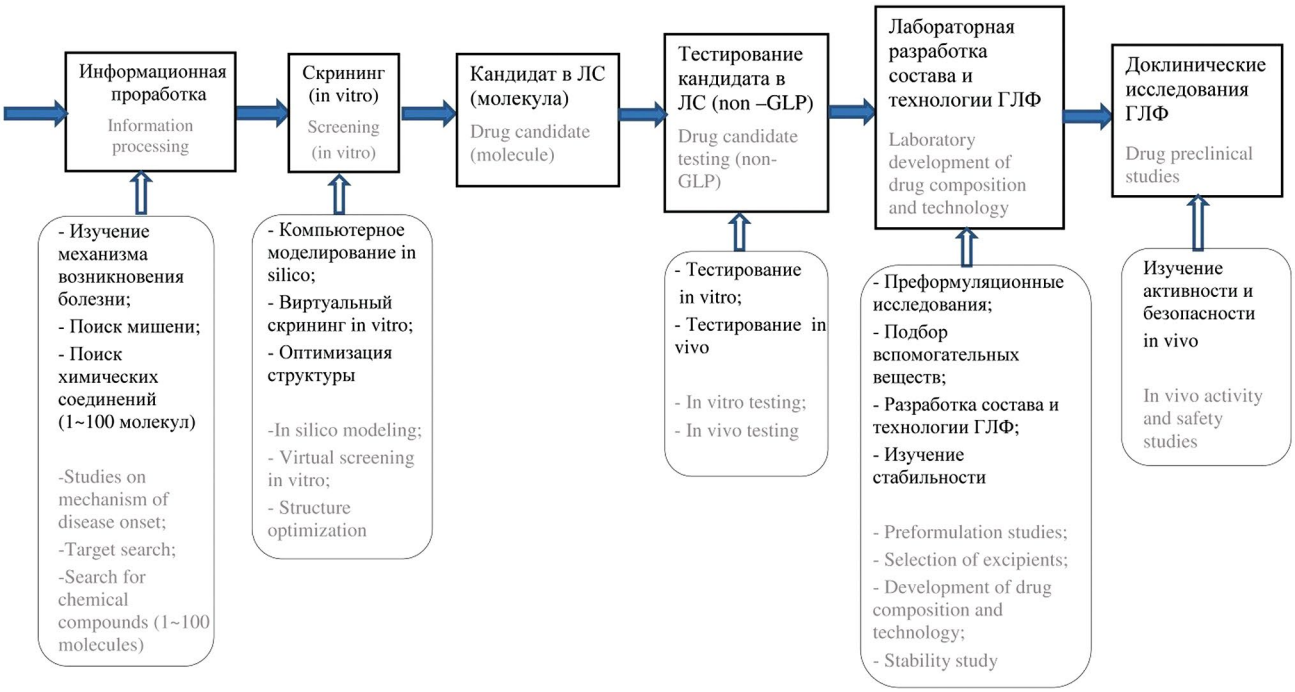


Рисунок 1. Общепринятая схема начального этапа разработки лекарственного средства

Figure 1. The generally accepted scheme for the initial stage of drug development

ристиками ГЛФ, к которым относятся: физико-химические свойства АФС, природа и количество вспомогательных веществ (ВВ), технологические параметры производственного процесса, лекарственная форма и пути ее введения [2, 5] (таблица 1).

Физико-химическое состояние АФС, влияющее на биодоступность ЛС, включает в себя такие характеристики, как размер частиц, полиморфизм, агрегатное состояние, физико-химические свойства (pH, растворимость, оптическая активность и т. д.), степень чистоты [6] и др. При этом наибольшее влияние на фармакологический эффект оказывают растворимость, размер частиц и полиморфизм АФС [7–10].

Одним из способов повышения растворимости АФС является уменьшение ее размера частиц (микронизация) [11, 12]. Необходимая степень измельчения и, соответственно, конкретный размер частиц АФС, определяющие скорость растворения, абсорбции и терапевтический эффект ЛС, обосновываются как правило исходя из результатов доклинических экспериментов. Так, для создания препаратов местного действия показана эффективность уменьшения размера частиц будесонида до ~230 нм при его ректальном введении в виде наносуспензии: выявлено уменьшение макро- и микроскопических характеристик воспаления в стенке толстого кишечника мышей, а также снижение количества воспалительных макрофагов и интерлейкин-β-продуцирующих CD11b+-клеток в ткани толстой кишки по сравнению с группой, получавшей микросуспензию будесонида (с размером частиц ~2 мкм) [12].

На модели острого воспалительного каррагенинового отека у крыс была отмечена более высокая противовоспалительная активность микронизированного дексаметазона, включенного в липидные эмульсии, по сравнению с исходной субстанцией [13]. Даже в случае пептидных субстанций, пероральное применение которых ограничено их низкой энзиматической устойчивостью [2], измельчение субстанции до 10 мкм приводило к положительному влиянию на скорость и степень ее всасывания и, как следствие, на величину биодоступности у белых беспородных крыс [14].

Микронизация очищенной флавоноидной фракции, на 90 % состоящей из диосмина и широко применяемой для лечения венозных и геморроидальных патологий, приводила к значительному усилению защитных эффектов в отношении проницаемости макромолекул при реперфузионном повреждении защечного мешка хомяка по сравнению с неизмельченной фракцией [15].

В то же время чрезмерное измельчение субстанции вследствие появления электростатического заряда может вызывать агломерацию и агрегацию ее частиц, потерю сыпучести, снижение стабильности и т. д. Так, при микронизации кальциферола до размера частиц <10 мкм наблюдается его быстрая инактивация и выведение из организма, снижение стабильности и усиление побочного действия [16].

Таблица 1. Факторы, влияющие на биодоступность АФС

Table 1. Factors affecting on bioavailability of API

№ п/п №	АФС APhI	Фактор, влияющий на биодоступность Bioavailability affecting factor	Результат Result	Литература Reference
1	Будесонид Budesonide	Размер частиц Particle size	Увеличение противовоспалительной активности, повышение местной переносимости Increased anti-inflammatory activity, local tolerance	[12]
2	Дексаметазон Dexamethasone	Размер частиц Particle size	Повышение противовоспалительной активности Increased anti-inflammatory activity	[13]
3	Пептидная субстанция Peptide substance	Размер частиц / вспомогательные вещества Particle size / excipients	Повышение биодоступности Increased bioavailability	[3, 14]
4	Флавоноидный комплекс Flavonoid Complex	Размер частиц Particle size	Повышение эффективности Increased bioavailability	[15]
5	Кальциферол Calciferol	Размер частиц Particle size	Снижение эффективности, биодоступности, усиление побочных эффектов Decreased efficacy, bioavailability, increased side effects	[16]
6	Карведиол Carvedilol	Включение в состав твердой дисперсии (повышение растворимости) Incorporation into solid dispersion (increased solubility)	Повышение биодоступности Increased bioavailability	[18]
7	Ламотриджин Lamotrigine	Включение в состав твердой дисперсии (повышение растворимости) Incorporation into solid dispersion (increased solubility)	Повышение биодоступности Increased bioavailability	[19]
8	Празиквантел Praziquantel	Полиморфизм Polymorphism	Повышение растворимости и эффективности Improved solubility and efficiency	[22]
9	Агомелатин Agomelatine	Полиморфизм Polymorphism	Повышение скорости растворения и биодоступности Increased dissolution rate and bioavailability	[23]
10	Валнемулин Valnemulin	Полиморфизм Polymorphism	Повышение биодоступности Increased bioavailability	[24]
11	Циметидин Cimetidine	Вспомогательные вещества Excipients	Снижение биодоступности в присутствии гидроксипропилметилцеллюлозы и талька Decreased bioavailability in the presence of hydroxypropyl methylcellulose and talc	[29]
12	Цетилпиридиния хлорид Cetylpyridinium chloride	Вспомогательные вещества Excipients	Снижение эффективности в присутствии магния стеарата Decreased effectiveness in the presence of magnesium stearate	[30]
13	Ранитидин Ranitidine	Вспомогательные вещества Excipients	Влияние на биодоступность в зависимости от пола животного Effect on bioavailability depending on the sex of the animal	[31]
14	Венетоклакс Venetoclax	Вспомогательные вещества Excipients	Позитивное влияние на бидоступность *in vitro* не подтвердилось *in vivo* A positive effect on biavailability *in vitro* was not confirmed in *in vivo*	[32]
15	Итраконазол Itraconazole	Вспомогательные вещества + технологический процесс Excipients + technology	Позитивное влияние на бидоступность *in vitro* не подтвердилось *in vivo* A positive effect on biavailability *in vitro* was not confirmed in *in vivo*	[34, 35]
16	Аторвастатин кальция Atorvastatin calcium	Вспомогательные вещества + технологический процесс Excipients + technology	Повышение биодоступности Increased bioavailability	[36]

Альтернативным процессу измельчения способом повышения растворимости является создание твердых дисперсных систем, представляющих собой дисперсии одной или нескольких АФС в матриксе, находящихся в твердом состоянии. В качестве матрикса могут выступать поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль, полиметакрилаты, полаксомеры, сахара (фруктоза, манноза, глюкоза) и другие поверхностно-активные носители [17]. Так, создание твердой дисперсии (ТД) плохо растворимого вещества карведиола, являющегося вазодилатирующим, антиаритмическим средством, на основе лауроил макрогол-32 глицерида (Gelucire® 44/14, Gattefosse) привело к пятикратному увеличению его растворимости *in vitro*. В экспериментах *in vivo* после перорального введения крысам линии Sprague-Dawley ТД карведиола наблюдалось значительное увеличение биодоступности: на 169 % выше по сравнению с чистой суспензией ЛС [18]. Эффективность применения плохорастворимой субстанции ламотриджин, предназначенной для лечения эпилепсии и биполярных расстройств, в виде ТД с полиэтиленгликолем-6000 подтвердилась при изучении фармакокинетики, проводимом на самцах крыс линии Wistar. Однократное пероральное применение ТД привело к значительному увеличению таких показателей, как C_{max}, t_{max} и AUC по сравнению с исходной субстанцией, что явилось доказательством увеличения биодоступности ламотриджина, входящего в состав ТД [19].

Стабильность и эффективность ЛС также во многом зависит от кристаллической модификации АФС, содержащейся в препарате [20]. Полиморфизм – это способность индивидуального вещества существовать в состояниях с различной кристаллической структурой (полиморфных модификациях) [21]. Выбор той или иной модификации обычно обосновывается исходя из результатов, полученных в экспериментах *in vitro*, но для подтверждения потенциальной терапевтической эффективности предпочтительно получать доказательства и в экспериментах на животных. Так, в работе [22] было показано, что превращение исходного празиквантела, обладающего антигельминтным действием, в форму В положительно влияет на растворимость в воде и собственную скорость растворения. Форма В характеризовалась не только длительной стабильностью, но и высокой активностью в экспериментах на инфицированных в течение 49 дней NMRI мышах. Из трех полиморфных модификаций антидепрессанта агомелатина наибольшую степень растворения проявила форма III. Результаты были подтверждены в опытах на собаках [23]. При разработке ветеринарного препарата на основе синтетического антибиотика валнемулина, для которого были наработаны полиморфные модификации, было установлено, что форма I характеризуется в 2,6 раза большей растворимостью, чем форма II. Перспективность применения этой модификации валнемулина для создания ветеринарного препарата подтверждена результатами фармакокинетического эксперимента на свиньях [24].

Важным фактором, влияющим на биодоступность ЛС, являются вспомогательные вещества. ВВ, некогда рассматриваемые как индифферентные компоненты, применяемые для формирования ГЛФ [2], за счет собственных физико-химических свойств могут влиять на скорость и полноту всасывания АФС [25–27]. В настоящее время опубликованы результаты большего числа исследований, отражающих влияние ВВ на биодоступность и фармакологический эффект лекарственных препаратов [28]. Например, в работе [29] было отмечено снижение абсорбции циметидина в присутствии гидроксипропилметилцеллюлозы и талька в составе капсул. Для предотвращения получения подобных результатов рекомендуется в процессе фармацевтической разработки ГЛФ проводить пилотные доклинические эксперименты, результаты которых позволят в дальнейшем минимизировать доработку составов.

Так, по результатам изучения антимикробного действия экспериментальных таблеток различных составов на основе цетилпиридиния хлорида было установлено, что для сохранения фармакологической активности АФС требуется исключение или внесение ограниченного количества магния стеарата в лекарственную форму цетилпиридиния хлорида [30]. Выбор оптимального состава дипептида ГБ-115 для перорального применения осуществлен в результате фармакокинетического исследования опытных образцов на крысах. Выявленное на 190 % увеличение относительной биодоступности составов с ГБ-115, содержащих ТД на основе ПВП и гидроксипропилметилцеллюлозу – гидрофильную матрицу, обеспечивающую контролируемую доставку активного вещества, позволило сократить количество экспериментов по фармацевтической разработке и перейти к фармакологическим исследованиям [3].

При выборе оптимального солюбилизатора для ранитидина при создании ГЛФ для перорального применения были изучены такие соединения, как полиэтиленгликоль-2000, кремофор RH 40, полоксамер 188, твин-80 и спан-20. Результаты эксперимента *in vivo* (фармакокинетика на самцах и самках крыс линии Wistar при однократном пероральном введении) показали, что полиоксиэтилированные солюбилизаторы (полиэтиленгликоль-2000, кремофор RH 40, полоксамер 188 и твин-80) повышали биодоступность ранитидина только у самцов, а неполиоксиэтилированный солюбилизатор спан-20 значительно увеличивал биодоступность ранитидина у

крыс обоих полов. Эти результаты имеют важное значение для использования полиоксиэтилированных солюбилизирующих наполнителей в лекарственной форме в свете их половой специфической модуляции биодоступности ЛС, являющихся субстратами Р-гликопротеина [31].

Влияние внесения ингибиторов осаждения для поддержания супернасыщения липофильных составов на основе венетоклакса, селективного ингибитора антиапоптозного белка В-клеточной лимфомы (BCL-2), было изучено с применением *in silico – in vitro – in vivo* подхода [32]. Скрининг различных ингибиторов осаждения *in silico* и *in vitro* показал преимущества их наличия в системе с точки зрения длительного перенасыщения и увеличения биодоступности, при этом в экспериментах *in vivo* на свиньях породы Ландрас добавление ингибиторов осаждения, наоборот, приводило к уменьшению биодоступности. Таким образом, показано, что, несмотря на предполагаемый риск преципитации венетоклакса при создании супернасыщенных липофильных составов, включение в систему ингибиторов осаждения не является целесообразным.

В работе [33] также были выявлены различия в экспериментах *in vitro – in vivo* при подборе оптимальных супердезинтегрантов для АФС с различными физико-химическими свойствами. Так, было установлено значимое взаимодействие таких дезинтегрантов, как кроскармелоза натрия и натрия крахмала гликолят с амфифильными АФС, приводившие к снижению растворимости лекарственных субстанций в условиях *in vitro*, при этом ухудшения биодоступности данных составов при их пероральном приеме в условиях *in vivo* обнаружено не было.

Влияние технологического процесса на биофармацевтические характеристики ЛС в большей степени изучено при производстве таблетированных форм. Наиболее подробное обоснование требуется при описании выбора способов приготовления таблетмассы и параметров прессования [5, 6]. Доказательством необходимости изучения технологического процесса (например, способа грануляции) является результат исследования высвобождения итраконазола из таблетированных форм на основе ТД по сравнению с существующим зарегистрированным препаратом, не содержащим ТД [34]. Скорость растворения итраконазола из таблеток на основе ТД была высокой: более 90 % высвобождалось в течение 10 минут по сравнению с менее чем 20 % итраконазола, высвободившегося из капсул Sporanox®. При этом биодоступность итраконазола из исследуемых препаратов в опытах на крысах и кроликах оказалась сравнимой. Полученные результаты позволили авторам работы сделать вывод о том, что при прогнозировании абсорбции итраконазола *in vivo*, кроме сведений по растворению ЛС *in vitro*, целесообразно учитывать и другие факторы, влияющие на биодоступность, например способ грануляции.

Тщательное обоснование состава и технологии получения пеллет на основе ТД итраконазола позволили достичь трехкратного увеличения биодоступности *in vivo* по сравнению с препаратом Sporanox® [35].

В работе [36] был рассмотрен выбор технологии создания ГЛФ аторвастатина кальция с увеличенной биодоступностью путем создания двухслойных таблеток, один слой которых был получен прессованием ядра из таблетмассы, изготовленной путем влажной грануляции аторвастатина кальция раствором ПВП, с последующим нанесением слоя нарингинина методом прямого прессования. Исследование было основано на результатах предварительных доклинических исследованиях на крысах, где было установлено временное и дозозависимое влияние предварительного воздействия нарингинина на улучшение биодоступности аторвастатина кальция.

Перечисленные примеры отражают аспекты, позволяющие систематизировать подходы к фармацевтической разработке и сократить финансовые и временные затраты на разработку ЛС. Основываясь на собственном опыте и исходя из собранных и проанализированных данных литературы, для реализации поставленной цели исследования нами был разработан более детальный алгоритм осуществления лабораторной фармацевтической разработки с элементами доклинических исследований (рисунок 2).

Данный алгоритм согласуется с представленным в работе [4] подходом, отражающим любой этап научно-исследовательской деятельности по созданию и разработке ЛС как циклический комплекс выполнения работ, и демонстрирует процедуру осуществления лабораторной фармацевтической разработки нового лекарственного препарата с момента выбора молекулы-кандидата в ЛС.

Предложенная последовательность действий, а именно проведение доклинических исследований на этапе лабораторной фармацевтической разработки (когда состав препарата еще не выбран окончательно), не является обязательной согласно современным регуляторным требованиям и, как следствие, не так часто реализуется на практике. Внедрение доклинических исследований в процессе фармацевтической разработки позволяет учитывать индивидуальные особенности всех компонентов разрабатываемого ЛС, оценивать потенциальное влияния взаимодействия конкретной АФС с ВВ при исследуемом пути введения на действие разрабатываемого ЛС, обеспечить успешную трансляционность данных в клиническую практику, сократить стоимость разработки и ускорить выход нового препарата на потребительский рынок.

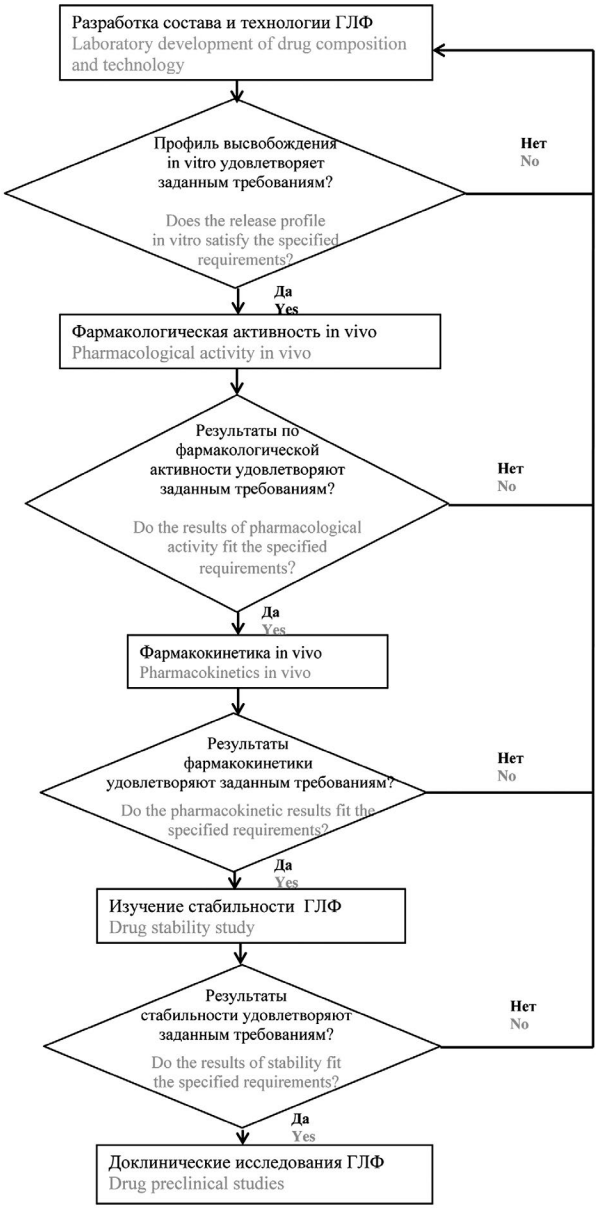


Рисунок 2. Алгоритм действий при осуществлении лабораторной фармацевтической разработки с элементами доклинических исследований

Figure 2. Algorithm of actions in the implementation of laboratory pharmaceutical development with elements of preclinical studies

ЛИТЕРАТУРА

1. Басевич А. В., Дзюба А. С., Каухова И. Е., Андреева П. И. Разработка алгоритма создания нового препарата. Стадия 1: Фармацевтическая разработка. *Формулы фармации*. 2019;1(1):22–31. DOI: 10.17816/phf18519.
2. Мирошниченко И. И., Кравцова О. Ю. Организация фармакокинетических исследований. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(3):12–19. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19.
3. Жердев В. П., Бойко С. С., Шевченко Р. В., Гудашева Т. А. Роль фармакокинетических и биофармацевтических исследований при создании новых дипептидных лекарственных средств (экспериментальное исследование). Фармакокинетика и фармакодинамика. 2017;1:3–10.
4. Белов М. В., Шахмурадян В. А. Совершенствование бизнес-процессов фармацевтического предприятия на этапе доклинической разработки лекарственного средства. *Бизнес-информатика*. 2019;13:17–27. DOI: 10.17323/1998-0663.2019.4.17.27.
5. Сеткина С. Б., Хишова О. М. Биофармацевтические аспекты технологии лекарственных средств и пути модификации биодоступности. *Вестник ВГМУ*. 2014;13(4):162–172.
6. Khan A. D., Singh L. Various techniques of bioavailability enhancement: a review. *Journal of drug delivery and therapeutics*. 2016;6(3):34–41. DOI: 10.22270/jddt.v6i3.1228.
7. Gupta R. J., Nagar V., Ansari J., Sharma A., Sarkar K., Mohd A. K. Bioavailability enhancement techniques for poorly soluble drugs: a review. *Asian journal of pharmaceutical research and development*. 2020;8:75-78. DOI:0.22270/ajprd.v8i2.664.
8. Самылина И. А., Тенцова А. И., Рудакова И. П., Ильина И. Г., Скачилова С. Я., Шилова Е. В. Биофармацевтические аспекты фармакопейных субстанций. *Фармация*. 2012;8:29–32.
9. Ковалева Е. Л., Багирова В. Л., Шаназаров К. С. Совершенствование методологических подходов к стандартизации фармацевтических субстанций. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010;4(1):35–42.
10. Bansal K., Pankaj P., Rao P. R. T., Sathapathy K. P. A., Kochhar P. S. Micronization and dissolution enhancement of norethindrone. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 2011;1(3):315–319.
11. Ковалева Ю. С., Зяблицкая Н. К. Микронизация глюкокортикостероидных лекарственных препаратов и их применение в медицине. *Эффективная фармакотерапия*. 2020;16(27):16–20.
12. Date A. A., Halpert G., Babu T., Ortiz J., Kanvinde P., Dimitrion P., Narayan J., Zierden H., Betageri K., Musmanno O., Wiegand H., Huang X., Gumber S., Hanes J., Ensign L. M. Mucus-penetrating budesonide nanosuspension enema for local treatment of inflammatory bowel disease. *Biomaterials*. 2018;185:97–105. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.005.
13. Sabroso C., Moreno-Ortega A., Blanco A. J., Sánchez A. F., Cano-Abad M., Torres-Suarez A. Overcoming glucocorticoid resistances and improving antitumor therapies: lipid and polymers carriers. *Pharmaceutical research*. 2015;32:968–985. DOI: 10.1007/s11095-014-1510-4.
14. Колик Л. Г., Жердев В. П., Бойко С. С., Константинопольский М. А., Раскин С. Ю., Гудашева Т. А., Мартьянов В. А., Середенин С. Б. Экспериментальная фармакокинетика и фармакодинамика субстанции дипептидного анксиолитика ГБ-115. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016;11:42–46.
15. Cyrino F. Z., Bottino D. A., Lerond L., Bouskela E. Micronization enhances the protective effect of purified flavonoid fraction against postischaemic microvascular injury in the hamster cheek pouch. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2004;31:159–162. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2004.03974.x.
16. Иванникова Е. В., Жердев В. П., Бойко С. С., Блынская Е. В., Турчинская К. Г., Алексеев К. В. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2013;2:1–17.
17. Демченко Д. В., Джайн (Корсакова) Е. А., Балабаньян В. Ю., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Разработка и биофармацевтическая оценка таблеток на основе труднорастворимой субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):79–87. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87.
18. Arregui J. R., Kovvasu S. P., Kunamaneni P., Betageri G V. Carvedilol solid dispersion for enhanced oral bioavailability using rat model. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2019;9(12):042–050. DOI: 10.7324/JAPS.2019.91207.
19. Mohan A., Gundamaraju R. In vitro and in vivo evaluation of fast-dissolving tablets containing solid dispersion of lamotrigine. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2015;5(1):57–64. DOI: 10.4103/2230-973X.147235.
20. Рудакова И. П., Ильина И. Г., Скачилова С. Я., Мелентьева Т. А., Михалев О. В., Самылина И. А. Полиморфизм и свойства лекарственных средств. *Фармация*. 2009;(8):42–44.
21. Гильдеева Г. Н. Полиморфизм: влияние на качество лекарственных средств и актуальные методы анализа. Качественная клиническая практика. 2017;1:56-60.
22. Zanolla D., Perissutti B., Passerini N., Chierotti M. R., Hasa D., Voinovich D., Gigli L., Demitri N., Geremia S., Keiser J., Vioglio P. C., Albertini B. A new soluble and bioactive polymorph of praziquan-

tel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;127:19–28. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.01.018.
23. Du W., Zhou Y., Gong Y., Zhao C. Investigation of physicochemical properties and in-vitro in-vivo evaluation of agomelatine polymorphs. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2013;8(3):181–190. DOI: 10.1016/j.ajps.2013.07.024.
24. Zhu X., Xu S., Lu L., Wang S., Zhao Q., Li D., Li J., Zhao H., Xu B. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of a polymorphic form of valnemulin hydrogen tartrate. *Journal of veterinary science*. 2019;20(2):e16. DOI: 10.4142/jvs.2019.20.e16.
25. Aleeva G. N., Zhuravleva M. V., Khafiz'yanova R. K. The role of excipients in determining the pharmaceutical and therapeutic properties of medicinal agents (Review). *Pharmaceutical chemistry journal*. 2009;43(4):230–234. DOI: 10.1007/s11094-009-0265-4.
26. Koo O. M. Y. Excipients-Application challenges and examples of new excipients in advanced drug delivery systems. *American pharmaceutical review*. 2011;14(2):60–68.
27. Алексеев К. В., Буева В. В., Блынская Е. В., Алексеев В. К., Аджиенко В. В. Роль вспомогательных веществ в составе твердых лекарственных форм при проведении фармацевтической разработки. *Wschodnioeuropejskie czasopismo naukowe*. 2019;9(49):48–52.
28. Бочков П. О., Шевченко Р. В., Литвин А. А., Колыванов Г. Б., Жердев В. П. Факторы, влияющие на биологическую доступность лекарственных препаратов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016;1:12–20.
29. Vaithianathan S., Haidar S. H., Zhang X., Jiang W., Avon C., Dowling T. C., Shao C., Kane M., Hoag S. W., Flasar M. H., Ting T. Y., Polli J. E. Effect of common excipients on the oral drug absorption of biopharmaceutics classification system class 3 drugs cimetidine and acyclovir. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2016;105:996–1005. DOI: 10.1002/jps.24643.
30. Fathima N., Tirunagari M., Qureshi H. K., Nandagopal A., Rao J. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2011;1:66–71.
31. Mai Y., Dou L., Madla C. M., Murdan S., Basit A. W. Sex-dependence in the effect of pharmaceutical excipients: polyoxyethylated solubilising excipients increase oral drug bioavailability in male but not female rats. *Pharmaceutics*. 2019;11(5):228. DOI: 10.3390/pharmaceutics11050228.
32. Koehl N. J., Henze L. J., Bennett-Lenane H., Faisal W., Price D. J., Holm R., Kuentz M., Griffin B. T. In silico, in vitro, and in vivo evaluation of precipitation inhibitors in supersaturated lipid-based formulations of venetoclax. *Molecular pharmaceutics*. 2021;18(6):2174–2188. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00645.
33. Fransén N., Morin M., Björk E., Edsman K. Physicochemical interactions between drugs and superdesintegrants. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2008;60:1583–1589. DOI: 10.1211/jpp.60.12.0003.
34. Yoo S. D., Lee S.-H., Kang E., Jun H., Jung J.-Y., Park J. W., Lee K.-H. Bioavailability of itraconazole in rats and rabbits after administration of tablets containing solid dispersion particles. *Drug development and industrial pharmacy*. 2000;26(1):27–34. DOI: 10.1081/DDC-100100324.
35. Lee J.-H., Park C., Weon K.-Y., Kang C.-Y., Lee B.-J., Park J.-B. Improved Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drug by Targeting Increased Absorption through Solubility Enhancement and Precipitation Inhibition. *Pharmaceuticals*. 2021;14:1255. DOI: 10.3390/ph14121255.
36. Joseph D., Renjitham S. S. The development and process optimization of atorvastatin calcium and Naringin bilayer tablet to improve the bioavailability of atorvastatin calcium by two-level factorial design using Design-Expert®. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2020;1(6):070–077. DOI: 10.7324/japs.2021.110608.

REFERENCES

1. Basevich A. V., Dzjuba A. S., Kauhova I. E., Andreeva P. I. Creating new drugs design patterns. Step one. Pharmaceutical development. *Pharmacy Formulas*. 2019;1(1):22–31. (In Russ.) DOI: 10.17816/phf18519.
2. Miroshnichenko I. I., Kravtsova O. Y. Organizing of pharmacokinetic investigations. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(3):12–19. (In Russ.) DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19.
3. Zherdev V. P., Bojko S. S., Shevchenko R. V., Gudasheva T. A. The role of pharmacokinetic and biopharmaceutical investigations in the creation of a new dipeptide drugs (experimental investigation). *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2017;1:3–10. (In Russ.)
4. Belov M. V., Shahmuradjan V. A. Improvement of a pharmaceutical enterprise's business processes at the stage of preclinical development of new drugs. *Business informatics*. 2019;13:17–27. (In Russ.) DOI: 10.17323/1998-0663.2019.4.17.27.
5. Setkina S. B., Hishova O. M. Biopharmaceutical aspects drug technology and ways to modify bioavailability. *Vestnik VGMU*. 2014;13(4):162–172. (In Russ.)
6. Khan A. D., Singh L. Various techniques of bioavailability enhancement: a review. *Journal of drug delivery and therapeutics*. 2016;6(3):34–41. DOI: 10.22270/jddt.v6i3.1228.
7. Gupta R. J., Nagar V., Ansari J., Sharma A., Sarkar K., Mohd A. K. Bioavailability enhancement techniques for poorly soluble drugs: a review. *Asian journal of pharmaceutical research and development*. 2020;8:75-78. DOI:0.22270/ajprd.v8i2.664.
8. Samylina I. A., Tencova A. I., Rudakova I. P., Il'ina I. G., Skachilova S. Ja., Shilova E. V. Biopharmaceutical aspects of pharmacopoeial substances. *Pharmacy*. 2012;8:29–32. (In Russ.)
9. Kovaleva E. L., Bagirova V. L., Shanazarov K. S. Developing methodological approaches to standardization of pharmaceuticals. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2010; 4(1):35–42. (In Russ.)
10. Bansal K., Pankaj P., Rao P. R. T., Sathapathy K. P. A., Kochhar P. S. Micronization and dissolution enhancement of norethindrone. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. 2011;1(3):315–319.
11. Kovaleva Ju. S., Zjablickaja N. K. Micronization of corticosteroid drugs and their use in medicine. *Jeffektivnaja farmakoterapija*. 2020;16(27):16–20. (In Russ.)
12. Date A. A., Halpert G., Babu T., Ortiz J., Kanvinde P., Dimitrion P., Narayan J., Zierden H., Betageri K., Musmanno O., Wiegand H., Huang X., Gumber S., Hanes J., Ensign L. M. Mucus-penetrating budesonide nanosuspension enema for local treatment of inflammatory bowel disease. *Biomaterials*. 2018;185:97–105. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.005.
13. Sabroso C., Moreno-Ortega A., Blanco A. J., Sánchez A. F., Cano-Abad M., Torres-Suarez A. Overcoming glucocorticoid resistances and improving antitumor therapies: lipid and polymers carriers. *Pharmaceutical research*. 2015;32:968–985. DOI: 10.1007/s11095-014-1510-4.
14. Kolik L. G., Zherdev V. P., Bojko S. S., Konstantinopol'skij M. A., Raskin S. Ju., Gudasheva T. A., Mart'janov V. A., Seredenin S. B. Experimental pharmacokinetics and pharmacodynamics of the substance of the dipeptide anxiolytic GB-115. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija*. 2016;11:42–46. (In Russ.)
15. Cyrino F. Z., Bottino D. A., Lerond L., Bouskela E. Micronization enhances the protective effect of purified flavonoid fraction against postischaemic microvascular injury in the hamster cheek pouch. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2004;31:159–162. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2004.03974.x.
16. Ivannikova E. V., Zherdev V. P., Bojko S. S., Blynskaja E. V., Turchinskaja K. G., Alekseev K. V. Study of pharmacokinetics and bioavailability in the creation of new original drugs with a peptide structure and their optimal dosage forms. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2013;2:1–17. (In Russ.)
17. Demchenko D. V., Dzhajn (Korsakova) E. A., Balaban'jan V. Ju., Makarova M. N., Makarov V. G. Development and Biopharmaceutical Evaluation of Tablets Based on the Poorly Water-soluble Substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. *Drug development & registration*. 2020;9(4):79-87. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87.
18. Arregui J. R., Kovvasu S. P., Kunamaneni P., Betageri G V. Carvedilol solid dispersion for enhanced oral bioavailability using rat model. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2019;9(12):042–050. DOI: 10.7324/JAPS.2019.91207.
19. Mohan A., Gundamaraju R. In vitro and in vivo evaluation of fast-dissolving tablets containing solid dispersion of lamotrigine. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2015;5(1):57–64. DOI: 10.4103/2230-973X.147235.

20. Rudakova I. P., Ilyina I. G., Skachilova S. Ya., Melentieva T. A., Mikhalev O. V., Samylina I. A. The polymorphism and properties of drugs. *Pharmacy*. 2009;(8):42–44. (In Russ.)
21. Gil'deeva G. N. Polymorphism: the influence on the quality of drugs and actual methods of analysis. *Good Clinical Practice*. 2017;1:56–60. (In Russ.)
22. Zanolla D., Perissutti B., Passerini N., Chierotti M. R., Hasa D., Voinovich D., Gigli L., Demitri N., Geremia S., Keiser J., Vioglio P. C., Albertini B. A new soluble and bioactive polymorph of praziquantel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;127:19–28. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.01.018.
23. Du W., Zhou Y., Gong Y., Zhao C. Investigation of physicochemical properties and in-vitro in-vivo evaluation of agomelatine polymorphs. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2013;8(3):181–190. DOI: 10.1016/j.ajps.2013.07.024.
24. Zhu X., Xu S., Lu L., Wang S., Zhao Q., Li D., Li J., Zhao H., Xu B. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of a polymorphic form of valnemulin hydrogen tartrate. *Journal of veterinary science*. 2019;20(2):e16. DOI: 10.4142/jvs.2019.20.e16.
25. Aleeva G. N., Zhuravleva M. V., Khafiz'yanova R. K. The role of excipients in determining the pharmaceutical and therapeutic properties of medicinal agents (Review). *Pharmaceutical chemistry journal*. 2009;43(4):230–234. DOI: 10.1007/s11094-009-0265-4.
26. Koo O. M. Y. Excipients-Application challenges and examples of new excipients in advanced drug delivery systems. *American pharmaceutical review*. 2011;14(2):60–68.
27. Alekseev K. V., Bueva V. V., Blynskaya E. V, Alekseev V. K., Adzyenko V. V. The role of excipients in solid dosage form during pharmaceutical development. *East European Scientific Journal*. 2019;9(49):48–52. (In Russ.)
28. Bochkov P. O., Shevchenko R. V., Litvin A. A., Kolyvanov G. B., Zherdev V. P. Factors, effecting on drug bioavailability. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2016;1:12–20. (In Russ.)
29. Vaithianathan S., Haidar S. H., Zhang X., Jiang W., Avon C., Dowling T. C., Shao C., Kane M., Hoag S. W., Flasar M. H., Ting T. Y., Polli J. E. Effect of common excipients on the oral drug absorption of biopharmaceutics classification system class 3 drugs cimetidine and acyclovir. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2016;105:996–1005. DOI: 10.1002/jps.24643.
30. Fathima N., Tirunagari M., Qureshi H. K., Nandagopal A., Rao J. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2011;1:66–71.
31. Mai Y., Dou L., Madla C. M., Murdan S., Basit A. W. Sex-dependence in the effect of pharmaceutical excipients: polyoxyethylated solubilising excipients increase oral drug bioavailability in male but not female rats. *Pharmaceutics*. 2019;11(5):228. DOI: 10.3390/pharmaceutics11050228.
32. Koehl N. J., Henze L. J., Bennett-Lenane H., Faisal W., Price D. J., Holm R., Kuentz M., Griffin B. T. In silico, in vitro, and in vivo evaluation of precipitation inhibitors in supersaturated lipid-based formulations of venetoclax. *Molecular pharmaceutics*. 2021;18(6):2174–2188. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00645.
33. Fransén N., Morin M., Björk E., Edsman K. Physicochemical interactions between drugs and superdesintegrants. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2008;60:1583–1589. DOI: 10.1211/jpp.60.12.0003.
34. Yoo S. D., Lee S.-H., Kang E., Jun H., Jung J.-Y., Park J. W., Lee K.-H. Bioavailability of itraconazole in rats and rabbits after administration of tablets containing solid dispersion particles. *Drug development and industrial pharmacy*. 2000;26(1):27–34. DOI: 10.1081/DDC-100100324.
35. Lee J.-H., Park C., Weon K.-Y., Kang C.-Y., Lee B.-J., Park J.-B. Improved Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drug by Targeting Increased Absorption through Solubility Enhancement and Precipitation Inhibition. *Pharmaceuticals*. 2021;14:1255. DOI: 10.3390/ph14121255.
36. Joseph D., Renjitham S. S. The development and process optimization of atorvastatin calcium and Naringin bilayer tablet to improve the bioavailability of atorvastatin calcium by two-level factorial design using Design-Expert®. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2020;1(6):070–077. DOI: 10.7324/japs.2021.110608.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-164-173
УДК 615.817

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Гипертоническая активность растворов для инъекций может являться причиной постинъекционных осложнений (обзор)

А. Л. Ураков[1, 2]✉, Н. А. Уракова[2], З. В. Шубина[2], Л. В. Ловцова[3], А. В. Самородов[4], К. Г. Гуревич[5], А. П. Столяренко[2], В. И. Корунас[4], Д. О. Липатов[4], Д. Д. Муминов[4]

[1] ФГБУН «Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (УдмФИЦ УрО РАН), 426067, Россия, г. Ижевск, ул. им. Татьяны Барамзиной, д. 34
[2] ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ (ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России), 426034, Россия, Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281
[3] ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России (ПИМУ), 603005, Россия, г. Нижний Новгород, площадь Минина и Пожарского, д. 10/1
[4] ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России), 450008, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3
[5] ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А. И. Евдокимова» Минздрава России), 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Ураков Александр Ливиевич. **E-mail:** urakoval@live.ru

ORCID: А. Л. Ураков – https://orcid.org/0000-0002-9829-9463; Н. А. Уракова - https://orcid.org/0000-0002-4233-9550;
З. В. Шубина – https://orcid.org/0000-0002-0932-0399; Л. В. Ловцова – https://orcid.org/0000-0003-1480-183X;
А. В. Самородов – https://orcid.org/0000-0001-9302-499X; К. Г. Гуревич – https://orcid.org/0000-0002-7603-6064;
А. П. Столяренко – https://orcid.org/0000-0002-0439-6546; В. И. Корунас – https://orcid.org/0000-0001-6809-5892;
Д. О. Липатов – https://orcid.org/0000-0002-3193-9008; Д. Д. Муминов – https://orcid.org/0000-0001-8585-8759.

Статья поступила: 04.05.2022 **Статья принята в печать:** 10.04.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Обзор научной литературы показал, что существующие стандарты оценки качества лекарств не включают оценку осмотической активности лекарственных растворов и их местное раздражающее действие на ткани в местах подкожных, внутримышечных и внутривенных инъекций. Поэтому в настоящее время растворы для инъекций, считающиеся качественными, могут не иметь изотоническую активность и высокую постинъекционную безопасность.

Текст. Изучение диапазона величины концентрации качественных лекарственных растворов, готовых для инъекции, показало, что допустимая величина концентрации основных ингредиентов находится в диапазоне 0,01 – 76 %. Проведенное прямое измерение с помощью осмометра величины осмотической активности лекарственных растворов для инъекций, считающихся сегодня качественными, показало, что растворы для инъекций могут иметь гипотоническую, изотоническую и гипертоническую активность, и их осмотическая активность может находится в диапазоне 0 – 3900 мосмоль/л воды. Исследование кислотной активности лекарственных растворов показало, что в соответствии с фармакопейными требованиями качества лекарств современные качественные лекарственные растворы, готовые для инъекции, могут иметь кислую, нейтральную или щелочную активность. Установлено, что растворы, имеющие гипертоническую активность, обладают местным раздражающим действием. Причем увеличение гипертонической активности лекарственных растворов увеличивает их местное раздражающее действие. Обнаружено, что чрезмерно большая гипертоническая активность лекарственных растворов может являться причиной развития локального постинъекционного осложнения, известного под названием «синдром Николау», причина которого длительное время оставалась неизвестной. Синдром Николау включает локальный болевой синдром, асептическое воспаление, некроз и абсцесс.

Заключение. Авторы провели анализ литературы, результаты которого позволили сделать выводы и предположения. Растворы, содержащие лекарственные средства в концентрации более 10 %, могут иметь наиболее высокую гипертоническую активность, которая может стать причиной чрезмерно сильного обезвоживающего, местного раздражающего и прижигающего действия. Поэтому инъекции таких лекарств наиболее опасны развитием постинъекционных некрозов и абсцессов. Именно поэтому разведение концентрированных лекарственных растворов в 2–10 раз водой или раствором 0,25%-го новокаина повышает безопасность инъекций. Предлагается внести данную рекомендацию в инструкцию по медицинскому применению высококонцентрированных лекарственных растворов и включить оценку осмотической активности и местного раздражающего действия лекарственных растворов в стандарт контроля качества лекарств.

Ключевые слова: раствор для инъекции, осмотическая активность, местное раздражающее действие, постинъекционный абсцесс, синдром Николау

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

Вклад авторов. А. Л. Ураков, Н. А. Уракова, З. В. Шубина и Л. В. Ловцова придумали и разработали концепцию и методологию исследования. А. П. Столяренко, В. И. Корунас, Д. О. Липатов и Д. Д. Муминов занимались сбором и анализом литературных данных. А. В. Самородов, К. Г. Гуревич занимались обработкой данных. А. Л. Ураков и Л. Г. Гуревич руководили работой. Н. А. Уракова и Л. В. Ловцова участвовали в написании статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

© Ураков А. Л., Уракова Н. А., Шубина З. В., Ловцова Л. В., Самородов А. В., Гуревич К. Г., Столяренко А. П., Корунас В. И., Липатов Д. О., Муминов Д. Д., 2023
© Urakov A. L., Urakova N. A., Shubina Z. V., Lovtsova L. V., Samorodov A. V., Gurevich K. G., Stolyarenko A. P., Korunas V. I., Lipatov D. O., Muminov D. D., 2023

Для цитирования: Ураков А. Л., Уракова Н. А., Шубина З. В., Ловцова Л. В., Самородов А. В., Гуревич К. Г., Столяренко А. П., Корунас В. И., Липатов Д. О., Муминов Д. Д. Гипертоническая активность растворов для инъекций может являться причиной постинъекционных осложнений. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):164–173. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-164-173

Hypertonic Activity of Injection Solutions Can Cause Post-injection Complications (Review)

Aleksandr L. Urakov[1, 2]✉, Natalya A. Urakova[2], Zinaida V. Shubina[2], Lubov V. Lovtsova[3], Aleksandr V. Samorodov[4], Konstantin G. Gurevich[5], Anastasia P. Stolyarenko[2], Vladislav I. Korunas[4], Danila O. Lipatov[4], Dior D. Muminov[4]

[1] Federal State Budgetary Institution of Science "Udmurt Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences", 34, them. Tatyana Baramzina str., Izhevsk, 426067, Russia
[2] Izhevsk State Medical Academy, 281, Kommunarov str., Izhevsk, Udmurt Republic, 426034, Russia
[3] Privolzhskiy Research Medical University, 10/1, Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia
[4] Bashkir State Medical University (BSMU), 3, Lenina str., Ufa, Republic of Bashkortostan, 450008, Russia
[5] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yevdokimov A. I. Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russia

✉ **Corresponding author:** Aleksandr L. Urakov. **E-mail:** urakoval@live.ru

ORCID: Aleksandr L. Urakov – https://orcid.org/0000-0002-9829-9463; Natalya A. Urakova - https://orcid.org/0000-0002-4233-9550;
Zinaida V. Shubina – https://orcid.org/0000-0002-0932-0399; Lubov V. Lovtsova – https://orcid.org/0000-0003-1480-183X;
Aleksandr V. Samorodov – https://orcid.org/0000-0001-9302-499X; Konstantin G. Gurevich – https://orcid.org/0000-0002-7603-6064;
Anastasia P. Stolyarenko – https://orcid.org/0000-0002-0439-6546; Vladislav I. Korunas – https://orcid.org/0000-0001-6809-5892;
Danila O. Lipatov – https://orcid.org/0000-0002-3193-9008; Dior D. Muminov – https://orcid.org/0000-0001-8585-8759.

Received: 04.05.2022 **Revised:** 10.04.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. A review of the scientific literature showed that the current standards for assessing the quality of drugs does not include an assessment of the osmotic activity of drug solutions and their local irritant effect on tissues at the sites of subcutaneous, intramuscular and intravenous injections. Therefore, currently injectable solutions considered to be of high quality may not have isotonic activity and high postinjection safety.

Text. A study of the concentration range of quality drug solutions ready for injection showed that the acceptable concentration value of the main ingredients is in the range of 0.01 to 76 %. Direct measurement with an osmometer of the osmotic activity of injection solutions, considered qualitative today, has shown that injection solutions can have hypotonic, isotonic and hypertonic activity and their osmotic activity can be in the range of 0 – 3900 mosmol/l water. Study of acidic activity of drug solutions showed that in accordance with pharmacopoeial requirements of drug quality modern quality drug solutions ready for injection can have acidic, neutral or alkaline activity. Solutions with hypertonic activity have been found to have a local irritant effect. Moreover, an increase in hypertonic activity of drug solutions increases their local irritant effect. It has been found that excessively high hypertonic activity of drug solutions may be the cause of the development of a local postinjection complication known as "Nicolaou syndrome", the cause of which has remained unknown for a long time. Nicolaou syndrome includes local pain syndrome, aseptic inflammation, necrosis, and abscess.

Conclusion. The authors conducted a literature review, the results of which led to conclusions and assumptions. Solutions containing drugs in concentrations greater than 10 % may have the highest hypertonic activity, which can cause excessive dehydrating, local irritating and cauterizing effects. Therefore, injections of such drugs are most dangerous with the development of post-injection necroses and abscesses. That is why timely dilution of concentrated drug solutions with water by 2–10 times increases injection safety. It is proposed to include the assessment of osmotic activity and local irritant effect of drug solutions in the standard of drug quality control.

Keywords: solution for injection, osmotic activity, local irritant effect, post-injection abscess, Nicolau's syndrome

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

Contribution of the authors. Aleksandr L. Urakov, Natalya A. Urakova, Zinaida V. Shubina and Lubov V. Lovtsova invented and developed the research concept and methodology. Anastasia P. Stolyarenko, Vladislav I. Korunas, Danila O. Lipatov and Dior D. Muminov collected and analyzed literary data. Aleksandr V. Samorodov and Konstantin G. Gurevich were engaged in data processing. Aleksandr L. Urakov and Konstantin G.Gurevich supervised the work. Natalya A. Urakova and Lubov V. Lovtsova were involved in writing the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Urakov A. L., Urakova N. A., Shubina Z. V., Lovtsova L. V., Samorodov A. V., Gurevich K. G., Stolyarenko A. P., Korunas V. I., Lipatov D. O., Muminov D. D. Hypertonic activity of injection solutions can cause post-injection complications. *Drug development & registration*. 2023;12(2):164–173. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-164-173

ВВЕДЕНИЕ

Специфическая фармакологическая активность основных ингредиентов, связанная с химическим строением их молекул, традиционно лежит в основе объяснения механизма действия лекарств [1–4]. При этом специфическое фармакологическое действие лекарственных средств принято рассматривать при резорбтивном их действии без конкретизации лекарственных форм, показателей качества и физико-химических свойств, которые могут отличать их друг от друга в разных сериях у одного производителя и у разных производителей (фармацевтических компаний) [5, 6]. К тому же при описании механизма

действия лекарств обычно не конкретизируется особенность фармакодинамики и фармакокинетики лекарств при местном применении, а также при изменении концентрации ингредиентов, других показателей качества лекарств и физико-химических факторов локального взаимодействия [1–4].

Стандартная информация о специфической фармакологической активности лекарств в большинстве случаев достаточна для традиционной фармакотерапии, основанной на резорбтивном действии лекарств. В то же время эта информация не всегда позволяет полностью объяснить все фармакологические эффекты, развивающиеся, в частности, при местном применении лекарств, включая развитие побочных эффектов и осложнений, развивающихся на путях их введения. На наш взгляд, игнорирование роли физико-химической активности лекарств длительное время не позволяет окончательно установить все причины развития редкого, но опасного ятрогенного заболевания, известного как синдром Николау [7–10].

Синдром Николау был описан в начале 1920-х годов как локальное постинъекционное осложнение, возникающее после внутримышечных инъекций солей висмута при лечении сифилиса [11]. Синдром Николау проявляется локальной болезненностью, асептическим воспалением, инфильтрацией, некрозом тканей и геморрагическим пятном в коже в месте инъекции. Через 2-3 дня в этом месте развивается постинъекционный абсцесс, а затем рубец [12–14]. С тех пор в литературе появилось много сообщений об этом заболевании. Установлено, что оно возникает после внутримышечных, внутрисуставных, внутривенных, подкожных и других инъекций растворов различных лекарственных средств из многих фармакологических групп [15–18].

В частности, показано, что синдром Николау развивается после инъекции таких лекарств, как нестероидные противовоспалительные средства (например, диклофенак натрия), стероидные противовоспалительные средства (например, триамцинолона ацетонид), антибиотики (например, бензилпенициллина натриевая соль), местные анестетики, антигистаминные препараты, вакцины, витамины (например, витамин К), противоэпилептические средства, полидоканол и пегилированный альфа-интерферон и другие лекарственные средства из многих фармакологических групп [12–23]. Тем не менее причина развития синдрома Николау остается не выясненной окончательно, а постинъекционная безопасность лекарств до сих пор остается малоизученной областью экспериментальной и клинической фармакологии [8, 24–26].

Сущность проблемы

Длительное время считалось, что готовые для инъекций растворы лекарственных средств имеют безупречное качество. Поэтому разница показателей качества лекарств, отличающая их друг от друга в разных номерах серий и у разных производителей, не рассматривалась как одна из возможных причин развития постинъекционных абсцессов и синдрома Николау. В частности, первоначально наиболее распространенным было мнение о том, что постинъекционные абсцессы возникают по вине медсестер, которые иногда ошибочно нарушают правила асептики и антисептики во время инъекций и вносят инфекцию в колотую рану [27–32]. Однако проведенные в последующем исследования и анализ полученных результатов не подтвердили роль инфицирования мест инъекций, как единственной причины развития этой ятрогенной болезни, и поставили под сомнение инфекционную теорию возникновения постинъекционных абсцессов [33]. Оказалось, что постинъекционные воспаления могут развиваться очень быстро и быть асептическими. Кроме этого, постинъекционные некрозы и абсцессы могут возникать в местах инъекций противоинфекционных средств (антибиотиков, антисептиков и дезинфицирующих средств) растворов, содержащих 10%-й натрия хлорида либо кальция хлорида, а также в местах инъекций прижигающих средств, которые препятствуют инфицированию колотых ран [21, 23, 25, 34].

Другой причиной развития синдрома Николау считалось использование коротких инъекционных игл, которые не обеспечивали инъекционное введение лекарственного раствора в скелетную мышцу [35, 36]. Поэтому для повышения безопасности инъекций предлагается использовать длинную инъекционную иглу. Кроме этого, сообщается, что для профилактики постинъекционного некроза и абсцесса следует сначала сделать инъекцию местного анестетика, а потом ввести стероид, антибиотик или иное лекарство [36].

Распространенной причиной синдрома Николау и его аналога – синдрома Ташона, – считалось развитие острого тромбоза (или спазма) артерий и вен, возникающих из-за случайного внутрисосудистого введения нерастворимого лекарственного средства (в частности, суспензии) [37, 38]. Поэтому для профилактики постинъекционных осложнений пытались применять спазмолитики и гепарин. Однако использование гепарина и спазмолитиков не предотвращало постинъекционный некроз и абсцесс [35, 36]. Кроме этого, не предотвращали развитие постинъекционного воспаления, некроза и абсцесса использование НПВС и стероидов [35]. Более того, инъекции растворов НПВС и глюкокортикоидов нередко сами вызывали развитие синдрома Николау и синдрома Ташона [12–14, 17–19, 37, 38]

В связи с этим в последние десятилетия лекарственные средства привлекли внимание исследователей как возможные виновники развития постинъекционных некрозов и абсцессов. Особенно пристальное внимание было обращено на лекарственные растворы, поскольку все лекарства вводились в организм в виде раствора для инъекций. Этому способствовали сообщения об особенностях местного

раздражающего действия некоторых лекарств при их местном применении в определенных лекарственных формах. Сообщалось, что местное раздражающее действие лекарств возникало не только за счет специфической фармакологической активности основных ингредиентов, но и за счет биологической активности, придаваемой лекарствам лекарственными формами. На примере таблеток и растворов для инъекций было убедительно показано, что лекарственные формы могут обладать биологической активностью, которая при местном применении лекарств может определять их механизм действия [39].

Дополнительно к этому появились сообщения о том, что местное действие растворов лекарственных средств определяется всеми ингредиентами, входящими в их состав, а также температурой, кислотной и осмотической активностью растворов [40]. Кроме этого, сообщалось, что постинъекционные осложнения возникают чаще при использовании комбинированных лекарств [41]. Также сообщалось о том, что лекарства с высокой концентрацией ингредиентов, гипертонической активностью и малыми значениями pH могут являться причиной их местного раздражающего действия и физико-химической агрессивности при местном применении [42–44].

Накопленные сведения привели к тому, что в начале XXI века исследователи обратили внимание на фармакопейные требования к контролю качества лекарств в лекарственной форме «раствор для инъекции», которые включают контроль рецептуры, концентрации каждого ингредиента и величины pH, но не включают контроль осмотической активности и местного раздражающего действия раствора на ткани при инъекциях [5]. Выяснено, что современные стандарты производства и контроля качества лекарств в лекарственной форме «раствор для инъекций» не обеспечивают лекарственным растворам щелочную активность с величиной pH 7,4 во всех номерах серий у всех производителей лекарств [6]. Дело в том, что длительное время общепринятое представление о кислотности лекарственных растворов было построено на делении лекарств на кислые и щелочные с отчетом от величины pH 7,0, опираясь на традиции неорганической химии. Только недавно было предложено деление лекарств, основанное на отличии кислотности лекарств от pH 7,35–7,55, то есть опираясь на основные показатели физиологии человека, так как значительная часть тканей организма человека имеет pH 7,4. Сообщается, что такое деление лекарств позволяет делить их на закисляющие, нормальные и ощелачивающие (RU Patent No. 2219958. 27.12.2003).

Параллельно появилось сообщение о кислотной и осмотической активности 200 лекарственных растворов, относящихся к разным фармакологическим группам, готовых для инъекций и считающихся качественными. Значения осмотической активности были определены с помощью осмометра, а величина pH – с помощью потенциометра (pH-метра). Результаты показали, что изученные растворы для инъекций не являются изотоническими и не имеют щелочную активность при pH 7,4 [45]. Все лекарства имели разную величину pH и очень многие растворы были кислыми. В свою очередь, одна часть лекарств имела гипотоническую активность, а другая часть – гипертоническую активность. Полученные результаты позволили заключить, что существующий стандарт контроля качества лекарств и законный перечень контролируемых показателей качества лекарств не обеспечивает всем «растворам для инъекции» изотоническую и изощелочную активность.

В то же время при оценке качества лекарств величина концентрации ингредиентов контролируется [5, 6]. В связи с этим было высказано предложение о том, что косвенным указанием уровня осмотической активности лекарственного раствора может служить величина их концентрации. Однако сложившаяся практика внутривенных, внутримышечных и подкожных инъекций не учитывает осмотическую активность растворов и величину концентрации лекарственных средств в них [46].

Следовательно, сложившаяся практика оценки качества лекарств не обеспечивает всем лекарственным растворам изотоническую и изощелочную активность. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что любое лекарство в той или иной серии (или партии) у того или иного производителя рано или поздно может иметь чрезмерно большую гипертоническую и/или кислотную активность, которая, в свою очередь, может стать причиной сильного местного раздражающего действия на ткани на путях введения лекарства или при его местном применении [42–44]. Поэтому тщательное изучение участия местного раздражающего действия лекарств в патогенезе постинъекционных осложнений является вполне обоснованным.

Связь между осмотической активностью и местным раздражающим действием лекарственных растворов

Первое сообщение о том, что причиной постинъекционных некрозов и абсцессов может быть чрезмерно высокая гипертоническая активность лекарственных растворов, которая оказывает сильное местное обезвоживающее действе на клетки тканей, что внешне проявляется местным раздражающим действием лекарств, появилось в 2002 году [45]. Исследования с использованием поросят показали, что химические и физико-химические свойства некоторых лекарственных растворов сильно отличаются от аналогичных свойств живых тканей, благодаря чему инъекции лекарств ведут к сильному местному раздражающему действию, асептическому воспалению, некрозу и абсцессу. На примере нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) было показано, что одна часть этих лекарств обладает местным раз-

дражающим действием из-за высокой концентрации ингредиентов и гипертонической активности, другая часть – из-за раздражающего и прижигающего действия вспомогательных ингредиентов, которые могут добавляться к НПВС некоторыми фармацевтическими компаниями. В лабораторных условиях с помощью осмометра было установлено, что раствор 50%-го метамизола натрия имеет осмотическую активность 4638 ± 12,5 мосмоль/л воды, то есть является гипертоническим раствором. В экспериментальных и клинических условиях было показано, что внутримышечные и подкожные инъекции раствора 50%-го метамизола натрия вызывали асептическое воспаление, некроз и абсцесс. Однако предварительное разведение раствора 50%-го метамизола натрия водой в 10 раз полностью предотвращало развитие постинъекционных некроза и абсцесса при подкожных и внутримышечных инъекциях [33]. При этом эффективность протекторного действия воды была объяснена ее физико-химической ролью в уменьшении концентрации ингредиентов и гипертоничсекой активности разведенного раствора метамизола натрия.

Эти же исследователи получили несколько иные данные при изучении постинъекционной безопасности других НПВС. В частности, оказалось, что раствор 5%-го кетопрофена для инъекций (ОАО «Синтез», Россия) и раствор 3%-го кеторола для инъекций (Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Индия) вызывали острое постинъекционное воспаление и некроз несмотря на низкую концентрацию основных ингредиентов и отсутствие чрезмерно высокой гипертонической активности. Исследование рецептур этих НПВС показало, что они являются растворами не только основного действующего вещества, но также и 40%-го пропиленгликоля. Поэтому именно наличие спирта пропиленгликоля в этой концентрации может являться причиной местного раздражающего и прижигающего действия растворов указанных НПВС при инъекциях.

Затем опыты на поросятах были продолжены, а полученные результаты позволили обнаружить противоядие пропиленгликоля и разработать способ предотвращения постинъекционного абсцесса при инъекции раствора 5%-го кетопрофена для инъекций (ОАО «Синтез», Россия) и раствора 3%-го кеторола для инъекций (Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Индия) и других аналогов диклофенака, содержащих пропиленгликоль. Сообщалось, что в роли такого антидота можно применять качественное лекарство – раствор 10%-го глюконата кальция, так как использование глюконата кальция обеспечивает его безопасное взаимодействие с пропиленгликолем и диклофенаком натрия в тканях пациента. При этом в случае неполного химического взаимодействия глюконата кальция остатки его дозы не вызывают постинъекционный некроз и абсцесс тканей. Сообщается, что в результате взаимодействия глюконата кальция с пропиленгликолем образуется соль пропиленгликолята кальция. В итоге концентрация спирта пропиленгликоля уменьшается до нуля, поэтому прижигающее действие спирта исчезает. Одновременно с этим глюконат кальция взаимодействует с диклофенаком натрия, в результате чего образуется нерастворимая соль диклофенака кальция, что также инактивирует этот ингредиент.

В частности, для предотвращения постинъекционного воспаления, некроза и абсцесса (синдрома Николау) при инъекциях указанных НПВС было предложено немедленно разбавлять раствор НПВС в тканях путем инъекций раствора 10%-го глюконата кальция в область лекарственного инфильтрата. Была установлена оптимальная доза антидота: объем вводимого раствора 10%-го глюконата кальция должен составлять 1/3 объема раствора НПВС. Также было показано, что для предотвращения некроза необходимо очень быстро инактивировать пропиленгликоль. Поэтому инъекция антидота должна быть осуществлена не позднее чем через 6 минут после инъекции НПВС (RU Patent No. 2326662, 20.06.2008).

Имеются сообщения о том, что растворы различных лекарственных средств с общей концентрацией ингредиентов менее 1 %, как правило, имеют осмотическую активность менее 280 мосмоль/л воды, то есть имеют гипотоническую активность. Такие лекарственные растворы при подкожных инъекциях и при инстилляциях в конъюнктивальную полость не вызывают воспаление необратимого характера и некроз тканей. С другой стороны, растворы, содержащие лекарственные средства в концентрации, превышающей 10 %, имели гипертоническую активность. Подкожные инъекции и инстилляции в конъюнктивальную полость таких лекарственных растворов вызывают чрезмерно сильное асептическое воспаление и некроз тканей. В частности, эти растворы при подкожных инъекциях вызывают постинъекционные абсцессы, а при закапывании в глаз – сильный блефароспазм и сильное и длительное слезотечение [33].

Таким образом, в лабораторных условиях российскими исследователями были изучены значения концентрации растворенных ингредиентов, осмотической и кислотной активности нескольких десятков готовых лекарственных растворов из разных фармакологических групп. В целом результаты показали, что в настоящее время готовые для инъекций лекарственные растворы имеют концентрацию растворенных ингредиентов в диапазоне от 0,01 до 76 %. Было показано, что самое меньшее значение концентрации имел раствор 0,01%-го клофелина для инъекций, а самое большое значение концентрации имел раствор 76%-го урографина. При этом осмотическая активность растворов находилась в диапазоне 0–3900 мосмоль/л воды [33].

В это же время было выяснено, что все лекарственные средства имеют разную осмотическую активность, но лидером по осмотической активности яв-

ляется группа лекарственных растворов, представляющих собой соли натрия. Было показано, что разные лекарственные растворы, представляющие собой соли натрия, обладают разной осмотической активностью при одинаковой концентрации. Так, 10%-е растворы натрия хлорида, натрия оксибутирата, урографина и маннита имеют осмотическую активность в пределах 2900 ± 10, 1650 ± 10, 620 ± 5 и 580 ± 5 мосмоль/л воды (соответственно) [33]. Указанные результаты позволили авторам сделать предположение о том, что качественные растворы солей у разных производителей и/или в разных номерах серий у одного производителя могут иметь отличия в значениях концентрации ингредиентов из-за допустимых пределов (в пределах сохранения качества). Именно поэтому даже изотонический раствор 0,9%-го натрия хлорида может иметь разную осмотическую активность в разных номерах серий одного производителя и/или у разных производителей [46].

Также было показано, что растворы, содержащие лекарственные средства из разных фармакологических групп в концентрации 10 %, оказывают разное местное раздражающее действие на ткани в местах инъекций [33]. Сообщалось, что наиболее сильное местное раздражающее действие оказывают инъекции растворов, содержащих по 10 % натрия хлорида, калия хлорида или кальция хлорида. Подкожные инъекции этих растворов, как правило, вызывают постинъекционные асептические воспаления, некрозы и абсцессы. Параллельно было показано, что растворы, имеющие суммарную концентрацию ингредиентов более 10 %, вызывают сильный и длительный блефароспазм, асептический конъюнктивит и повреждение эпителиоцитов конъюнктивы при закапывании в нее 1–2 капель. Было показано, что местное раздражающее действие развивается из-за чрезмерно большой гипертонической активности и обезвоживающего действия растворов. Сообщалось, что эти же лекарственные растворы при локальном взаимодействии с кровью вызывали повреждение эритроцитов (их сморщивание), а при подкожных инъекциях вызывали асептическое воспаление, некроз и абсцесс из-за чрезмерно сильного обезвоживающего действия на клетки тканей [33, 45]. Дело в том, что наружная мембрана эритроцитов, эпителиоцитов и других клеток имеет свойства полупроницаемой мембраны. Поэтому при появлении вокруг таких клеток гипертонических растворов лекарственных средств (растворов с высокой концентрацией ингредиентов) и увеличении осмотической активности внеклеточной жидкости внешние мембраны клеток экскретируют внутриклеточную воду наружу. Это ведет к обезвоживанию клеток, степень которого тем сильнее, чем выше гиперосмотическая активность внеклеточной жидкости.

Помимо этого, полученные авторами результаты свидетельствуют о том, что самую высокую гипертоническую активность (1620–3900 мосмоль/л воды) имели растворы, концентрация лекарственных средств в которых находилась в диапазоне 20–76 %. Причем разведение их водой в 2–20 раз уменьшало осмотическую активность также в 2–20 раз, а также уменьшало местное раздражающее, обезвоживающее и денатурирующее действие при их локальном применении путем инъекций и инстилляций в конъюнктивальную полость [33, 45]. К этому можно добавить следующее: в 2021 году появилось сообщение о том, что раствор 0,9%-го хлорида натрия для инъекций разных фармацевтических компаний и/или номеров серий (партий) имеет разную осмотическую активность [46].

Приведенные сообщения убеждают, что одной из причин острого постинъекционного локального осложнения, которое проявляется асептическим воспалением, некрозом и абсцессом тканей в местах инъекций лекарств, может быть чрезмерно сильное обезвоживающее действие лекарств на клетки тканей. Обезвоживающее действие оказывает чрезмерно большая гиперосмотическая активность (гипертоническая активность) лекарств, которую создает большая концентрация растворенных инредиентов. Дополнительной причиной может быть наличие в лекарственном растворе вспомогательных веществ с раздражающим и/или прижигающим действием. Обнаружено, что лекарственные растворы, содержащие ингредиенты в концентрации менее 1 %, являются гипотоническими растворами. Такие растворы лекарственных средств имеют высокую постинъекционную безопасность и не вызывают постинъекционные некрозы и абсцессы. Лекарственные растворы, содержащие ингредиенты в диапазоне 1–10 %, являются изотоническими либо слабыми гипотоническими или слабыми гипертоническими растворами. Такие растворы имеют умеренную постинъекционную безопасность. Растворы лекарственных средств, содержащие ингредиенты в диапазоне 10–76 %, являются сильными гипертоническими растворами и оказывают чрезмерно сильное обезвоживающее действие на клетки при локальном взаимодействии. В связи с этим растворы с суммарной концентрацией ингредиентов более 10 % являются чрезмерно гипертоническими и имеют чрезмерно низкую постинъекционную безопасность, так как их инъекции вызывают чрезмерно сильное обезвоживание клеток, некроз и абсцесс [33, 45].

Следовательно, некоторые растворы лекарственных средств, которые сегодня считаются высококачественными, могут обладать чрезмерно высокой гипертонической и/или гиперкислотной активностью, которая может являться причиной местного раздражающего действия. Чрезмерно сильное и/или длительное местное раздражающее действие может являться причиной воспаления необратимого характера, некроза и абсцесса. В связи с этим игнорирование фактических значений осмотической и кислотной активности лекарств в лекарственной форме

«раствор для инъекций» при инъекциях уменьшает постинъекционную безопасность лекарств. Поэтому для повышения постинъекцинной безопасности лекарственных средств предлагается контролировать осмотическую и кислотную активность и местное раздражающее действие лекарств на ткани в местах инъекций.

Способы предотвращения постинъекционных некрозов и абсцессов

Обзор научной литературы убеждает, что современные качественные лекарственные растворы для инъекции не всегда имеют изотоническую активность, слабую щелочную активность и высокую постинъекционную безопасность. Показано, что недостаточную безопасность и одновременно высокую физико-химическую агрессивность имеют гипертонические растворы, обусловленные содержанием ингредиентов в концентрации более 10 %, либо лекарства, содержащие в своем составе прижигающие средства. На примере НПВС было показано, что некоторые фармацевтические компании могут вводить в состав лекарственных растворов спирты, альдегиды, сильные кислоты и/или некоторые другие денатурирующие ингредиенты [33, 45]. В связи с этим инъекции таких растворов нарушают гомеостаз тканей до степени, несовместимой с их жизнедеятельностью. Именно поэтому после инъекций некоторых лекарственных средств, считающихся в настоящее время качественными, иногда развивается асептическое воспаление, сходное по всем признакам с воспалением, возникающим при введении гипертонического раствора 10%-го хлорида натрия, дезинфицирующего раствора формальдегида или раствора 96%-го этилового спирта [34, 47, 48].

Не исключено, что физико-химические свойства лекарственных растворов могут лежать в основе местного раздражающего действия лекарств при инъекциях и быть причиной развития таких локальных постинъекционных осложнений, как асептическое воспаление, некроз и абсцесс, а также являться причиной развития синдрома Николау. Гипотеза причинности развития постинъекционных осложнений от физико-химической агрессивности лекарств подтверждается не только исследованием концентрации и состава ингредиентов, осмотической активности лекарств и развитием постинъекционных некрозов и абсцессов на бодрствующих поросятах, но и результатами многолетней ветеринарной химической кастрации самцов различных животных, достигаемой денатурирующим действием на их яички с помощью инъекций прижигающих средств. Сообщается, что в ветеринарии с этой целью используется раствор 5-, 10- или 20%-го хлорида кальция, раствор 3,5%-го формалина в фосфатно-солевом буфере, раствор 50%-го диметилсульфоксида, раствор 100%-го этанола и многие другие прижигающие средства [34, 47, 48]. Иногда их комбинируют с местными анестетиками, которые уменьшают болевой синдром, но не устраняют постинъекционный некроз (прижигающее действие).

Другое мнение о причинности обширного некроза тканей, особенно в ягодицах, сводится к убеждению в том, что причиной абсцесса является короткая инъекционная игла, конец которой не достигает мускулатуры и поэтому вводимый лекарственный раствор не проникает в мышцу. Поэтому для повышения безопасности инъекций предлагается использовать длинную инъекционную иглу. Однако медицинская практика показывает, что длинные инъекционные иглы не предотвращают полностью постинъекционные некрозы и абсцессы [36, 40].

В то же время было показано, что инфракрасная термография кожи в месте инъекции позволяет своевременно диагностировать начало развития локальных постинъекционных осложнений. Дело в том, что формирование очага асептического воспаления, инфильтрата и некроза сопровождается повышением локальной температуры. В связи с этим инфракрасный мониторинг температуры кожи в месте инъекции был предложен для оценки постинъекционной безопасности лекарственных растворов (RU Patent No. 2304769, 20.08.2007; RU Patent No. 2396562, 10.08.2010).

В описании указанных изобретений сообщалось, что дополнение процесса инъекции лекарства инфракрасной термографией дает возможность не только выявлять локальную гипертермию и процесс постинъекционного воспаления, но и своевременно предотвращать развитие постинъекционного некроза и абсцесса. Сообщается, что для этого при появлении локальной гипертермии после инъекции необходимо срочно (в течение 5 минут после инъекции) обколоть лекарственный инфильтрат раствором 0,25%-го новокаина либо водой для инъекции (RU Patent No. 2333001, 10.09.2008). Показано, что такой способ обеспечивает своевременную нормализацию осмотической и кислотной активности лекарственного раствора внутри тканей, поэтому сохраняет обратимый характер асептического воспаления и предотвращает развитие некроза. Указывается и на то, что увеличение периода времени между инъекцией и обкалыванием лекарственного инфильтрата гипотоническим раствором новокаина более 5 минут уменьшает эффективность способа (RU Patent No. 2328318, 10.07.2008). Кроме этого, предлагается срочно охлаждать ткани в месте инъекции (RU Patent No. 2340361, 10.12.2008).

В то же время сообщается, что постинъекционный некроз и абсцесс в месте подкожной инъекции гипертонического раствора практически любого лекарственного средства можно предотвратить с помощью немедленной инъекции в медикаментозный инфильтрат воды для инъекции (не позднее 5–6 минут после инъекции). При этом было показано, что постинъекционная безопасность растворов 10%-го

кальция хлорида и 10%-го кальция глюконата может быть более надежно повышена с помощью стандартных растворов натрия цитрата и динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (RU Patent No. 2277415, 10.06.2006; RU Patent No. 2326662, 20.06.2008). Дело в том, что растворы натрия цитрата и ЭДТА не только разбавляют растворы кальция за счет своего растворителя (воды), но и полностью инактивируют катионы кальция (Ca^{2+}) за счет превращения в нерастворимую соль цитрат кальция (в первом случае) и за счет образования клещевидного (хелатного) соединения этилендиаминтетраацетата кальция (во втором случае).

Кроме этого, постинъекционный некроз и абсцесс можно предотвратить с помощью предварительного разведения высококонцентрированного и гипертонического лекарственного раствора вплоть до придания ему изотонической активности (RU Patent No. 2625735, 18.07.2017).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Авторы провели анализ литературы, результаты анализа позволили сделать некоторые выводы и предположения. Обзор литературы показал, что одной из причин развития постинъекционных воспалений, некрозов и абсцессов может являться чрезмерно высокая гипертоническая и/или кислотная активность качественных лекарств в лекарственной форме «раствор для инъекции». Сообщается, что растворы, содержащие ингредиенты в концентрации более 10 %, могут иметь чрезмерно высокую гипертоническую активность, которая может стать причиной постинъекционных некрозов и абсцессов. Показано, что устранение гипертонической активности высококонцентрированных лекарственных растворов путем их разведения в 2–10 раз водой или раствором 0,25%-го новокаина исключает развитие постинъекционных некрозов и абсцессов. Поэтому имеются основания для внесения данной рекомендации в инструкцию по медицинскому применению высококонцентрированных лекарственных растворов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Харкевич Д. А. Основы фармакологии: учебник. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015. 720 с.
2. Кукес В. Г., Сычев Д. А. Клиническая фармакология. 5-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017. 1024 с.
3. Аляутдин Р. Н., Преферанская Н. Г., Преферанский Н. Г. Фармакология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2020. 704 с.
4. Katzung B., Trevor A. Basic and Clinical Pharmacology. 15th ed. NY: McGraw Hill / Medical; 2020. 1328 p.
5. Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 2013: USP 36; The National Formulary: NF 31. Rockville: Pharmacopeial Convention; 2013.
6. Лекарственные средства синтетического и минерального происхождения. Государственная фармакопея Российской Федерации. Том 3. XIV издание. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2018. 1927 с.
7. Senel E., Ada S., Güleç A. T., Cağlar B. Nicolau syndrome aggravated by cold application after i.m. diclofenac. *The Journal of Dermatology*. 2008;35(1):18–20. DOI: 10.1111/j.1346-8138.2007.00404.x.
8. Adil M., Amin S. S., Arif T. Nicolau's syndrome: A rare but preventable iatrogenic disease. *Acta Dermatovenerologica Croatica: ADC*. 2017;25(3):251–253.
9. Sasmal P. K., Sahoo A., Singh P. K., Vs V. Nicolau Syndrome: An Unforeseen Yet Evadable Consequence of Intramuscular Injection. *The Surgery Journal*. 2021;7(2):e62–e65. DOI: 10.1055/s-0041-1728652.
10. Седов В. М., Андреев Д. Ю., Парамонов Б. А., Мухтарова А. М., Клюжник А. Ю. Синдром Николау как осложнение склеротерапии вен нижних конечностей. *Вестник хирургии имени И. И. Грекова*. 2010;6:92–94.
11. Nicolau S. Dermite livédoïde et gangréneuse de la fesse, consécutive aux injections intra-musculaires, dans la syphilis: à propos d'un cas d'embolie artérielle bismuthique. *Ann Mal Vener*. 1925;11:321–339.
12. Mojarrad P., Barikbin B., Oghazian M. B. Can betamethasone prevent Nicolau syndrome when coadministered with penicillin? A case report. *Clinical Case Reports*. 2021;9(12):e05187. DOI: 10.1002/ccr3.5187.
13. Kılıç İ., Kaya F., Özdemir A. T., Demirel T., Çelik İ. Nicolau syndrome due to diclofenac sodium (Voltaren®) injection: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2014;8:404. DOI: 10.1186/1752-1947-8-404.
14. Lardelli P. F., Jermini L., Milani G. P., Peeters G., Ramelli G. P., Zgraggen L., Terrani I., Bianchetti M. G., Vanoni F., Faré P. B., Lava S. Nicolau syndrome caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Systematic literature review. *International Journal of Clinical Practice*. 2020;74(10):e13567. DOI: 10.1111/ijcp.13567.
15. Luton K., Garcia C., Poletti E., Koester G. Nicolau Syndrome: three cases and review. *International Journal of Dermatology*. 2006;45(11):1326–1328. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2006.02674.x.
16. Okan G., Canter H. I. Nicolau syndrome and perforator vessels: a new viewpoint for an old problem. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2010;29(1):70–72. DOI: 10.3109/15569520903496753 .
17. Pruksakorn D., Lorsomradee S., Phanphaisarn A., et al. Safety and efficacy of intralesional steroid injection for aggressive fibromatosis. *World Journal of Surgical Oncology*. 2017;15(1):195. DOI: 10.1186/s12957-017-1262-9.
18. Sinniah A., Yazid S., Flower R. J. From NSAIDs to glucocorticoids and beyond. *Cells*. 2021;10(12):3524. DOI: 10.3390/cells10123524.
19. Dasari C. S., Jegadeesan R., Patel H. K., Desai M., Aziz M., Thoguluvachandrasekar V., Duvvuri A., Kohli D. R., Repici A., Siersema P. D., Sharma P. Intralesional steroids and endoscopic dilation for anastomotic strictures after esophagectomy: systematic review and meta-analysis. *Endoscopy*. 2020;52(9):721–726. DOI: 10.1055/a-1172-5975.
20. Van Hal A. R. L., Pulvirenti R., den Hartog F. P. J., Vlot J. The Safety of Intralesional Steroid Injections in Young Children and Their Effectiveness in Anastomotic Esophageal Strictures – A Meta-Analysis and Systematic Review. *Frontiers in Pediatrics*. 2022;9. DOI: 10.3389/fped.2021.825030.
21. Bozkaya T. A., Demirel G., Ormeci T., Al S., Çakar E., Tastekin A., Turkoglu H. Anticoagulant and vasodilator therapy for Nicolau syndrome following intramuscular benzathine penicillin injection in a 4 year old boy. *Archivos Argentinos de Pediatria*. 2016;114(3):e184–e186. DOI: 10.5546/aap.2016.eng.e184.
22. Arif T., Dorjay K. Extensive Nicolau Syndrome Following Intramuscular Injection of Paracetamol in a Patient Who Is HIV Positive. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2018;11(3):136–139. DOI: 10.4103/JCAS.JCAS_53_18.
23. Phiri W., Musonda M. S., Kyakilika K., Miyoba M. H., Malumani M. Nicolau syndrome following intramuscular benzathine penicillin injection: a case report. *Pan African Medical Journal*. 2020;37:276. DOI: 10.11604/pamj.2020.37.276.21850.
24. Raju B., Ashraf O., Jumah F., Appaji Gowda N. M., Gupta G., Sun H., Nanda A. Nicolau syndrome, masquerader of postinjection sciatic nerve injury: Case report and review of literature. *World Neurosurgery*. 2020;143:51–55. DOI: 10.1016/j.wneu.2020.07.029.
25. Tougouma S. J.-B., Soulama M., Konate I., Tapsoba E., Yameogo N. V., Dakoure P. Ischémie aiguë de membre sévère sanctionnée par désarticulation de sauvetage dans un contexte de syndrome de Nicolau suite à une injection intramusculaire de pénicilline: à propos d'un cas. *Pan African Medical Journal*. 2020;37:378. (In French.) DOI: 10.11604/pamj.2020.37.378.21384.

26. Esme P., Gahramanov I., Akıncıoglu E., Akoglu G. Nicolau syndrome following subcutaneous glatiramer acetate injection: A case report and review of the literature. *Indian Journal of Pharmacology*. 2021;53(6):489–492. DOI: 10.4103/ijp.ijp_166_21.
27. Gremillion D. H., Mursch S. B., Lerner C. J. Injection site abscesses caused by Mycobacterium chelonei. *Infection control: IC*. 1983; 4(1):25–28. DOI: 10.1017/s019594170005760x.
28. Olson R. K., Voorhees R. E., Eitzen H. E., Rolka H., Sewell C. M. Cluster of postinjection abscesses related to corticosteroid injections and use of benzalkonium chloride. *The Western Journal of Medicine*. 1999;170(3):143–147.
29. Alvi A. R., Ur Rehman Z., Nabi Z. U. Pyogenic psoas abscess: case series and literature review. *Tropical Doctor*. 2010;40(1):56–58. DOI: 10.1258/td.2009.090212.
30. Baxi S. M., Gandhi M. An incidental abscess in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Infectious diseases in clinical practice*. 2012;20(6):407. DOI: 10.1097/IPC.0b013e318264132a.
31. Routier E., Bularca S., Sbidian E., Roujeau J.-C., Bagot M. Abcès du psoas à streptocoques bêta-hémolytique du groupe A à point de départ cutané: deux cas. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. 2010;137(5):369–372. (In French.) DOI: 10.1016/j.annder.2010.02.020.
32. Joshi B., Ghotra M. K., Gorsi U., Saha S. C., Sikka P. Post Caesarean section deep pelvic abscess: CT guided transgluteal drainage. *Cureus*. 2022;14(1):e21156. DOI: 10.7759/cureus.21156.
33. Ураков А. Л., Уракова Н. А., Козлова Т. С. Локальная токсичность лекарств как индикатор их вероятной агрессивности при местном применении. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2011;(1):105–108.
34. Jana K., Samanta P. K. Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. *BMC Veterinary Research*. 2011;7:39. DOI: 10.1186/1746-6148-7-39.
35. Терешкина Н. В., Снегирева И. И., Дармостукова М. А. Возможные причины и меры по минимизации рисков развития абсцессов после прививки АКДС-вакциной. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2021;9(1):3–14. DOI: 10.30895/2312-7821-2021-9-1-3-14.
36. Holland C., Jaeger L., Smentkowski U., Weber B., Otto C. Septic and aseptic complications of corticosteroid injections: an assessment of 278 cases reviewed by expert commissions and mediation boards from 2005 to 2009. *Deutsches Arzteblatt International*. 2012;109(24):425–430. DOI: 10.3238/arztebl.2012.0425.
37. Berthelot J.-M., Tortellier L., Guillot P., Prost A., Caumon J.-P., Glemarec J., Maugars Y. Tachon's syndrome (suracute back and/or thoracic pain following local injections of corticosteroids). A report of 318 French cases. *Joint Bone Spine*. 2005;72(1):66–68. DOI: 10.1016/j.jbspin.2004.01.005.
38. Rekik S., Boussaid S., Abla H. B., Cheour I., Ben Amor M., Elleuch M. Tachon Syndrome: Rare Side Effect of Articular Injections of Corticosteroids. A Report of Two Cases. *Drug Safety – Case Reports*. 2017;4(1):20. DOI: 10.1007/s40800-017-0062-z.
39. Kasatkin A. A., Urakov A. L., Lukoyanov I. A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs causing local inflammation of tissue at the site of injection. *J Pharmacology Pharmacotherapeutics*. 2016;7(1):26–28. DOI: 10.4103/0976-500x.179359.
40. Anesthesia Secrets. James Duke editor. Fourth Edition. Amsterdam: Elsevier Health Sciences; 2011. 592 p.
41. Карева Е. Н., Олейникова О. М., Сереброва С. Ю., Кононова И. Н., Булгакова В. А., Шипилова С. Ю., Бондарчук Н. Г., Борлакова М. С., Яровой С. К. Побочные эффекты нестероидных противовоспалительных средств и пути их профилактики. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(3): 33–44. DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-3-33-44.
42. Ceilley R. I. Advances in topical delivery systems in acne: new solutions to address concentration dependent irritation and dryness. *Skinmed*. 2011;9(1):15–21.
43. Bucks D., Sarpotdar P., Yu K., Angel A., Del Rosso J. The development and optimization of a fixed combination of clindamycin and benzoyl peroxide aqueous gel. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD*. 2009;8(7):634–638.
44. Gonzalez P., Vila R., Cirigliano M. The tolerability profile of clindamycin 1%/benzoyl peroxide 5% gel vs. adapalene 0.1%/benzoyl peroxide 2.5% gel for facial acne: results of a randomized, single-blind, split-face study. *Journal of Cosmetic Bermatology*. 2012;11(4):251–260. DOI: 10.1111/jocd.12013.
45. Корепанова М. В., Коровяков А. П., Уракова Н. А., Ураков А. Л. Осмотическая активность готовых растворов лекарственных средств как показатель их качества. *Успехи современного естествознания*. 2002;2:95–95.
46. Mertzlufft F., Brettner F., Crystal G. J., Hollmann M. W., Kasatkin A., Lönnqvist P. A., Singer D., Sümpelmann R., Wenzel V., Zander R., Ziegenfuß T. Intravenous fluids: issues warranting concern. *Eur. J. Anaesthesiol*. 2021;38:1–3. DOI: 10.1097/EJA.0000000000001568.
47. Kutzler M. A. Intratesticular and intraepididymal injections to sterilize male cats: From calcium chloride to zinc gluconate and beyond. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2015;17(9):772–776. DOI: 10.1177/1098612X1559 4991.
48. Ibrahim A., Ali M. M., Abou-Khalil N. S., Ali M. F. Evaluation of chemical castration with calcium chloride versus surgical castration in donkeys: testosterone as an endpoint marker. *BMC Veterinary Research*. 2016;12:46. DOI: 10.1186/s12917-016- 0670-3.

REFERENCES

1. Harkevich D. A. Fundamentals of pharmacology: textbook. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2015. 720 p. (In Russ.)
2. Kukes V. G., Sychev D. A. Clinical pharmacology. 5th ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. 1024 p. (In Russ.)
3. Aljautdin R. N., Preferanskaja N. G., Preferanskij N. G. Pharmacology. Moscow: GEOTAR-Media; 2020. 704 p. (In Russ.)
4. Katzung B., Trevor A. Basic and Clinical Pharmacology. 15th ed. NY: McGraw Hill / Medical; 2020. 1328 p.
5. Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 2013: USP 36; The National Formulary: NF 31. Rockville: Pharmacopeial Convention; 2013.
6. Medicinal products of synthetic and mineral origin. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Volume 3. XV edition. Moscow: Scientific Center for the Examination of Medical Products; 2018. 1927 p. (In Russ.)
7. Senel E., Ada S., Güleç A. T., Cağlar B. Nicolau syndrome aggravated by cold application after i.m. diclofenac. *The Journal of Dermatology*. 2008;35(1):18–20. DOI: 10.1111/j.1346-8138.2007.00404.x.
8. Adil M., Amin S. S., Arif T. Nicolau's syndrome: A rare but preventable iatrogenic disease. *Acta Dermatovenerologica Croatica: ADC*. 2017;25(3):251–253.
9. Sasmal P. K., Sahoo A., Singh P. K., Vs V. Nicolau Syndrome: An Unforeseen Yet Evadable Consequence of Intramuscular Injection. *The Surgery Journal*. 2021;7(2):e62–e65. DOI: 10.1055/s-0041-1728652.
10. Sedov V. M., Andreev D. Ju., Paramonov B. A., Muhtarova A. M., Kljuzhnik A. Ju. Nicolau's syndrome as a complication of sclerotherapy of the veins of the lower extremities. *Grekov's Bulletin of Surgery*. 2010;6:92–94. (In Russ.)
11. Nicolau S. Dermite livédoïde et gangréneuse de la fesse, consécutive aux injections intra-musculaires, dans la syphilis: à propos d'un cas d'embolie artérielle bismuthique. *Ann Mal Vener*. 1925;11:321–339.
12. Mojarrad P., Barikbin B., Oghazian M. B. Can betamethasone prevent Nicolau syndrome when coadministered with penicillin? A case report. *Clinical Case Reports*. 2021;9(12):e05187. DOI: 10.1002/ccr3.5187.
13. Kılıç İ., Kaya F., Özdemir A. T., Demirel T., Çelik İ. Nicolau syndrome due to diclofenac sodium (Voltaren®) injection: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2014;8:404. DOI: 10.1186/1752-1947-8-404.
14. Lardelli P. F., Jermini L., Milani G. P., Peeters G., Ramelli G. P., Zgraggen L., Terrani I., Bianchetti M. G., Vanoni F., Faré P. B., Lava S. Nicolau syndrome caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Systematic literature review. *International Journal of Clinical Practice*. 2020;74(10):e13567. DOI: 10.1111/ijcp.13567.
15. Luton K., Garcia C., Poletti E., Koester G. Nicolau Syndrome: three cases and review. *International Journal of Dermatology*. 2006;45(11):1326–1328. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2006.02674.x.
16. Okan G., Canter H. I. Nicolau syndrome and perforator vessels: a new viewpoint for an old problem. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2010;29(1):70–72. DOI: 10.3109/15569520903496753 .

17. Pruksakorn D., Lorsomradee S., Phanphaisarn A., et al. Safety and efficacy of intralesional steroid injection for aggressive fibromatosis. *World Journal of Surgical Oncology*. 2017;15(1):195. DOI: 10.1186/s12957-017-1262-9.
18. Sinniah A., Yazid S., Flower R. J. From NSAIDs to glucocorticoids and beyond. *Cells*. 2021;10(12):3524. DOI: 10.3390/cells10123524.
19. Dasari C. S., Jegadeesan R., Patel H. K., Desai M., Aziz M., Thoguluvachandrasekar V., Duvvuri A., Kohli D. R., Repici A., Siersema P. D., Sharma P. Intralesional steroids and endoscopic dilation for anastomotic strictures after esophagectomy: systematic review and meta-analysis. *Endoscopy*. 2020;52(9):721–726. DOI: 10.1055/a-1172-5975.
20. Van Hal A. R. L., Pulvirenti R., den Hartog F. P. J., Vlot J. The Safety of Intralesional Steroid Injections in Young Children and Their Effectiveness in Anastomotic Esophageal Strictures – A Meta-Analysis and Systematic Review. *Frontiers in Pediatrics*. 2022;9. DOI: 10.3389/fped.2021.825030.
21. Bozkaya T. A., Demirel G., Ormeci T., Al S., Çakar E., Tastekin A., Turkoglu H. Anticoagulant and vasodilator therapy for Nicolau syndrome following intramuscular benzathine penicillin injection in a 4 year old boy. *Archivos Argentinos de Pediatria*. 2016;114(3):e184–e186. DOI: 10.5546/aap.2016.eng.e184.
22. Arif T., Dorjay K. Extensive Nicolau Syndrome Following Intramuscular Injection of Paracetamol in a Patient Who Is HIV Positive. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2018;11(3):136–139. DOI: 10.4103/JCAS.JCAS_53_18.
23. Phiri W., Musonda M. S., Kyakilika K., Miyoba M. H., Malumani M. Nicolau syndrome following intramuscular benzathine penicillin injection: a case report. *Pan African Medical Journal*. 2020;37:276. DOI: 10.11604/pamj.2020.37.276.21850.
24. Raju B., Ashraf O., Jumah F., Appaji Gowda N. M., Gupta G., Sun H., Nanda A. Nicolau syndrome, masquerader of postinjection sciatic nerve injury: Case report and review of literature. *World Neurosurgery*. 2020;143:51–55. DOI: 10.1016/j.wneu.2020.07.029.
25. Tougouma S. J.-B., Soulama M., Konate I., Tapsoba E., Yameogo N. V., Dakoure P. Ischémie aiguë de membre sévère sanctionnée par désarticulation de sauvetage dans un contexte de syndrome de Nicolau suite à une injection intramusculaire de pénicilline: à propos d'un cas. *Pan African Medical Journal*. 2020;37:378. (In French.) DOI: 10.11604/pamj.2020.37.378.21384.
26. Esme P., Gahramanov I., Akıncıoglu E., Akoglu G. Nicolau syndrome following subcutaneous glatiramer acetate injection: A case report and review of the literature. *Indian Journal of Pharmacology*. 2021;53(6):489–492. DOI: 10.4103/ijp.ijp_166_21.
27. Gremillion D. H., Mursch S. B., Lerner C. J. Injection site abscesses caused by Mycobacterium chelonei. *Infection control: IC*. 1983; 4(1):25–28. DOI: 10.1017/s019594170005760x.
28. Olson R. K., Voorhees R. E., Eitzen H. E., Rolka H., Sewell C. M. Cluster of postinjection abscesses related to corticosteroid injections and use of benzalkonium chloride. *The Western Journal of Medicine*. 1999;170(3):143–147.
29. Alvi A. R., Ur Rehman Z., Nabi Z. U. Pyogenic psoas abscess: case series and literature review. *Tropical Doctor*. 2010;40(1):56–58. DOI: 10.1258/td.2009.090212.
30. Baxi S. M., Gandhi M. An incidental abscess in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Infectious diseases in clinical practice*. 2012;20(6):407. DOI: 10.1097/IPC.0b013e318264132a.
31. Routier E., Bularca S., Sbidian E., Roujeau J.-C., Bagot M. Abcès du psoas à streptocoques bêta-hémolytique du groupe A à point de départ cutané: deux cas. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. 2010;137(5):369–372. (In French.) DOI: 10.1016/j.annder.2010.02.020.
32. Joshi B., Ghotra M. K., Gorsi U., Saha S. C., Sikka P. Post Caesarean section deep pelvic abscess: CT guided transgluteal drainage. *Cureus*. 2022;14(1):e21156. DOI: 10.7759/cureus.21156.
33. Urakov A. L., Churakova N. A., Kozlova T. S. Local toxicity of drugs as an indicator of their probable aggressiveness when applied topically. *Vestnik ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki*. 2011;(1):105-108. (In Russ.)
34. Jana K., Samanta P. K. Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. *BMC Veterinary Research*. 2011;7:39. DOI: 10.1186/1746-6148-7-39.
35. Tereshkina N. V., Snegireva I. I., Darmostukova M. A. Possible Causes of and Measures to Minimise Risks of Abscesses Following DTP Vaccination. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2021;9(1):3–14. (In Russ.) DOI: 10.30895/2312-7821-2021-9-1-3-14.
36. Holland C., Jaeger L., Smentkowski U., Weber B., Otto C. Septic and aseptic complications of corticosteroid injections: an assessment of 278 cases reviewed by expert commissions and mediation boards from 2005 to 2009. *Deutsches Arzteblatt International*. 2012;109(24):425–430. DOI: 10.3238/arztebl.2012.0425.
37. Berthelot J.-M., Tortellier L., Guillot P., Prost A., Caumon J.-P., Glemarec J., Maugars Y. Tachon's syndrome (suracute back and/or thoracic pain following local injections of corticosteroids). A report of 318 French cases. *Joint Bone Spine*. 2005;72(1):66–68. DOI: 10.1016/j.jbspin.2004.01.005.
38. Rekik S., Boussaid S., Abla H. B., Cheour I., Ben Amor M., Elleuch M. Tachon Syndrome: Rare Side Effect of Articular Injections of Corticosteroids. A Report of Two Cases. *Drug Safety – Case Reports*. 2017;4(1):20. DOI: 10.1007/s40800-017-0062-z.
39. Kasatkin A. A., Urakov A. L., Lukoyanov I. A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs causing local inflammation of tissue at the site of injection. *J Pharmacology Pharmacotherapeutics*. 2016;7(1):26–28. DOI: 10.4103/0976-500x.179359.
40. Anesthesia Secrets. James Duke editor. Fourth Edition. Amsterdam: Elsevier Health Sciences; 2011. 592 p.
41. Kareva E. N., Oleinikova O. M., Serebrova S. Yu., Kononova I. N., Bulgakova V. A., Shipilova S. Yu., Bondarchuk N. G., Borlakova M. S., Yarovoy S. K. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and how to prevent them. *Experimental and clinical pharmacology*. 2022;85(3):33–44. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-3-33-44.
42. Ceilley R. I. Advances in topical delivery systems in acne: new solutions to address concentration dependent irritation and dryness. *Skinmed*. 2011;9(1):15–21.
43. Bucks D., Sarpotdar P., Yu K., Angel A., Del Rosso J. The development and optimization of a fixed combination of clindamycin and benzoyl peroxide aqueous gel. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD*. 2009;8(7):634–638.
44. Gonzalez P., Vila R., Cirigliano M. The tolerability profile of clindamycin 1%/benzoyl peroxide 5% gel vs. adapalene 0.1%/benzoyl peroxide 2.5% gel for facial acne: results of a randomized, single-blind, split-face study. *Journal of Cosmetic* B*ermatology*. 2012;11(4):251–260. DOI: 10.1111/jocd.12013.
45. Korepanova M. V., Korovyakov A. P., Urakova N. A., Urakov A. L. Osmotic activity of finished solutions of medicines as an indicator of their quality. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2002;2:95–95. (In Russ.)
46. Mertzlufft F., Brettner F., Crystal G. J., Hollmann M. W., Kasatkin A., Lönnqvist P. A., Singer D., Sümpelmann R., Wenzel V., Zander R., Ziegenfuß T. Intravenous fluids: issues warranting concern. *Eur. J. Anaesthesiol*. 2021;38:1–3. DOI: 10.1097/EJA.0000000000001568.
47. Kutzler M. A. Intratesticular and intraepididymal injections to sterilize male cats: From calcium chloride to zinc gluconate and beyond. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2015;17(9):772–776. DOI: 10.1177/1098612X1559 4991.
48. Ibrahim A., Ali M. M., Abou-Khalil N. S., Ali M. F. Evaluation of chemical castration with calcium chloride versus surgical castration in donkeys: testosterone as an endpoint marker. *BMC Veterinary Research*. 2016;12:46. DOI: 10.1186/s12917-016- 0670-3.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-174-184
УДК 615.244:636.2.034

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Влияние агониста фарнезоидного Х-рецептора на постпрандиальную липемию у крыс, получающих рацион, содержащий супрафизиологическую дозу жиров

Ю. Н. Алехин[1], О. С. Попова[2], В. С. Понамарёв[2]✉, П. А. Паршин[1]

[1] ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» (ФГБНУ «ВНИВИПФиТ»), 394087, Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 1146
[2] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (СПбГУВМ), 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5

✉ **Контактное лицо:** Понамарёв Владимир Сергеевич. **E-mail:** psevdopyos@mail.ru

ORCID: Ю. Н. Алехин – https://orcid.org/0000-0002-6852-3110; О. С. Попова – https://orcid.org/0000-0002-0650-0837;
В. С. Понамарёв – https://orcid.org/0000-0003-0666-7722; П. А. Паршин – https://orcid.org/0000-0002-8790-0540.

Статья поступила: 12.09.2022 **Статья принята в печать:** 12.04.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Одним из наиболее прогрессирующих направлений современного этапа развития биологии является углубление знаний о механизмах регуляции метаболических процессах, в частности о сигнальных молекулах, которые передают информацию клетке через ионные каналы и рецепторы ядерные, связанные с G-белком или с ферментативной активностью. Ядерный рецептор Farnesoid X receptor (FXR) в основном экспрессируется в печени и кишечнике, он регулирует ключевые гены, обеспечивающие процессы синтеза, транспорта и реабсорбции желчных кислот, а также участвует в метаболизме липидов и углеводов.

Цель. Оценить влияние агониста фарнезоидного Х-рецептора на постпрандиальную липемию у крыс, получающих рацион, содержащий супрафизиологическую дозу жиров.

Материалы и методы. Проведено экспериментальное проспективное контролируемое «неослепленное» рандомизированное исследование по изучению влияния агониста фарнезоидного Х-рецептора (обетихолевой кислоты) на постпрандиальную липемию у крыс, получающих рацион, содержащий супрафизиологическую дозу жиров.

Результаты и обсуждение. Показано, что при оценке постпрандиальной липемии достаточно высокую информативность имеет пероральный тест на толерантность к супрафизиологическим дозам жира с определением исходных показателей липидного профиля и через 4 часа после нагрузки. Выявлено, что у животных, которые в течение 28 дней получали рацион, содержащий повышенное количество жира, наблюдался дисбаланс метаболизма липидов с активацией их всасывания в кишечнике, но «замедленной» реакцией механизмов промежуточного обмена липидов, что сопровождалось накоплением в крови голодных крыс триглицеридов, холестерина хиломикронов и ЛПНП. Через 4 часа после кормления у этих животных наблюдалось сверхнормальное повышение триглицеридов и холестерина.

Заключение. Применение обетихолевой кислоты гармонизирует липидный обмен на фоне алиментарной жировой нагрузки за счет активации фарнезоидных Х-рецепторов кишечника и печени, что проявляется одновременным увеличением интенсивности процессов всасывания липидов и их промежуточного обмена. В результате исключается риск возникновения гиперхиломикронемии, гиперхолистеринемии и гипертриглицеридемии, снижается вероятность развития вторичной гиперлипедемии, толерантности к инсулину и функциональной перегрузки (или патологии) печени.

Ключевые слова: крысы, постпрандиальная липемия, агонисты фарнезоидного Х-рецептора, обетихоловая кислота, холестерин, триглицериды, хиломикроновый тест

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

Вклад авторов. Ю. Н. Алехин – создание модели исследования. О. С. Попова и В. С. Понамарёв – проведение эксперимента, сбор литературных данных, написание и оформление статьи. П. А. Паршин – статистическая обработка данных, сбор литературных данных, написание статьи.

Для цитирования: Алехин Ю. Н., Попова О. С., Понамарёв В. С., Паршин П. А. Влияние агониста фарнезоидного Х-рецептора на постпрандиальную липемию у крыс получающих рацион, содержащий супрафизиологическую дозу жиров. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):174–184. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-174-184

Effect of a Farnesoid X-receptor Agonist on Postprandial Lipemia in Rats Fed a Supraphysiological Fat Dozes

Yury N. Alekhin[1], Olga S. Popova[2], Vladimir S. Ponamarev[2]✉, Pavel A. Parshin[1]

[1] All-russian Scientific Research Veterinary Institute Pathology, Pharmacology and Therapy, 114b, Lomonosov str., Voronezh, 394087, Russia
[2] Saint-Petersburg State University of Veterinary Medicine, 5, Chernigovskaya str. St. Petersburg, 196084, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir S. Ponamarev. **E-mail:** psevdopyos@mail.ru

ORCID: Yury N. Alekhin – https://orcid.org/0000-0002-6852-3110; Olga S. Popova – https://orcid.org/0000-0002-0650-0837;
Vladimir S. Ponamarev – https://orcid.org/0000-0003-0666-7722; Pavel A. Parshin – https://orcid.org/0000-0002-8790-0540.

Received: 12.09.2022 **Revised:** 12.04.2023 **Published:** 25.05.2023

© Алехин Ю. Н., Попова О. С., Понамарёв В. С., Паршин П. А., 2023
© Alekhin Yu. N., Popova O. S., Ponamarev V. S., Parshin P. A., 2023

Abstract
Introduction. One of the most progressive directions of the modern stage of development of biology is the deepening of knowledge about the mechanisms of regulation of metabolic processes, in particular about signal molecules that transmit information to the cell through ion channels and nuclear receptors associated with G-protein or with enzymatic activity. The nuclear Farnesoid X receptor (FXR) is mainly expressed in the liver and intestines, it regulates key genes that provide the processes of synthesis, transport and reabsorption of bile acids, and is also involved in the metabolism of lipids and carbohydrates.
Aim. To evaluate the effect of a farnesoid X receptor agonist on postprandial lipemia in rats fed a supraphysiological fat diet.
Materials and methods. An experimental, prospective, controlled, unblinded, randomized study was conducted to study the effect of a farnesoid X receptor agonist (obeticholic acid) on postprandial lipemia in rats receiving a diet containing a supraphysiological dose of fats.
Results and discussion. It has been shown that when assessing postprandial lipemia, an oral test for tolerance to supraphysiological doses of fat with the determination of the initial lipid profile parameters and 4 hours after exercise has a sufficiently high information content. It was found that in animals that received a diet containing an increased amount of fat for 28 days, there was an imbalance in lipid metabolism with activation of their absorption in the intestine, but a "slow" reaction of the mechanisms of intermediate lipid metabolism, which was accompanied by the accumulation of triglycerides and cholesterol in the blood of hungry rats, chylomicrons and LDL. At 4 hours post-feeding, these animals showed abnormal increases in triglycerides and cholesterol.
Conclusion. The use of obeticholic acid harmonizes lipid metabolism against the background of alimentary fat load, due to the activation of farnesoid X-receptors of the intestine and liver, which is manifested by a simultaneous increase in the intensity of lipid absorption processes and their intermediate metabolism. As a result, the risk of hyperchylomicronemia, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia is eliminated, the likelihood of developing secondary hyperlipedemia, insulin tolerance and functional overload (or pathology) of the liver is reduced.

Keywords: rats, postprandial lipemia, farnesoid X-receptor agonists, obeticholic acid, cholesterol, triglycerides, chylomicron test

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. Yury N. Alekhin – creation of a research model. Olga S. Popova and Vladimir S. Ponamarev – conducting an experiment, collecting literature data, writing and designing an article. Pavel A. Parshin – statistical data processing, collection of literature data, writing an article.

For citation: Alekhin Yu. N., Popova O. S., Ponamarev V. S., Parshin P. A. Effect of a farnesoid X-receptor agonist on postprandial lipemia in rats fed a supraphysiological fat dozes. *Drug development & registration*. 2023;12(2):174–184. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-174-184

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее прогрессирующих направлений современного этапа развития биологии является углубление знаний о механизмах регуляции метаболических процессах, в частности о сигнальных молекулах, которые передают информацию клетке через ионные каналы и рецепторы ядерные, связанные с G-белком или с ферментативной активностью. При проявлении эффекта через ядерные рецепторы сигнальные белки образуют с ними комплекс, который присоединяется к регуляторным последовательностям ДНК с последующим запуском или блокировкой синтеза регуляторного белка. В настоящее время известно более 200 ядерных рецепторов, и хотя часть из них входят в группу «сиротских» (орфановых), для которых не известны механизмы активации, активно ведется поиск регуляторных лигандов, имеющих перспективу стать новыми лекарственными препаратами [1, 2]. Ядерный рецептор Farnesoid X receptor (FXR) в основном экспрессируется в печени и кишечнике, он регулирует ключевые гены, обеспечивающие процессы синтеза, транспорта и реабсорбции желчных кислот, а также участвует в метаболизме липидов и углеводов. В рамках его функциональности поддержание энергетического гомеостаза, межорганная функциональная коммуникация, в частности, изменение чувствительности тканей к инсулину и энтерогепатический сигнальный путь через желчные кислоты [3, 4]. Широкий спектр курируемых функций определяет многогранное физиологическое и патофизиологическое значение данного рецептора, а также дает основание рассматривать его как потенциальную фармакологическую мишень [5, 6]. Обетихолевая кислота является одним из наиболее перспективных агонистов фарнезоидного Х-рецептора, терапевтическая эффективность которой доказана при клинических и экспериментальных поражениях печени [7–9]. При этом в большинстве исследований воспроизводили клинически выраженное поражение печени с помощью дачи четыреххлористого углерода, лекарственных препаратов или гиперкалорийной высокожировой диете с избытком легкоусваиваемых углеводов [10, 11]. Полученный авторами эффект подтверждает целесообразность применения обетихолевой кислоты для терапии гепатопатий, однако у больных на фоне многогранности патологических изменений в организме сложно конкретизировать механизмы действия ли-

ганда. В данном случае более приемлемым является не воспроизведение клинической формы патологии печени, а повышенная функциональная нагрузка на отдельные обменные процессы или их совокупность. При этом не нарушается, а только активизируется адаптационно-компенсаторный потенциал с усилением выраженности метаболических путей, что при изучении сигнальных молекул, по нашему мнению, повысит объективность информации о фармакодинамике лигандов. В качестве нагрузочного агента интерес представляет оливковое масло, которое при повышенной дозе создаст эффект алиментарной жировой нагрузки, но не окажет при этом токсического воздействия на печень [12]. Можно предположить, что применение агонистов фарнезоидного Х-рецептора изменит реакцию организма на жировой перекорм, в частности, на степень выраженности и характер проявления дислипидемии, являющейся в клинической практике одним из компонентов патогенеза болезней органов желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарной и сердечнососудистой систем [13–15]. Для анализа обмена липидов предложено сравнительно большое количество методов исследования, которые позволяют детализировать липопротеидный профиль, но демонстрируя глубину поиска, они часто не дают возможности полноценного исследования всего спектра показателей липидного обмена [16], что необходимо для формирования интегрального представления о динамике происходящих изменений. Вероятно, при диспансеризации или поиске перспективных фармакологических средств более приемлем поисковый алгоритм, включающий в себя скрининговые тесты с последующим уточнением актуальных позиций высокотехнологичными методами. К числу скрининговых можно отнести хиломикроновый тест, позволяющий получить интегральную информацию об уровне липопротеидов [17].

Основная цель данного исследования – оценить влияние агониста фарнезоидного Х-рецептора (обетихолевой кислоты) на постпрандиальную липемию у крыс, получающих рацион, содержащий супрафизиологическую дозу жиров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В виварии ФГБОУ ВО «СПбГУВМ» проведено экспериментальное проспективное контролируемое «неослепленное» рандомизированное исследование, которое включало в себя два опыта. Радоминизация проводилась групповым (блочным) методом со стратификацией по возрасту, весу и клиническому состоянию животных. Объектом исследования были белые нелинейные крысы из питомника РАМН «Раппполово» Ленинградской области. Из их числа было отобрано 24 клинически здоровых животных в возрасте от 3 до 5 месяцев с массой тела 180–220 грамм. Условия их содержания и кормления соответствовали требованиям нормативных документов[1, 2]. В течение 4 недель до начала эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария по 5 голов в клетке, с 12-часовым циклом свет/темнота, при контролируемой температуре (19,0 ± 0,5 °С) и относительной влажности (54,0 ± 1,0 %) воздуха. Крыс кормили два раза в день (в 7:00 и 19:00 часов) их рацион (основной, ОР) состоял из 15 г специализированного комбикорма (К-58, диета № 3251) и 5 г семян подсолнечника, что обеспечивало потребление в сутки 5,1 г сырого протеина, 4,0 г сырой клетчатки и 3,5 г сырого жира.

Для проведения первого опыта из числа отобранных животных сформировали две группы: № 1 (контроль, $n = 3$), в которой крысы получали основной рацион (ОР); № 2 ($n = 3$) – утром через 5 минут от начала кормления дополнительно к ОР однократно внутрь с помощью шприца и иглы с булавовидным утолщением на конце ввели 4 мл оливкового масла. Перед кормлением, а так же через 2, 4, 6 и 8 часов после у животных отбирали пробы крови.

Для проведения второго опыта были сформированы три группы: № 3 (контроль, $n = 6$), крысы из которой получали основной рацион; № 4 ($n = 6$) – помимо основного рациона им два раза в сутки во время кормления внутрь с помощью шприца и иглы с булавовидным утолщением на конце вводили по 3,5 мл оливкового масла, а в группе № 4 ($n = 6$) один раз в сутки утром одновременно с дачей масла назначали обетихолевую кислоту [Окалива генерик (Ocabest – 5), Natco Pharma Ltd. / Aprazer, Индия] в дозе 0,5 мг/кг м.т.

Все крысы находились под постоянным наблюдением. В 1, 7, 14, 21 и 28 дни эксперимента утром за 15 минут до и через 4 часа после кормления отбирали пробы крови.

Образцы крови отбирали через нижнечелюстной доступ в пробирки с антикоагулянтом ($К_3$ ЭДТА) для сохранения ее интактного состояния и получения плазмы, в которой с помощью коммерческих наборов реактивов определяли содержание общего холестерина и триглицеридов (АО «Вектор-Бест», Россия). Помимо этого проводили хиломикроновый тест: плазму помещали на 12 часов в холодильник при 4 °С, а затем визуально оценивали цвет и наличие расслоения [18].

Математико-статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы

[1] РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в виварии научно-исследовательских институтов и учебных заведений». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200088317. Ссылка активна на 26.12.2022.

[2] ГОСТ 34566-2019 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200167514. Ссылка активна на 26.12.2022.

STATISTICA 6.1. Рассчитывали среднюю арифметическую (*M*) и ее среднюю ошибку (*m*), коэффициент вариации (*C*) и достоверность разницы (*p*) по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Задачей первого опыта было изучение динамики липидного профиля крови крыс, получающих сбалансированный рацион, и после однократного введения дополнительного количества жира. Из данных таблиц 1 и 2 видно, что изучаемые показатели у крыс до кормления находятся в пределах референсного диапазона [19], а качественный тест (хиломикроновый тест) демонстрирует отрицательный результат.

У животных с нормальным содержанием жиров в рационе (гр. 1) в течении 2 часов после дачи корма наблюдается увеличение (на 5,8 %) триглицеридов до уровня, который достоверно не изменяется до 6 часа наблюдения, но в конце опыта уменьшается до исходного уровня (таблица 1).

Показатели холестерина после некоторого снижения через 2 часа возрастают (на 4,4 %) в течении последующих 4 часов, но затем понижаются до исходных данных. Хиломикроновый тест через 2 и 4 часа демонстрирует увеличение количества хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), в меньшей степени липопротеинов низкой плотности (ЛПНП).

У животных, получивших однократно супрафизиологическую дозу жиров (гр. № 2) через 2 часа после кормления содержание триглицеридов возросло на 22,4 %, а холестерина уменьшилось на 12,4 % (таблица 2). Хиломикроновый тест указывает на повышенный уровень хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). В течение последующих двух часов (4 часа) содержание триглицеридов увеличились на 56,7 % и достигло уровня, который выше исходного на 91,8 %. Содержание холестерина также возросло (на 15,8 %) и достигло величин интактных животных. Результаты хиломикронового теста свидетельствуют о сохранении повышенной концентрации хиломикронов.

Дальнейшая динамика триглицеридов характеризуется их уменьшением и через 8 часов они достигают исходного уровня. Содержание холестерина после некоторого увеличения (на 3,6 %) через 6 часов после кормления увеличилось, уменьшилось до исходного уровня на заключительном этапе опыта. Результаты хиломикронового теста через 6 часов указывают на повышенный уровень ЛПОНП (вероятно и ЛПНП) и липопротеинов промежуточной плотности, а также слабовыраженного увеличения хиломикронов.

Полученные нами данные показали, что у животных, получающих сбалансированный рацион после очередного кормления, наблюдается умеренно выраженное увеличение триглицеридов, которое сохраняется в течении 4–6 часов. Динамика общего холестерина характеризуется незначительным снижением в первые 2 часа после кормления с последующим увеличением в течении последующих 2–4 часов. Хиломикроновый тест дает положительный результат, указывая на повышенное содержание хиломикронов через 2 часа, хиломикронов и ЛПОНП – через 4 часа наблюдения. Равномерное помутнение плазмы через 6 часов после кормления, вероятно, обусловлено повышением концентрации ЛПНП. Восьмой час наблюдения характеризуется восстановлением всех изучаемых показателей до исходного уровня. Однако выявленные изменения слабо выражены и имеют выраженные индивидуальные колебания, поэтому объективно можно говорить только о тенденциях липидного профиля крови в абсорбтивный период, но нет основания для констатации каких-либо величин,

Таблица 1. Показатели липидного обмена в крови крыс из группы № 1

Table 1. Indicators of lipid metabolism in the blood of rats from group No. 1

Время отбора крови от кормления Time between feeding and blood sampling	**Показатели** Parameters		
	Холестерин, мМ/л Cholesterol, mM/l	**Триглицериды, мМ/л** Triglycerides, mM/l	**Хиломикроновый тест** Chylomicron test
–15 мин –15 min	1,38 ± 0,079	0,52 ± 0,023	Плазма прозрачная Transparent plasma
+2 час +2 h	1,35 ± 0,120	0,55 ± 0,105	Верхний слой – серо-молочного цвета; нижний слой – прозрачный Upper layer – milky gray color; lower level – transparent
+4 час +4 h	1,38 ± 0,137	0,57 ± 0,188	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – слабо-белесый Upper layer – milky color; lower level – slightly whitish
+6 час +6 h	1,41 ± 0,116	0,56 ± 0,055	Плазма – прозрачная, легкое помутнение Plasma – transparent, slightly cloudy
+8 час +8 h	1,36 ± 0,062	0,51 ± 0,020	Плазма прозрачная Transparent plasma

Примечание. Различие с показателями до кормления (–15 мин) статистически достоверно: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Note. Difference with indicators before feeding (–15 min) statistically significant: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Таблица 2. Показатели липидного обмена в крови крыс из группы № 2

Table 2. Indicators of lipid metabolism in the blood of rats from group No. 2

Время отбора крови от кормления Time between feeding and blood sampling	Показатели Parameters		
	Холестерин, мМ/л Cholesterol, mM/l	Триглицериды, мМ/л Triglycerides, mM/l	Хиломикроновый тест Chylomicron test
–15 мин –15 min	1,37 ± 0,085	0,49 ± 0,010	Плазма прозрачная Transparent plasma
+2 час +2 h	1,20 ± 0,091	0,60 ± 0,079***	Верхний слой – серо-молочного цвета; нижний слой – прозрачный. Соотношение слоев: 1 : 2 Upper layer – milky gray color; lower level – transparent. Levels ratio 1 : 2
+4 час +4 h	1,39 ± 0,085	0,94 ± 0,075***	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2 (1 : 2,5) Upper layer – milky color; lower level –whitish. Levels ratio: 1 : 2 (1 : 2,5)
+6 час +6 h	1, 44 ± 0,101	0,63 ± 0,025***	Диффузное (равномерное) помутнение без выраженного расслоения Diffuse (uniform) turbidity without pronounced stratification
+8 час +8 h	1,42 ± 0,070	0,51 ± 0,008	Плазма прозрачная Transparent plasma

Примечание. Различие с показателями до кормления (–15 мин) статистически достоверно: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Note. Difference with indicators before feeding (–15 min) statistically significant: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

отражающих динамику. Дополнительное введение оливкового масла не изменило отмеченные выше тенденции, но усилило их визуализацию. При этом снизилась вариабельность показателей, так коэффициент вариации триглицеридов снизился через 2 и 4 часа после кормления соответственно с 26,7 до 18,4 % и с 46,0 до 11,2 %.

Таким образом, после кормления наблюдается изменение липидного профиля крови с достоверным увеличением уровня триглицеридов и менее выраженным повышением уровня холестерина. Максимальные величины указанных показателей достигаются в течение 4 часов постпрандиального периода, но в это время также возрастает их вариабельность, что снижает объективность исследований. Увеличение содержания жира в рационе усиливает абсолютную выраженность, но снижает индивидуальную вариабельность метаболической реакции на потребление корма. При этом наиболее информативными оказались параметры, определяемые через 4 часа после кормления.

Задачей второго опыта было изучение влияния обетихолевой кислоты на динамику показателей постпрандиальной липемии. Все крысы в первый день эксперимента были клинически здоровы, а все изучаемые показатели крови находились в референсном диапазоне (таблицы 3–5) [19] и не имели достоверных межгрупповых различий. В течение 4 часов после кормления не было отмечено достоверных изменений уровня холестерина, но уровень триглицеридов увеличился на 90,2 %, а результаты хиломикронового теста указывают на повышение хиломикронов и ЛПОНП. В группе контроля на всех этапах опыта мы наблюдали изменения аналогичных показателей исходного и постпрандиального липидного профиля крови (таблица 3).

У животных, получающих избыточное количество жира в рационе (гр. № 4), на седьмой день наблюдения было отмечено более выраженное постпрандиальное увеличение триглицеридов (на 98,0 %).

В конце второй недели у животных до введения оливкового масла отмечены более высокие, чем в первый день опыта, величины холестерина (на 7,9 %) и триглицеридов (на 11,8 %). Получен положительный результат хиломикронового теста, свидетельствующий о повышенном уровне ЛПНП. Через 4 часа после кормления содержание холестерина увеличилось на 18,7 %, а триглицеридов в 2,1 раза и они оказались выше, чем в начале опыта соответственно на 24,5 и 23,7 %. Качественный тест показал повышенное содержание хиломикронов и ЛПОНП, а увеличение высоты второго слоя свидетельствует о прогрессирующем наращивании липопротеидов.

На 21 день опыта происходит дальнейшее увеличение уровней холестерина и триглицеридов как до, так и после жировой нагрузки, что отразилось на результатах хиломикронового теста, которые указывают на повышенный уровень хиломикронов и ЛПНП до, и хиломикронов и ЛОНП после кормления. На заключительном этапе опыта у голодных крыс величина холестерина превысила уровень первого дня на 56,1 %, а триглицеридов в 2,1 раза, а после дачи оливкового масла соответственно на 81,8 и 51,5 %, что оказалось выше нормы [19]. Результаты хиломикронового теста показали, что у животных до кормления имеет место повышенный уровень хиломикронов и

Таблица 3. Показатели липидного обмена в крови крыс из группы № 3 за 15 минут до (–15 мин) и через 4 часа (+4 час) после кормления

Table 3. Indicators of lipid metabolism in the blood of rats from group No. 3 15 minutes before (–15 minutes) and 4 hours (+4 hours) after feeding

День опыта Experimental day	Время отбора крови от кормления Time between feeding and blood sampling	Показатели Parameters		
		Холестерин, мМ/л Cholesterol, mM/l	Триглицериды, мМ/л Triglycerides, mM/l	Хиломикроновый тест Chylomicron test
1	–15 мин –15 min	1,41 ± 0,057	0,50 ± 0,015	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,44 ± 0,060	0,95 ± 0,068	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2 (1 : 2,5) Upper layer – milky color; lower level –whitish. Levels ratio: 1 : 2 (1 : 2,5)
7	–15 мин –15 min	1,39 ± 0,072	0,48 ± 0,027	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,42 ± 0,055	0,96 ± 0,070	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2 Upper layer – milky color; lower level –whitish. Levels ratio: 1 : 2
14	–15 мин –15 min	1,39 ± 0,060	0,50 ± 0,019	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,45 ± 0,061	0,95 ± 0,075	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2 Upper layer – milky color; lower level –whitish. Levels ratio: 1 : 2
21	–15 мин –15 min	1,39 ± 0,075	0,53 ± 0,020	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,42 ± 0,060	0,97 ± 0,076	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2 (1 : 2,5) Upper layer – milky color; lower level –whitish. Levels ratio: 1 : 2 (1 : 2,5)
28	–15 мин –15 min	1,38 ± 0,083	0,50 ± 0,024	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,43 ± 0,070	0,95 ± 0,080	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белнсый. Соотношение слоев: 1 : 2 Upper layer – milky color; lower level –whitish. Levels ratio: 1 : 2

Примечание. Различие с показателями первого дня опыта статистически достоверно: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Note. The difference with the indicators of the first day of the experiment statistically significant: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

липопротеидов низкой плотности, а после дачи масла отмечено большее повышение уровня хиломикронов, накопление липопротеинов очень низкой и промежуточной плотности.

В таблице 5 представлены показатели крыс, которым на фоне избытка жира в рационе вводили обетихолевую кислоту. Как было отмечено выше, в начале опыта все эти животные (гр. 4) были клинически здоровы, а их показатели находились в референсном диапазоне. Постпрандиальная динамика характеризовалась отсутствием достоверного изменения концентрации холестерина, увеличением триглицеридов (на 92,0 %), хиломикронов и ЛПОНП.

В конце первой недели опыта не было отмечено достоверных изменений изучаемых показателей у голодных животных, но через 4 часа после их кормления хиломикроновый тест показал повышенный уровень хиломикронов и ЛПОНП, а содержание триглицеридов возросло в 2,24 раза и оказалось выше уровня животных из группы № 3 на 10,9 %.

На 14 день эксперимента у голодных животных увеличилась вариабельность показателей холестерина (с 15,0 до 21,0 %), содержание которого оказалось выше, чем в первый день опыта на 3,7 %, но ниже уровня крыс из группы № 3 на 6,0 %. После кормления уровень холестерина повысился на 13,5 %, а триглицерида в 2,2 раза и оказались соответственно ниже на 10,1 % и выше на 7,5 %, чем в сопоставимой группе (гр. № 3). Хиломикроновый тест указывает на повышенное содержание хиломикронов и ЛПОНП, а увеличение высоты второго слоя свидетельствует о прогрессирующем наращивании липопротеидов. В течение последующих двух недель опыта не произошло достоверных изменений предпрандиального липидного профиля крови и изучаемые показатели достоверно не отличались их параметров интактных

Таблица 4. Показатели липидного обмена в крови крыс из группы № 4 за 15 минут до (–15 мин) и через 4 часа (+4 час) после кормления

Table 4. Indicators of lipid metabolism in the blood of rats from group No. 4 15 minutes before (–15 minutes) and 4 hours (+4 hours) after feeding

День опыта Experimental day	Время отбора крови от кормления Time between feeding and blood sampling	Показатели Parameters		
		Холестерин, мМ/л Cholesterol, mM/l	Триглицериды, мМ/л Triglycerides, mM/l	Хиломикроновый тест Chylomicron test
1	–15 мин –15 min	1,39 ± 0,080	0,51 ± 0,018	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,43 ± 0,065	0,97 ± 0,071	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2 (1 : 2,5) Upper layer – milky color; lower level – whitish. Levels ratio: 1 : 2 (1 : 2,5)
7	–15 мин –15 min	1,41 ± 0,091	0,51 ± 0,055	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,42 ± 0,107	1,01 ± 0,113	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2,5 Upper layer – milky color; lower level – whitish. Levels ratio: 1 : 2,5
14	–15 мин –15 min	1,50 ± 0,100	0,57 ± 0,025*	Помутнение (опалесценция) Turbidity (opalescence)
	+4 часа +4 h	1,78 ± 0,122*	1,20 ± 0,10*	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2,5 (1 : 3) Upper layer – milky color; lower level – whitish. Levels ratio: 1 : 2,5 (1 : 3)
21	–15 мин –15 min	1,68 ± 0,097**	0,72 ± 0,063**	Диффузное помутнение. Повыш ЛПНП Diffuse turbidity. LDL increase
	+4 часа +4 h	1,90 ± 0,115**	1,28 ± 0,079**	Верхний слой – молочного с кремовым оттенком цвета; нижний слой – серо-белого цвета. Соотношение слоев: 1 : 3 (1 : 3,5) Upper layer – milky with a creamy tint; lower layer – gray-white color. Layer ratio: 1 : 3 (1 : 3.5)
28	–15 мин –15 min	2,17 ± 0,109***	1,06 ± 0,121***	Верхний слой – бледно-кремового цвета; нижний слой – диффузное помутнение. Соотношение слоев: 1 : 4 (1 : 5). Повыш хиломикроны и ЛПНП Upper layer is a pale cream color; the bottom layer is a diffuse turbidity. Layer ratio: 1 : 4 (1 : 5). Increased chylomicrons and LDL
	+4 часа +4 h	2,60 ± 0,130***	1,47 ± 0,098***	Верхний слой – кремового цвета; нижний слой – диффузное помутнение. Соотношение слоев: 1 : 3,5 (1 : 4,0). Повыш хиломикроны и ЛПП и ЛПОНП Upper layer is cream-colored; lower layer is diffuse turbidity. Layer ratio: 1 : 3.5 (1 : 4.0). Increased chylomicrons and LPP and VLDL

Примечание. Различие с показателями первого дня опыта статистически достоверно: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Note. The difference with the indicators of the first day of the experiment statistically significant: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

животных (1 день). Реакция на кормления характеризовалась увеличением холестерина (на 8,0 %), триглицеридов (в 2 раза), хиломикронов и ЛПОНП.

Таким образом, увеличение в три раза (с 3,5 до 10,5 г/сутки) содержания жира в рационе крыс в течение первой недели не оказывает существенного влияния на липидный профиль крови, но в течение последующих трех недель наблюдения отмечено увеличение содержания в плазме холестерина и триглицеридов. При этом результаты хиломикронового теста указывают на повышение концентрации ЛПНП, но на заключительном этапе опыта также возрастает уровень хиломикронов, что может быть обусловлено снижением активности образования эндогенных триглицеридов в печени [14]. Результаты исследования постпрандиальной липемии показали, что уже через 8 часов липидный профиль плазмы восстанавливается до исходного уровня (см. таблицы 1 и 2). Во втором опыте (см. таблицу 3) пробы крови у голодных животных отбирают через 10–12 часов после предыдущего кормления, т. е. выявленное наличие повышенного уровня холестерина, триглицеридов, хиломикронов и липоротеинов указывает на наличие вторичной дислипедемии [20, 21], которая возникает

Таблица 5. Показатели липидного обмена в крови крыс из группы № 5 за 15 минут до (–15 мин) и через 4 часа (+4 час) после кормления

Table 5. Indicators of lipid metabolism in the blood of rats from group No. 5 15 minutes before (–15 minutes) and 4 hours (+4 hours) after feeding

День опыта Experimental day	Время отбора крови от кормления Time between feeding and blood sampling	Показатели Parameters		
		Холестерин, мМ/л Cholesterol, mM/l	Триглицериды, мМ/л Triglycerides, mM/l	Хиломикроновый тест Chylomicron test
1	–15 мин –15 min	1,36 ± 0,065	0,50 ± 0,026	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,44 ± 0,058	0,96 ± 0,062	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2 (1 : 2,5) Upper layer – milky color; lower level – whitish. Levels ratio: 1 : 2 (1 : 2,5)
7	–15 мин –15 min	1,41 ± 0,085	0,50 ± 0,030	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,46 ± 0,100	1,12 ± 0,111	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2 (1 : 2,5) Upper layer – milky color; lower level – whitish. Levels ratio: 1 : 2 (1 : 2,5)
14	–15 мин –15 min	1,41 ± 0,120	0,59 ± 0,071	Легкое помутнение (опалесценция) Slight turbidity (opalescence)
	+4 часа +4 h	1,60 ± 0,073*	1,32 ± 0,089	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 3 Upper layer – milky color; lower level – whitish. Levels ratio: 1 : 3
21	–15 мин –15 min	1,47 ± 0,080	0,54 ± 0,043	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,51 ± 0,105	1,10 ± 0,093	Верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2,5 (1 : 3) Upper layer – milky color; lower level – whitish. Levels ratio: 1 : 2,5 (1 : 3)
28	–15 мин –15 min	1,43 ± 0,109	0,56 ± 0,070	Плазма прозрачная Transparent plasma
	+4 часа +4 h	1,55 ± 0,110	1,13 ± 0,099	верхний слой – молочного цвета; нижний слой – белесый. Соотношение слоев: 1 : 2,5 Upper layer – milky color; lower level – whitish. Levels ratio: 1 : 2,5

Примечание. Различие с показателями первого дня опыта статистически достоверно: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Note. The difference with the indicators of the first day of the experiment statistically significant: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

в конце второй недели и прогрессирует в течение последующих дней наблюдения. Повышенный уровень липидов в крови голодных животных усиливает выраженность постпрандиальной липемии. При этом через 4 часа после кормления показатели холестерина и триглицеридов превышают верхний предел нормы, что указывает на патологический характер изменений липидного обмена. Результаты хиломикронового теста расширили наши представления о механизмах дислипедемии на фоне жирового перекорма. Выявлено, что у животных контрольной группы (см. таблицу 1) алиментарная гиперлипемия преимущественно обусловлена повышенным уровнем хиломикронов, т. е. экзогенными липидами, что свидетельствует об активации начального этапа липидного обмена – переваривание и всасывание в кишечнике, но менее выраженной стимуляции промежуточного обмена [22]. На фоне алиментарной жировой перегрузки в течение двух недель происходит активизация процессов всасывания липидов в кишечнике и развитие гиперхиломикронемии, выраженность которой постепенно возрастает до уровня стимуляции синтетической функции печени, что проявляется наращиванием доли ЛПОНП (увеличение высоты нижнего слоя). Данная фракция липопротеинов образуется из хиломикронов в кровотоке под действием фермента липопротеинлипазы или синтезируется в печени, затем из нее извлекается большая часть триглицеридов и они трансформируются в ремнантные частицы (липопротеиды промежуточной плотности), которые сравнительно быстро улавливаются в печени, где превращаются в ЛПНП [22]. Поэтому увеличение ЛПОНП указывает не только на активацию липопротеинлипаза в крови (экзогенный ЛПОНП) и функций печени (эндогенный ЛПОНП), но и на сбой работы печени. Так, известно, что повышение содержания жира в рационе возрастает уровень свободных жирных кислот в печени, которые стимулируют синтез

ЛПОНП. Известно, что инсулин регулирует скорость синтеза липопротеинов очень низкой плотности, которые синтезируются в печени, он же лимитирует активность липопротеинлипазы, обеспечивающей элиминацию этих липопротеинов из крови. Поэтому одним из механизмов роста синтеза и замедления элиминации ЛПОНП является снижение чувствительности (резистентности) тканей к влиянию инсулина [23]. Увеличение количества ЛППП в сочетании с гиперхолистеринемией и гипертриглицеридемией, свидетельствует о вторичной гиперлипедемии, которая является предиктором метаболического синдрома [24].

Применение обетихолевой кислоты изменило реакцию организма животных на супрафизиологические дозы жира. Обетихолевая кислота является мощным и селективным агонистом фарнезоидного Х-рецептора (FXR, EC50 99 нмоль/Л), а в химическом отношении она представляет собой полусинтетическое производное хенодезоксихолевой кислоты природного агониста FXR [7]. Данный ядерный рецептор, экспрессирующийся в печени, кишечнике, почках и жировой ткани, имеет многогранное физиологическое и патофизиологическое значение [5]. Поэтому можно предположить, что уже через 1–2 недели курса обетихолевой кислоты произойдет активация FXR в кишечнике с соответствующим увеличением объема всасывания жиров в кишечнике, на что указывает более высокий, чем у животных гр. № 3, уровень триглицеридов, составляющих большую часть хиломикронов – основной транспортной формой липидов. При этом в крови возрастает доля экзогенных хиломикронов (образовавшихся в слизистой кишечника), но не эндогенных липидов, так как нет достоверного увеличения холестерина, что указывало бы на стимуляцию промежуточного обмена [25]. Очевидно, что на этом этапе опыта превалирует активизация ядерных рецепторов в кишечнике и в меньшей степени расположенных в печени и жировой ткани. В результате наблюдается слабовыраженная перегрузка механизмов промежуточного обмена липидов, на что указывает повышение содержания хиломикронов и ЛПНП в плазме крови голодных животных (хиломикроновый тест) в конце второй недели наблюдения. В дальнейшем исчезли отмеченные изменения липидного профиля у голодных крыс, что указывает на полноценный метаболизм потребляемой дозы жира в межпрандиальный период, т. е. произошла экспрессия FXR в печени и жировой ткани, участвующих в метаболизме липидов, оптимизация промежуточного обмена. Повышение уровня холестерина через 4 часа после кормления также свидетельствует о повышении активности образования ЛППП и ЛПНП, содержание в которых значительно выше, чем в хиломикронах и ЛПОНП [26]. Однако в отличие от крыс из группы № 3 у животных, получавших обетихолевоую кислоту (гр. № 4), показатели холестерина и триглицеридов не вышли за пределы нормы, что дает основание предположить наличие не только локального, но системного эффекта экспрессии ядерных рецепторов. При этом наиболее вероятным механизмом данного эффекта является нивелирование (или ослабление) толерантности тканей к инсулину – универсальному регулятору обмена веществ. Известно, что активация FXR повышает чувствительность к инсулину [27–30], на что так же указывают результаты наших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования по изучению динамики липидного профиля крови крыс, получающих сбалансированный рацион и после однократного введения дополнительного количества жира, показали, что для оценки постпрандиальной липемии более приемлем пероральный тест на толерантность к супрафизиологическим дозам жира с определением исходных показателей липидного профиля и через 4 часа после нагрузки. При этом для гарантированного метаболизма полученной дозы жира анализ исходных параметров должен проводиться не ранее чем через 10 часов после предыдущего кормления. Это позволяет оценить полноценность промежуточного обмена липидов, дает информацию об индивидуальных особенностях интактных животных, что повышает объективность оценки динамики изменения изучаемых величин после кормления. Отбор проб крови через 4 часа после жировой нагрузки обусловлен сравнительно выраженной постпрандиальной липемией с минимальным уровнем индивидуальной вариабельности.

У животных, которые в течение 28 дней получали рацион, содержащий повышенное количество жира, наблюдался дисбаланс метаболизма липидов с активацией их всасывания в кишечнике, но «замедленной» реакцией механизмов промежуточного обмена липидов, что сопровождалось накоплением в крови голодных крыс триглицеридов, холестерина, хиломикронов и ЛПНП. Через 4 часа после кормления у этих животных наблюдалось сверхнормальное повышение триглицеридов и холестерина. Все это указывает на наличие у них вторичной гиперлипедемии, которая, вероятно, сочетается с толерантностью к инсулину, функциональной перегрузкой (или патологией) печени, что является предиктором метаболического синдрома.

Применение обетихолевой кислоты гармонизирует липидный обмен на фоне алиментарной жировой нагрузки за счет активации фарнезоидных Х-рецепторов кишечника и печени, что проявляется одновременным увеличением интенсивности процессов всасывания липидов и их промежуточного обмена. Происходит оперативное превращение экзогенных (хиломикроны) в эндогенные (ЛПОНП) триглицериды, которые не достигают высокого уровня, так как подвергаются дальнейшей трансформации в печени, жировой ткани, мышцах др. участниках метаболизма липидов. Нет активации ферментов крови, что, вероятно, обусловлено их превращением в печени в ЛПВП. В результате исключается риск возникновения гиперхиломикронемии, гиперхолистеринемии и гипертриглицеридемии, снижается вероятность

развития вторичной гиперлипедемии, толерантности к инсулину и функциональной перегрузки (или патологии) печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mazaira G. I., Zgajnar N. R., Lotufo C. M., Daneri-Becerra C., Sivils J. C., Soto O. B., Cox M. B., Galigniana A. M. D. The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nucl. Recept. Res*. 2018;5:101320. DOI: 10.11131/2018/101320.
2. Blumberg B., Evans R. M. Orphan receptors – new ligands and new possibilities, *Genes and Development*. 1998;12:3149–3155. DOI: 10.1101/gad.12.20.3149.
3. Ивашкин В. Т. Ядерные рецепторы и патология печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2010;20(4):7–15.
4. Гриневич В. Б., Сас Е. И. Физиологические эффекты желчных кислот. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2017;2:87–91.
5. Jiang L., Zhang H., Xiao D., Wei H., Chen Y. Farnesoid X receptor (FXR): Structures and ligands. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021;19:2148–2159. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.04.029.
6. Fiorucci S., Distrutti E., Ricci P., Giuliano V., Donini A., Baldelli F. Targeting FXR in cholestasis: hype or hope. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(12):1449–1459. DOI: 10.1517/14728222.2014.956087.
7. Mudaliar S., Henry R. R., Sanyal A. J., Morrow L., Marschall H.-U., Kipnes M., Adorini L., Sciacca C. I., Clopton P., Castelloe E., Dillon P., Pruzanski M., Shapiro D. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2013;145(3):574–582.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.05.042.
8. Úbeda M., Lario M., Muñoz L., Borrero M. J., Rodríguez-Serrano M., Sánchez-Díaz A. M., Del Campo R., Lledó L., Pastor Ó., García-Bermejo L., Díaz D., Álvarez-Mon M., Albillos A. Obeticholic acid reduces bacterial translocation and inhibits intestinal inflammation in cirrhotic rats. *Journal of Hepatology*. 2016;64(5):1049–1057. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.12.010.
9. Боголюбова А. В., Майоров А. Ю., Мишина Е. Е., Шварц А. М., Белоусов П. В. Фарнезоидный рецептор (FXR) как потенциальная терапевтическая мишень при неалкогольной жировой болезни печени и ассоциированных заболеваниях. *Сахарный диабет*. 2017;20(6):449–453. DOI 10.14341/DM9374.
10. Антюфеева А. А., Лущик М. В. Создание экспериментальных моделей патологических состояний. *Международный студенческий научный вестник*. 2015;2(1):110–111.
11. Янко Р. В., Чака Е. Г., Зинченко А. С., Сафонов С. Л., Левашов М. И. Особенности моделирования жирового гепатоза у крыс разного возраста на основе высококалорийного рациона. *Ожирение и метаболизм*. 2021;18(4):387–397. DOI: 10.14341/omet12789.
12. Al-Seeni M. N., El Rabey H. A., Zamzami M. A., Alnefayee A. M. The hepatoprotective activity of olive oil and Nigella sativa oil against CCl_4 induced hepatotoxicity in male rats. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):438. DOI: 10.1186/s12906-016-1422-4.
13. Мамедов М. Н., Каримов А. К. Вторичная гиперлипидемия: особенности проявления при различных соматических заболеваниях. *Профилактическая медицина*. 2021;24(3):105–110. DOI: 10.17116/profmed202124031105.
14. Сандлер Ю. Г., Винницкая Е. В. Гиполипидемическая терапия у пациентов с хроническими заболеваниями печени: что нужно знать гастроэнтерологу. *Эффективная фармакотерапия*. 2021;17(28):36–45. DOI: 10.33978/2307-3586-2021-17-28-36-45.
15. Xenoulis P. G., Steiner J. M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *The Veterinary Journal*. 2010;183:12–21. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.10.011.
16. Меньшиков В. В. Требования к аналитическим средствам лабораторного обеспечения внебольничной медицинской помощи. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2001;9:5–6.
17. Julve J., Martín-Campos J. M., Escolà-Gil J. C., Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta*. 2016;455:134–148. DOI: 10.1016/j.cca.2016.02.004.
18. Wallach J. B. Interpretation of Diagnostic Tests. 3rd ed. Boston: Little, Brown and Co.; 2010. 1143 p.
19. Войтенко Н. Г., Макарова М. Н., Зуева А. А. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референсных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 1: крысы. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020;1:47–53. DOI: 10.29296/2618723X-2020-01-06.
20. Brewer H. B. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins, associated with an increased risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. 1999;83:3–12. DOI: 10.1016/s0002-9149(99)00308-2.
21. Hirano T. Hypertriglyceridemia: concept and clinical significance. *Nihon Rinsho*. 2013;71(9):1519–1527.
22. Алиев А. А. Липидный обмен и продуктивность жвачных животных. М.: Колос; 1980. 381 с.
23. Драпкина О. М., Гацолаева Д. С., Ивашкин В. Т. Неалкогольная жировая болезнь печени как компонент метаболического синдрома. *Российские медицинские вести*. 2010;2:72–78.
24. Ершова А. А., Аль Раши Д. О., Иванова А. А., Аксенова Ю. О., Мешков А. Н. Вторичные гиперлипидемии: этиология и патогенез. *Российский кардиологический журнал*. 2019;24(5):74–81.
25. Beisiegel U. Lipoprotein metabolism. *Eur Hert J*. 1998;19(Suppl A): A20–A23.
26. Ганда О. Дислипопротеидемии. Эндокринология. М.: Практика; 1999. С. 447–461.
27. Shihabudeen M. S., Roy D., James J., Thirumurugan K. Chenodeoxycholic acid, an endogenous FXR ligand alters adipokines and reverses insulin resistance. *Mol. Cell Endocrinol*. 2015;414:19–28. DOI: 10.1016/j.mce.2015.07.012.
28. Kalugniy I. I., Markova D. S., Yashin A. V., Prusakov A. V., Ponamarev V. S., Andreeva N. L. Diagnosis of hepatopathy in Holstein cattle with metabolic disorders. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;723(2):022029. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022029.
29. Stepanov I. S., Kalugniy I. I., Markova D. S., Prusakov A. V., Ponamarev V. S., Lunegov A. M. Development and application of new methods of correction and prevention of metabolic diseases in Holstein cattle. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;723(2):022030. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022030.
30. Baryshev V. A., Popova O. S., Ponamarev V. S. New methods for detoxification of heavy metals and mycotoxins in dairy cows. *Online Journal of Animal and Feed Research*. 2022;12(2):81–88. DOI: 10.51227/ojafr.2022.11.

REFERENCES

1. Mazaira G. I., Zgajnar N. R., Lotufo C. M., Daneri-Becerra C., Sivils J. C., Soto O. B., Cox M. B., Galigniana A. M. D. The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nucl. Recept. Res*. 2018;5:101320. DOI: 10.11131/2018/101320.
2. Blumberg B., Evans R. M. Orphan receptors – new ligands and new possibilities, *Genes and Development*. 1998;12:3149–3155. DOI: 10.1101/gad.12.20.3149.
3. Ivashkin V. T. Nuclear receptors and liver pathology. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2010;20(4):7–15. (In Russ.)
4. Grinevich V. B., Sas E. I. Physiological effects of bile acids. *Russian Medical Inquiry*. 2017;2:87-91. (In Russ.)
5. Jiang L., Zhang H., Xiao D., Wei H., Chen Y. Farnesoid X receptor (FXR): Structures and ligands. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021;19:2148–2159. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.04.029.
6. Fiorucci S., Distrutti E., Ricci P., Giuliano V., Donini A., Baldelli F. Targeting FXR in cholestasis: hype or hope. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(12):1449–1459. DOI: 10.1517/14728222.2014.956087.
7. Mudaliar S., Henry R. R., Sanyal A. J., Morrow L., Marschall H.-U., Kipnes M., Adorini L., Sciacca C. I., Clopton P., Castelloe E., Dillon P., Pruzanski M., Shapiro D. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2013;145(3):574–582.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.05.042.
8. Úbeda M., Lario M., Muñoz L., Borrero M. J., Rodríguez-Serrano M., Sánchez-Díaz A. M., Del Campo R., Lledó L., Pastor Ó., García-Bermejo L., Díaz D., Álvarez-Mon M., Albillos A. Obeticholic acid reduces bacterial translocation and inhibits intestinal inflammation in cirrhotic rats. *Journal of Hepatology*. 2016;64(5):1049–1057. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.12.010.
9. Bogolyubova A. V., Maiorov A. Yu., Mishina E. E., Schwartz A. M., Belousov P. V. Farnesoid receptor (FXR) as a potential thera-

peutic target in non-alcoholic fatty liver disease and associated diseases. *Diabetes Mellitus*. 2017;20(6):449–453. (In Russ.) DOI: 10.14341/DM9374.
10. Antyufeeva A. A., Lushchik M. V. Creation of experimental models of pathological conditions. *Mezhdunarodnyj studencheskij nauchnyj vestnik*. 2015;2(1):110–111. (In Russ.)
11. Yanko R. V., Chaka E. G., Zinchenko A. S., Safonov S. L., Levashov M. I. Features of modeling fatty hepatosis in rats of different ages based on a high-calorie diet. *Obesity and metabolism*. 2021;18(4):387–397. (In Russ.) DOI: 10.14341/omet12789.
12. Al-Seeni M. N., El Rabey H. A., Zamzami M. A., Alnefayee A. M. The hepatoprotective activity of olive oil and Nigella sativa oil against CCl_4 induced hepatotoxicity in male rats. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:438. DOI: 10.1186/s12906-016-1422-4.
13. Mamedov M. N., Karimov A. K. Secondary hyperlipidemia: features of manifestation in various somatic diseases. *Profilakticheskaya medicina*. 2021;24(3):105–110. (In Russ.) DOI: 10.17116/profmed202124031105.
14. Sandler Yu. G., Vinnitskaya E. V. Lipid-lowering therapy in patients with chronic liver disease: what a gastroenterologist needs to know. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2021;17(28):36–45. (In Russ.) DOI: 10.33978/2307-3586-2021-17-28-36-45.
15. Xenoulis P. G., Steiner J. M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *The Veterinary Journal*. 2010;183:12–21. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.10.011.
16. Menshikov V. V. Requirements for analytical tools for laboratory support of out-of-hospital medical care. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2001;9:5–6. (In Russ.)
17. Julve J., Martín-Campos J. M., Escolà-Gil J. C., Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta*. 2016;455:134–148. DOI: 10.1016/j.cca.2016.02.004.
18. Wallach J. B. Interpretation of Diagnostic Tests. 3rd ed. Boston: Little, Brown and Co.; 2010. 1143 p.
19. Voitenko N. G., Makarova M. N., Zueva A. A. Variability of blood biochemical parameters and establishment of reference intervals in preclinical studies. Message 1: rats. *Laboratory Animals for Science*. 2020;1:47–53. (In Russ.) DOI: 10.29296/2618723X-2020-01-06.
20. Brewer H. B. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins, associated with an increased risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. 1999;83:3–12. DOI: 10.1016/s0002-9149(99)00308-2.
21. Hirano T. Hypertriglyceridemia: concept and clinical significance. *Nihon Rinsho*. 2013;71(9):1519–1527.
22. Aliev A. A. Lipid metabolism and productivity of ruminants. M.: Kolos; 1980. 381 p. (In Russ.)
23. Drapkina O. M., Gatsolaeva D. S., Ivashkin V. T. Non-alcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome. *Rossijskie medicinskie vesti*. 2010;2:72–78. (In Russ.)
24. Ershova A. A., Al Rashi D. O., Ivanova A. A., Aksenova Yu. O., Meshkov A. N. Secondary hyperlipidemias: etiology and pathogenesis. *Russian Journal of Cardiology*. 2019;24(5):74–81. (In Russ.)
25. Beisiegel U. Lipoprotein metabolism. *Eur Hert J*. 1998;19(Suppl A): A20–A23.
26. Ganda O. Dyslipoproteinemias. Endocrinology. Moscow: Praktika; 1999. P. 447–461. (In Russ.)
27. Shihabudeen M. S., Roy D., James J., Thirumurugan K. Chenodeoxycholic acid, an endogenous FXR ligand alters adipokines and reverses insulin resistance. *Mol. Cell Endocrinol*. 2015;414:19–28. DOI: 10.1016/j.mce.2015.07.012.
28. Kalugniy I. I., Markova D. S., Yashin A. V., Prusakov A. V., Ponamarev V. S., Andreeva N. L. Diagnosis of hepatopathy in Holstein cattle with metabolic disorders. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;723(2):022029. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022029.
29. Stepanov I. S., Kalugniy I. I., Markova D. S., Prusakov A. V., Ponamarev V. S., Lunegov A. M. Development and application of new methods of correction and prevention of metabolic diseases in Holstein cattle. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;723(2):022030. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022030.
30. Baryshev V. A., Popova O. S., Ponamarev V. S. New methods for detoxification of heavy metals and mycotoxins in dairy cows. *Online Journal of Animal and Feed Research*. 2022;12(2):81–88. DOI: 10.51227/ojafr.2022.11.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189
УДК 57.021

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития при нейтронном и фотонном облучении опухолевых клеток

М. С. Третьякова[1, 5]✉, А. Г. Дрозд[1], М. В. Белоусов[1, 2], К. С. Бразовский[1], М. С. Ларькина[1, 2], С. В. Кривощеков[2], А. А. Артамонов[4], И. А. Милойчикова[1, 5], А. В. Безмага[1], А. М. Большаков[1], Е. С. Сухих[1], Е. В. Плотников[1, 3]✉✉

[1] ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30
[2] ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2
[3] НИИ психического здоровья. Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томский НИМЦ), 634014, Россия, г. Томск, ул. Алеутская, д. 4
[4] ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН» (ГНЦ РФ – ИМБП РАН), 123007, Россия, г. Москва, Хорошёвское шоссе, д. 76 А
[5] НИИ онкологии. Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томский НИМЦ), 634009, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5

✉ **Контактное лицо:** Третьякова Мария Сергеевна. **E-mail:** trremar@gmail.com
✉✉ **Контактное лицо:** Плотников Евгений Владимирович. **E-mail:** plotnikovev@tpu.ru

ORCID: М. С. Третьякова – https://orcid.org/0000-0002-5040-931X; А. Г. Дрозд – https://orcid.org/0000-0003-0633-213X;
М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945; К. С. Бразовский – https://orcid.org/0000-0002-4779-9820;
М. С. Ларькина – https://orcid.org/0000-0003-1176-2441; С. В. Кривощеков – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141;
А. А. Артамонов – https://orcid.org/0000-0002-7543-9611; И. А. Милойчикова – https://orcid.org/0000-0001-7741-2810;
А. В. Безмага – https://orcid.org/0009-0006-5620-0820; А. М. Большаков – https://orcid.org/0000-0003-1663-9506;
Е. С. Сухих – https://orcid.org/0000-0001-8251-2138; Е. В. Плотников – https://orcid.org/0000-0002-4374-6422.

Статья поступила: 07.02.2023 **Статья принята в печать:** 25.04.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Радиорезистентность раковых клеток серьезная проблема при лучевой терапии опухолевых заболеваний. Радиосенсибилизирующие препараты делают злокачественные клетки более чувствительными к излучению и повышают эффективность лучевой терапии, однако их широкое клиническое применение ограничено существенными побочными эффектами. Разработка и изучение новых радиосенсибилизаторов представляется актуальной задачей современной фармакологии.

Цель. Целью данной работы было изучение эффективности аскорбата лития в качестве радиосенсибилизатора при воздействии фотонного и нейтронного излучения в широком диапазоне доз.

Материалы и методы. Оценка биологического действия выполнялась на опухолевой линии аденокарциномы рака предстательной железы PC-3. В качестве генераторов ионизирующего излучения использовался циклотрон для получения нейтронного потока и источник кобальт-60 для получения гамма-излучения.

Результаты и обсуждение. Доказано усиление цитотоксического эффекта при сочетанном применении разных видов ионизирующих излучений и аскорбата лития. Выявлена устойчивость лини рака предстательной железы к гамма-излучению в поглощенной дозе 0,5–3,0 Гр. Показано, что опухолевые клетки рака предстательной железы более чувствительны к воздействию исследуемого препарата в минимальных концентрациях в сочетании с нейтронным облучением в сравнении с гамма-излучением в одинаковой поглощенной дозе. Основной механизм радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития заключается в локальной индукции окислительного стресса, синергетически усиливающий действие ионизирующего излучения.

Заключение. Сочетание аскорбата лития с нейтронным излучением приводит к более выраженному результирующему цитотоксическому эффекту. Повышение концентрации аскорбата лития приводило к нарастанию прооксидатного эффекта с усилением повреждающего действия на клетки.

Ключевые слова: аскорбат лития, радиосенсибилизация, рак простаты, клетки линии PC-3, гамма-излучение, нейтронное излучение, апоптоз

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

Вклад авторов. М. С. Третьякова, А. Г. Дрозд проводили культивирование опухолевых линий и исследование биологических свойств препарата на клетках. Е. В. Плотников осуществлял составление плана исследований, общее руководство и постановку задач, обсуждение результатов. М. В. Белоусов, К. С. Бразовский, М. С. Ларькина, С. В. Кривощеков проводили химический синтез, характеризацию препарата и расчет доз. А. А. Артамонов, Е. С. Сухих выполнили расчеты и обработку результатов. И. А. Милойчикова, А. В. Безмага, А. М. Большаков выполняли эксперименты по облучению клеточных культур на циклотроне и источнике гамма-излучения. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Программа «Приоритет 2030» Томского политехнического университета.

Для цитирования: Третьякова М. С., Дрозд А. Г., Белоусов М. В., Бразовский К. С., Ларькина М. С., Кривощеков С. В., Артамонов А. А., Милойчикова И. А., Безмага А. В., Большаков А. М., Сухих Е. С., Плотников Е. В. Изучение радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития при нейтронном и фотонном облучении опухолевых клеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):185–189. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189

© Третьякова М. С., Дрозд А. Г., Белоусов М. В., Бразовский К. С., Ларькина М. С., Кривощеков С. В., Артамонов А. А., Милойчикова И. А., Безмага А. В., Большаков А. М., Сухих Е. С., Плотников Е. В., 2023
© Tretyakova M. S., Drozd A. G., Belousov M. V., Brazovskiy K. S., Larkina M. S., Krivoshchekov S. V., Artamonov A. A., Miloichikova I. A., Bezmaga A. V., Bolshakov A. M., Sukhikh E. S., Plotnikov E. V., 2023

Study of the Radiosensitizing Action of Lithium Ascorbate Under Neutron and Photon Irradiation of Tumor Cells

Maria S. Tretyakova[1, 5]✉, Anastasia G. Drozd[1], Mikhail Belousov[1, 2], Konstantin V. Brazovskiy[1], Maria S. Larkina[1, 2], Sergei V. Krivoshchekov[2], Anton A. Artamonov[4], Irina A. Miloichikova[5], Artur V. Bezmaga[1], Alexey M. Bolshakov[1], Evgenia S. Sukhikh[1], Evgenii V. Plotnikov[1, 3]✉✉

[1] National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russia
[2] Siberian State Medical University, SSMU, 2, Moscow tract, Tomsk, 634050, Russia
[3] Mental Health Research Institute. Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 4, Aleutskaya str., Tomsk, 634014, Russia
[4] State Scientific Center of the Russian Federation – Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, 76 A, Khoroshevskoe shosse, Moscow, 123007, Russia
[5] Cancer Research Institute. Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 5, Kooperativny per., Tomsk, 634009, Russia

✉ **Corresponding author:** Maria S. Tretyakova. **E-mail:** trremar@gmail.com
✉✉ **Corresponding author:** Evgenii V. Plotnikov. **E-mail:** plotnikovev@tpu.ru

ORCID: Maria S. Tretyakova – https://orcid.org/0000-0002-5040-931X; Anastasia G. Drozd – https://orcid.org/0000-0003-0633-213X; Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945; Konstantin S. Brazovskiy – https://orcid.org/0000-0002-4779-9820; Maria S. Larkina – https://orcid.org/0000-0003-1176-2441; Sergei V. Krivoshchekov – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141; Anton A. Artamonov – https://orcid.org/0000-0002-7543-9611; Irina A. Miloichikova – https://orcid.org/0000-0001-7741-2810; Artur V. Bezmaga – https://orcid.org/0009-0006-5620-0820; Alexey M. Bolshakov – https://orcid.org/0000-0003-1663-9506; Evgenia S. Sukhikh – https://orcid.org/0000-0001-8251-2138; Evgenii V. Plotnikov – https://orcid.org/0000-0002-4374-6422.

Received: 07.02.2023 **Revised:** 25.04.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Radioresistance of cancer cells is a serious problem in radiation therapy of tumor diseases. Radiosensitizers make malignant cells more sensitive to radiation and increase the effectiveness of radiation therapy; however, their widespread clinical use is limited by significant side effects. The development and study of new radiosensitizers seems to be an urgent task of modern pharmacology.

Aim. The purpose of this work was to study the effectiveness of lithium ascorbate as a radiosensitizer under the influence of photon and neutron radiation in wide dose range.

Materials and methods. Evaluation of the biological effect was carried out using the tumor line of prostate cancer PC-3. We used a cyclotron to produce neutron radiation and a Cobalt-60 source to produce gamma radiation.

Results and discussion. We have proved an increase in the cytotoxic effect with the combined use of different types of ionizing radiation and lithium ascorbate. The resistance of the prostate cancer line to gamma radiation at an absorbed dose of 0.5–3.0 Gy was revealed. It was shown that tumor cells of prostate cancer are more sensitive to the effects of the study drug in minimal concentrations in combination with neutron irradiation compared to gamma radiation in the same absorbed dose. The main mechanism of the radiosensitizing action of lithium ascorbate is the local induction of oxidative stress, which synergistically enhances the action of ionizing radiation.

Conclusion. The combination of lithium ascorbate with neutron radiation leads to a more pronounced resulting cytotoxic effect. An increase in the concentration of lithium ascorbate led to the pro-oxidative action with an increase in the damaging effect on cells.

Keywords: lithium ascorbate, radiosensitization, prostate cancer, PC-3 cell line, gamma radiation, neutron radiation, apoptosis

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

Contribution of the authors. Maria S. Tretyakova, Anastasia G. Drozd, conducted a cell study of the biological properties. Evgenii V. Plotnikov carried out the preparation of the research plan, general management and discussion of the results. Mikhail V. Belousov, Konstantin S. Brazovskiy, Sergei V. Krivoshchekov carried out chemical synthesis, characterization of the drug and calculation of doses. Anton A. Artamonov, Evgenia S. Sukhikh performed the calculations and processed the results. Irina A. Miloichikova, Artur V. Bezmaga, Alexey M. Bolshakov performed experiments on the irradiation of cell cultures on a cyclotron and a source of gamma radiation. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. "Priority 2030" program of Tomsk Polytechnic University.

For citation: Tretyakova M. S., Drozd A. G., Belousov M. V., Brazovskiy K. S., Larkina M. S., Krivoshchekov S. V., Artamonov A. A., Miloichikova I. A., Bezmaga A. V., Bolshakov A. M., Sukhikh E. S., Plotnikov E. V. Study of the radiosensitizing action of lithium ascorbate under neutron and photon irradiation of tumor cells. *Drug development & registration*. 2023;12(2):185–189. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189

ВВЕДЕНИЕ

Развитие лучевой терапии привело к значительному улучшению клинических результатов лечения рака. Клинические руководства рекомендуют использовать фракционированную низкодозовую лучевую терапию, чтобы уменьшить побочные эффекты. Важным дополнительным фактором является применение радиосенсибилизаторов, т. е. веществ, повышающих радиочувствительность опухоли [1]. Одним из ключевых механизмов воздействия лучевой терапии является запуск клеточной гибели, вследствие накопления критических повреждений ДНК. В целом повысить радиочувствительность раковых клеток можно с помощью химических веществ, образующих свободные радикалы и ингибирующих синтез ДНК [2]. Наряду с хорошо известными радиосенсибилизаторами, такими как миметики кислорода, цитотоксины, существует ряд веществ с потенциальной противо-

опухолевой активностью. Экспериментально доказаны стимулирующие эффекты лития на гемопоэз, что сыграет положительную роль при восстановлении организма после лучевой терапии при онкологических заболеваниях [3]. В ряде исследований подтвердилось нейропротекторное действие лития, что помимо прямого защитного эффекта в конечном итоге может привести к улучшению качества жизни после облучения [4]. Есть данные о противоопухолевом действии лития, так показано, что литий может ингибировать рост нейробластомы [5]. В наших предыдущих исследованиях сообщалось об антиоксидантной активности аскорбата лития [6]. К сожалению, клинически значимых результатов, подтверждающих противоопухолевую активность аскорбиновой кислоты, пока не опубликовано. Метаболизм аскорбиновой кислоты связан с механизмами, которые участвуют в устойчивости организма к образованию росту злокачественных новообразований [7]. Прооксидантный эффект хорошо показан для аскорбиновой кислоты и ее солей [8]. Мы предполагаем, что высокая концентрация аскорбат аниона в зоне облучения позволит повысить уровень окислительного стресса, вызываемого ионизирующим излучением, что должно локально повысить противоопухолевое действие.

Данная работа направлена на изучение и сравнение эффектов фотонного и нейтронного излучений *in vitro* в сочетанном действии с радиосенсибилизатором – аскорбатом лития (LiAsc).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аскорбат лития получали *ex tempore* из аскорбиновой кислоты и карбоната лития (марка ACS, Sigma-Aldrich, Германия). Карбонат лития и аскорбиновую кислоту смешивали в мольном соотношении 1:2 и растворяли в деионизированной воде. Реакционную массу активно перемешивали до прекращения выделения газа. После охлаждения в реакционную массу добавляли трехкратный избыток этанола. Выпадающий белый кристаллический осадок собирали, промывали этанолом и высушивали. Получался белый кристаллический порошок, который использовали в экспериментах. Элементным анализом найдено – 33 % (C), 5,33 % (H), 8,1 % (Li_2O); теоретически вычислено – 33,03 % (C), 5,05 % (H), 8,21 % (Li_2O). Содержание воды в соли определено термогравиметрическим методом и составило 16,15 % (теоретическое – 16,51 %). Продукт реакции соответствовал формуле аскорбата лития дигидрата $LiC_6H7O_6 \cdot 2H_2O$. Радиосенсибилизирующие свойства аскорбата лития оценивали на культурах клеток аденокарциномы простаты (PC-3) человека. Клетки линии PC-3 культивировали в питательной среде RPMI 1640, обогащенной 10%-й эмбриональной бычьей сывороткой, глутамином и антибиотиками. Клетки подвергались лучевому воздействию в диапазоне поглощенных доз 0,5–3 Гр, в качестве источника нейтронов использовался циклотрон Р-7М (ТПУ, Россия), для фотонного облучения использовался источник гамма-излучения на основе изотопа Co-60. Облучение образцов клеток осуществлялось в культуральных планшетах в поглощенной дозе 0,5, 1, 1,5, 2 и 3 Гр. Оценку метаболической активности клеток проводили с помощью стандартного МТТ-теста. Клетки вносили в лунки 96-луночного планшета в концентрации 5 тыс/лунка и инкубировали в течение 24 часов при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5%-м уровнем CO_2. Оптическую плотность раствора измеряли на планшетном спектрофотометре на длине волны 570 нм.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA 12 (TIBCO Software Inc., США). Для сравнения данных использовали U-критерий Манна – Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента выполнено сравнение радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития в диапазоне концентраций 0,1–0,8 мМ на относительно радиоустойчивой клеточной культуре рака простаты человека при воздействии ионизирующего излучения разных видов. На рисунке 1, А показана жизнеспособность клеток PC-3 при воздействии гамма-излучения. Увеличение поглощенной дозы гамма-излучения до 3 Гр приводило к снижению жизнеспособности клеток на 20 % от необлученного контроля. Аскорбат лития усилил повреждающее воздействие облучения в диапазоне 0,1–0,3 мМ. В концентрации 0,4 мМ и выше воздействие приводит к практически полной гибели культуры с отдельными выживающими клонами. При воздействии нейтронного излучения отмечается более выраженное действие аскорбата лития даже в минимальной концентрации (рисунок 1, Б). При сочетанном действии жизнеспособность популяции клеток снизилась более чем на 50 %. Значения выживаемости клеток после нейтронного облучения показали, что дозовая зависимость для аскорбата лития имеет линейный характер до концентрации 0,3 мМ.

На рисунке 2 приведены результаты повреждающего действия ионизирующих излучений при добавлении аскорбата лития в установленных эффективных концентрациях 0,1 мМ (рисунок 2 А, Б) и 0,2 мМ (рисунок 2 В, Г). Показано достоверное падение жизнеспособности опухолевых клеток при комбинации соли лития с нейтронным и фотонным излучением.

Повреждение биообъектов при облучении в основном реализуется не за счет прямого повреждения макромолекул, а путем вторичного повреждения свободными радикалами, продуцируемыми вследствие радиолиза воды. В свою очередь, нейтроны повреждают клетки в основном путем прямого повреждения макромолекул, в первую очередь в ядерных структурах клетки [9]. При действии аскорбата в высоких концентрациях совместно с ионизирующим

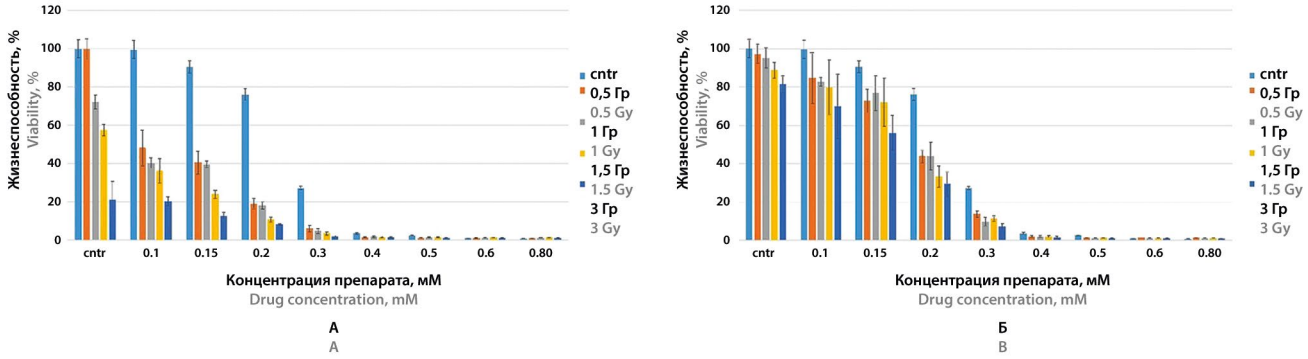


Рисунок 1. Жизнеспособность клеток линии PC-3 при лучевом воздействии в поглощенной дозе 0,5–3 Гр в комбинации с аскорбатом лития.

А – гамма-излучение; Б – нейтронное излучение

Figure 1. Survival of PC-3 cells under radiation exposure at an absorbed dose of 0.5–3 Gy in combination with lithium ascorbate.

A – gamma radiation; B – neutron radiation

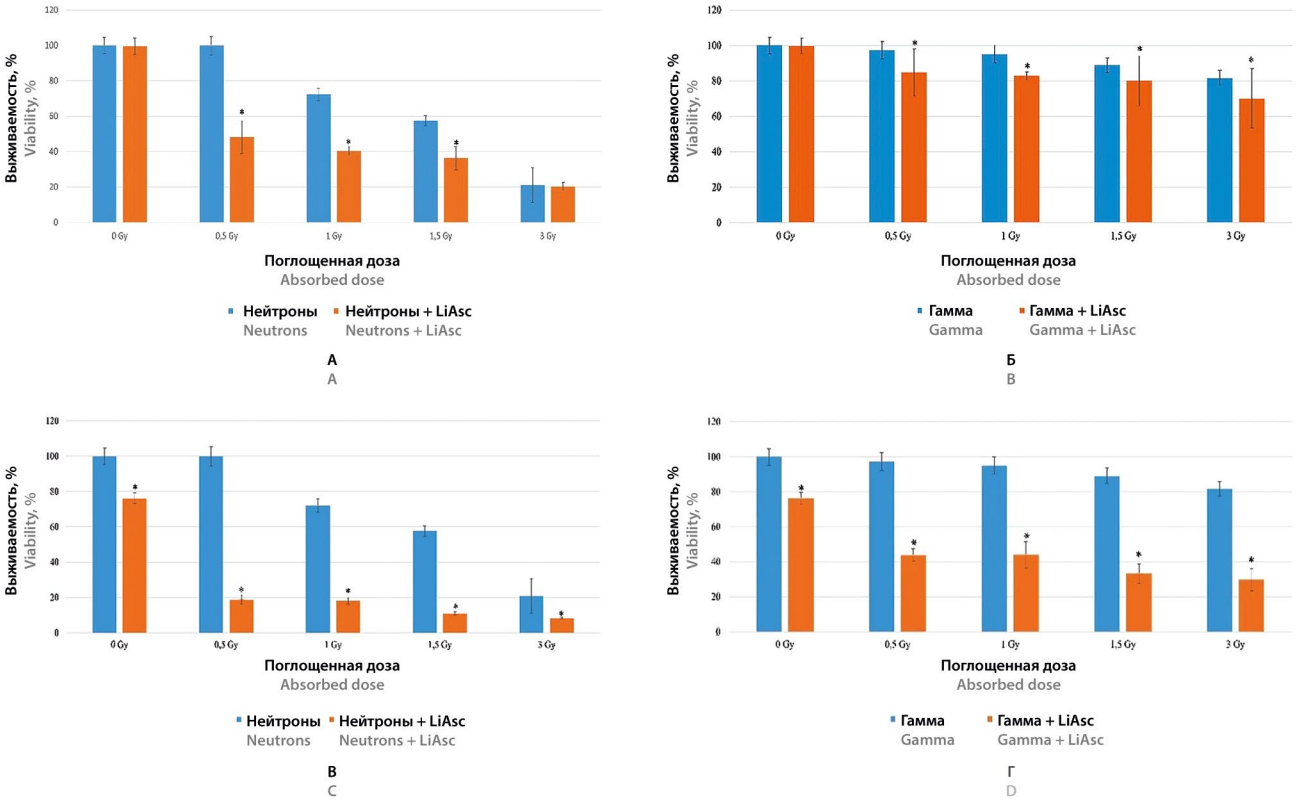


Рисунок 2. Выживаемость опухолевых клеток линии PC-3 при лучевом воздействии в комбинации с аскорбатом лития.

А – нейтронное облучение в сочетании с LiAsc (0,1 мМ); Б – гамма-облучение в сочетанном действии с LiAsc (0,1 мМ); В – нейтронное облучение в сочетании с LiAsc (0,2 мМ); Г – гамма-облучение в сочетанном действии с LiAsc (0,2 мМ).

Примечание. * Различия статистически значимы в сравнении с группой облучения без препарата, $p < 0,05$

Figure 2. Viability of PC-3 tumor cells under radiation exposure in combination with lithium ascorbate.

A – neutron radiation in combination with LiAsc (0.1 mM); B – gamma irradiation in combined action with LiAsc (0.1 mM); C – neutron irradiation in combination with LiAsc (0.2 mM); D – gamma irradiation in combined action with LiAsc (0.2 mM).

Note. * Differences are statistically significant in comparison with the radiation group without the drug, $p < 0,05$

излучением наблюдается известная общность их повреждающего действия на клеточные структуры, которая реализуется главным образом путем вторичной продукции активных форм кислорода. Окислительный стресс нарастает вследствие радиолиза воды и прооксидантного действия аскорбата. Генерируемые свободные радикалы вызывают каскад деструктивных реакций, которые в данном случае могут

быть усилены действием радиосенсибилизатора. Таким образом, совпадение основных повреждающих механизмов локально приводит к усилению повреждающего действия на клетки, что и подтвердилось в экспериментах (см. рисунок 1). Действие сенсибилизатора в оптимальном диапазоне доз показано на рисунке 2, где уже в поглощенной нейтронной дозе 0,5 Гр наблюдается снижение жизнеспособности клеток более чем на 50 и на 80 % при сочетании с аскорбатом в дозах 0,1 и 0,2 мМ соответственно. Эффекты при сочетании с гамма-излучением менее выражены, однако и здесь отмечено снижение жизнеспособности на 15 и 50 % соответственно. В наших экспериментах было подтверждено, что опухолевые клетки рака простаты более чувствительны к воздействию исследуемого препарата в минимальных концентрациях в сочетании с нейтронным облучением в сравнении с гамма-излучением в одинаковой поглощенной дозе. При этом без сенсибилизации аденокарцинома простаты оказалась устойчивой к небольшим дозам нейтронов (0,5 и 1 Гр), а гамма-излучение при отдельном применении не приводило к снижению жизнеспособности более чем на 15 % даже в дозе 3 Гр (см. рисунок 2). В ходе экспериментов было выявлено, что цитотоксическое действие ионизирующего излучения в комбинации с аскорбатом в основном реализуется путем индукции апоптоза. Основная гипотеза радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития заключается в том, что определенные концентрации аскорбата лития в клеточной культуре могут проявлять прооксидантное действие и индуцировать окислительный стресс, синергетически усиливающий действие ионизирующего излучения. На основе полученных данных был предложен механизм действия аскорбата лития на опухолевые клетки посредством интенсификации образования H_2O_2 при самоокислении аскорбата в условиях повышенной концентрации аскорбата лития и перекиси водорода, образовавшейся в результате радиолиза воды. Параллельный возможный механизм радиосенсибилизирующего действия аскорбата лития связан с ингибированием натрий-зависимых транспортных белков аскорбиновой кислоты (преимущественно, SVCT2), которые экспрессируются на мембране. При повышении относительной концентрации литий, вероятно, способен существенно снижать ко-транспорт аскорбиновой кислоты. Однако роль этого механизма в регуляции захвата аскорбиновой кислоты и вклад в радиосенсибилизирующую активность требует дополнительного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано усиление цитотоксического эффекта при сочетанном применении лучевого воздействия и аскорбата лития. Радиосенсибилизирующее действие аскорбата лития более выражено при сочетании с нейтронным облучением.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gong L., Zhang Y., Liu C., Zhang M., Han S. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Internationaol Journal of Nanomedicine*. 2021;16:1083–1102. DOI: 10.2147/ijn.s290438.
2. Pfeffer C. M., Singh A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Internationaol Journail of Molecular Sciences*. 2018;19(2):448. DOI: 10.3390/ijms19020448.
3. Greenberg D. B., Younger J., Kaufman S. D. Management of lithium in patients with cancer. *Psychosomatics*. 1993;34(5):388–394. DOI: 10.1016/s0033-3182(93)71841-1.
4. Forlenza O. V., De-Paula V. J. R., Diniz B. S. O. Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *ACS Chemical Neuroscience*. 2014;5(6):443–450. DOI: 10.1021/cn5000309.
5. Duffy D. J., Krstic A., Schwarzl T., Higgins D. G., Kolch W. GSK3 inhibitors regulate *MYCN* mRNA levels and reduce neuroblastoma cell viability through multiple mechanisms, including p53 and Wnt signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(2):454–467. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-13-0560-t.
6. Plotnikov E. V., Korotkova E. I., Voronova O. A., Dorozhko E. V., Bohan N. A., Plotnikov S. Lithium-based antioxidants: electrochemical properties and influence on immune cells. *Physiology and Pharmacology*. 2015;19(2):107–113.
7. Cameron E., Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976;73(10):3685–3689. DOI: 10.1073/pnas.73.10.3685.
8. Chen Q., Espey M. G., Sun A. Y., Pooput C., Kirk K. L., Krishna M. C., Khosh D. B., Drisko J., Levine M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(32):11105–11109. DOI: 10.1073/pnas.0804226105.
9. Baiocco G., Barbieri S., Babini G., Morini J., Alloni D., Friedland W., Kundrát P., Schmitt E., Puchalska M., Sihver L., Ottolenghi A. The origin of neutron biological effectiveness as a function of energy. *Scientific Reports*. 2016;6(1):34033. DOI: 10.1038/srep34033.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-190-197
УДК 615.038

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа

М. А. Колганова[1]✉, О. С. Сагимбаева[1], Ю. С. Борисова[1], Е. Е. Бекетов[1, 3], И. Е. Шохин[2]

[1] ООО «Мабскейл», 445043, Россия, Самарская область, г. о. Тольятти, Территория ОЭЗ ППТ, Шоссе № 4, здание 5А
[2] ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[3] Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск, ул. Маршала Жукова, д. 10

✉ **Контактное лицо:** Мария А. Колганова. **E-mail:** m.kolganova@mabscale.ru

ORCID: М. А. Колганова – https://orcid.org/0000-0003-4568-1172; О. С. Сагимбаева – https://orcid.org/0009-0003-2645-4799;
Ю. С. Борисова – https://orcid.org/0009-0004-7990-8528; Е. Е. Бекетов – https://orcid.org/0000-0002-2485-6482; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 11.04.2023 **Статья принята в печать:** 18.05.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. «Трастузумаб» – препарат специфической анти-HER2 терапии одного из самых распространенных типов онкологических заболеваний – рака молочной железы. Несмотря на то, что препарат давно представлен на фармацевтическом рынке, дальнейшее совершенствование связанных с ним аналитических методик остается актуальным в первую очередь в свете разработки и исследования действия биоаналогов. Для трастузумаба одной из возможных нежелательных реакций со стороны иммунной системы является иммуногенность – выработка противолекарственных антител к препарату, в том числе нейтрализующих антител, которые могут влиять на эффективность и профиль безопасности препарата.

Цель. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека.

Материалы и методы. Определение нейтрализующих антител к трастузумабу проводилось с помощью метода конкурентного иммуноферментного анализа, с использованием фотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по показателям: предел исключения, чувствительность, селективность, специфичность, прецизионность и стабильность (краткосрочная и долгосрочная). Для снижения интерференции компонентов биологической матрицы в анализе на этапе разработки было определено значение минимального необходимого разбавления (1 : 200). Рассчитанное значение предела исключения составило 14,62 %. Чувствительность разработанной методики составила 1985,2 нг/мл нейтрализующих антител к трастузумабу.

Заключение. Полученные при валидации методики результаты позволяют применять методику определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека оценки иммуногенности препаратов трастузумаба при проведении клинических исследований биоаналогичности.

Ключевые слова: «Трастузумаб», нейтрализующие антитела, противолекарственные антитела, иммуногенность, биоаналоги

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

Вклад авторов. О. С. Сагимбаева, Ю. С. Борисова и М. А. Колганова участвовали в разработке и валидации методики. М. А. Колганова и Е. Е. Бекетов отвечали за написание текста статьи. И. Е. Шохин отвечал за методологию исследования и рецензирование текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Колганова М. А., Сагимбаева О. С., Борисова Ю. С., Бекетов Е. Е., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):190–197. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-190-197

Development and Validation of the ELISA Method for Neutralizing Anti-trastuzumab Antibodies Detection in Human Blood Serum

Maria A. Kolganova[1]✉, Olesya S. Sagimbaeva[1], Julia S. Borisova[1], Evgeny E. Beketov[1, 3], Igor E. Shokhin[2]

[1] LLC "Mabscale", 5A, Shosse No. 4, Special of industrial and production economic zone, Togliatti Urban District, Samara Region, 445043, Russia
[2] LLC "CPHA", 8, Simferopolskiy bulv., Moscow, 117638, Russia
[3] Medical Radiological Research Center named after A.F. Tsyba – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMITs Radiology", 10, Marshal Zhukov str., Obninsk, Kaluga Region, 249036, Russia

✉ **Corresponding author:** Maria A. Kolganova. **E-mail:** m.kolganova@mabscale.ru

ORCID: Maria A. Kolganova – https://orcid.org/0000-0003-4568-1172; Olesya S. Sagimbaeva – https://orcid.org/0009-0003-2645-4799;
Julia S. Borisova – https://orcid.org/0009-0004-7990-8528; Evgeny E. Beketov – https://orcid.org/0000-0002-2485-6482; Igor E. Shokhin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 11.04.2023 **Revised:** 18.05.2023 **Published:** 25.05.2023

© Колганова М. А., Сагимбаева О. С., Борисова Ю. С., Бекетов Е. Е., Шохин И. Е., 2023
© Kolganova M. A., Sagimbaeva O. S., Borisova Ju. S., Beketov E. E., Shokhin I. E., 2023

Abstract
Introduction. Trastuzumab is the first known anti-HER2 agent, which revolutionized the treatment of one of the most common cancer types – breast cancer. Despite trastuzumab being approved long time ago, further improvement of related analytical methods remains relevant primarily due to the emergence of new biosimilars. For instance, immunogenicity – adverse reaction which is usually associated with biological drugs, can still be relevant for trastuzumab. Anti-drug antibodies, including neutralizing antibodies, caused by trastuzumab therapy, can affect drug effectiveness and safety profile.
Aim. The aim of this study was to develop and validate the analytical method for neutralizing anti-trastuzumab antibodies determination in human blood serum.
Materials and methods. The neutralizing anti-trastuzumab antibody determination was carried out by the competitive ELISA method, using spectrophotometric detection in the visible range of the spectrum.
Results and discussion. The developed method was validated for cut-point, selectivity, sensitivity, specificity, precision and stability (short-term and long-term). To decrease the background noise from non-specific binding of sera components, the minimum required dilution value was determined at 0.5 % serum. The calculated value for cut-point was 14.62 %. The sensitivity of the developed method was estimated at 1985.2 ng/mL of neutralizing anti-trastuzumab antibodies.
Conclusion. The obtained results allowed us to apply the developed ELISA method for the neutralizing anti-trastuzumab antibodies determination in human blood serum during trastuzumab immunogenicity assessment in bioequivalence clinical trials.

Keywords: trastuzumab, neutralizing antibodies, anti-drug antibodies, immunogenicity, biosimilars

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. Olesya S. Sagimbaeva, Julia S. Borisova, and Maria A Kolganova participated in the development and validation of the analytical method. Maria A Kolganova and Evgeny E Beketov were responsible for paper draft preparation. Igor E. Shokhin was responsible for study methodology and article text review and editing. All authors participated in the discussion of the results and article review.

For citation: Kolganova M. A., Sagimbaeva O. S., Borisova Ju. S., Beketov E. E., Shokhin I. E. Development and validation of the ELISA method for neutralizing anti-trastuzumab antibodies detection in human blood serum. *Drug development & registration*. 2023;12(2):190–197. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-190-197

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания – одна из наиболее распространенных причин смертности во всем мире. В 2020 году смертность от различных типов рака составила более 10 миллионов случаев. При этом наиболее распространенными видами рака являются: рак молочной железы (РМЖ), легких, колоректальный рак и опухоли предстательной железы[1]. Именно РМЖ ежегодно занимает лидирующие позиции по заболеваемости и смертности среди всех онкологических заболеваний, и в частности среди онкозаболеваний у женщин. Так, по оценкам за один только 2020 год на долю РМЖ пришлось 12,5 % всех выявляемых случаев рака в мире. Из них, в структуре онкологических заболеваний у женщин, РМЖ занимает 25,8 %, если говорить о ситуации в мире[2] или 21,7 % если говорить о ситуации с выявлением новых случаев РМЖ в России [1]. При этом стоит отметить, что летальность данного типа рака на первом году с момента установления диагноза и начала лечения одна из самых низких среди всех злокачественных новообразований. Более того, за последние 10 лет она существенно сократилась с 8,7 % в 2011 году до 5,2 % в 2020 году [2].

К стандартным методам терапии онкологических заболеваний на сегодняшний день можно отнести хирургическое лечение, а именно: удаление опухоли или пораженного органа целиком (например, в случае РМЖ – радикальная мастэктомия), химиотерапию, лучевую терапию, гормональную терапию, а также такие инновационные методы, как иммунотерапия (например, препараты нацеленные на PD-1 или PDL-1), таргетная биологическая терапия (например, рекомбинантные фьюжн-белки, моноклональные антитела) и генная терапия. Зачастую самые лучшие прогнозы для пациентов дает именно сочетание нескольких видов лечения, например хирургическое вмешательство совместно с биологической или химиотерапией в адъювантных и неоадъювантных условиях. Сочетание биологической терапии и хирургического вмешательства часто применяется как терапия 1 линии при выявлении РМЖ [3,4].

Препарат «Трастузумаб» представляет собой гуманизированные моноклональные IgG1 антитела, содержащие мышиные CDR-фрагменты, слитые с константными участками легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина класса G. «Трастузумаб» стал одним из первых препаратов, направленных непосредственно на HER2/neu (точнее, на его IV вне-

[1] WHO fact sheet "Cancer". Available at: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer. Accessed: 10.04.2023.

[2] Global cancer statistics for the most common cancers in the world. Available at: https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data. Accessed: 10.04.2023.

клеточный домен) – человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2 типа, ассоциированный, в первую очередь, с одним из наиболее неблагоприятных для пациентов типов РМЖ: HER2-позитивным метастатическим РМЖ. Данный тип обычно ассоциирован с высоким риском метастазирования, и в том числе может приводить к метастазированию опухоли в головной мозг [5]. Внедрение трастузумаба в клиническую практику позволило существенно снизить летальность РМЖ HER2-позитивного подтипа. Другим показанием к применению трастузумаба в составе комбинированной терапии позже стала распространенная аденокарцинома желудка или пищеводно-желудочного перехода, также сопровождающаяся опухолевой гиперэкспрессией HER2. Более того, «Трастузумаб», как первый препарат, направленный на рецептор HER2, стал отправной точкой для создания препаратов-конъюгатов «моноклональное антитело-химиотерапевтический агент», а также би- или триспецифических антител или фьюжн-белков, направленных одновременно на различные субдомены HER2 (например, применение сочетанной терапии трастузумабом и пертузумабом) или сразу на несколько различных рецепторов-мишеней [6]. Например, в настоящее время в Российской Федерации уже зарегистрированы такие лекарственные препараты, как «Трастузумаб эмтанзин» и «Трастузумаб дерукстекан», в составе которых трастузумаб не только воздействует на HER2, но и выступает в роли системы таргетной доставки химиотерапевтических агентов в опухолевые клетки. Что касается би- и триспецифических препаратов таргетной терапии, разработки таких препаратов активно ведутся сразу в нескольких странах [7–10].

Одной из причин разработки новых препаратов на основе трастузумаба стало не только стремление увеличить эффективность терапии, но и часто встречающаяся резистентность к трастузумабу, которая может развиваться у пациентов при длительном применении препарата. Причинами такой резистентности могут служить различные мутации гена ERBB2, его транскрипционные и посттрансляционные изменения, или (в меньшей степени) иммуногенность препарата, и, в частности, антитела к трастузумабу, обладающие нейтрализующей активностью [11]. Несмотря на то, что «Трастузумаб» является достаточно низкоиммуногенным препаратом, нейтрализующие антитела могут связываться с ним в активном центре, тем самым предотвращая связывание трастузумаба с HER2 и снижая эффективность терапии. Противолекарственные антитела могут не только снижать эффективность лечения, но и влиять на профиль безопасности препарата [12].

Еще одной немаловажной проблемой является средняя стоимость биологической терапии, в частности терапии трастузумабом. Учитывая, что в среднем равновесная концентрация трастузумаба в организме достигается после 25 недель терапии (при многократном введении по схеме 1 раз в 3 недели), а общее время терапии может составлять вплоть до 1 года, стоимость такой длительной терапии для пациента по сравнению с другими видами лечения может быть выше на 300 % [13]. Таким образом, разработка новых биоаналогов трастузумаба, выход на рынок которых будет способствовать увеличению конкуренции, и, как следствие, снижению стоимости лечения трастузумабом [14], представляется перспективной задачей. В этом свете актуальным представляется разработка новых биоаналитических методик, которые можно использовать в ходе клинических исследований биоаналогов трастузумаба для получения данных о его фармакокинетике и иммуногенности.

Целью данной работы была разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА) для оценки иммуногенности препарата-биоаналога трастузумаба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Так как методика была разработана в рамках клинического исследования биоаналогичности препаратов трастузумаба, в качестве исследуемого препарата и препарата сравнения выступали оригинальный препарат Герцептин® и его биоаналог:

- *исследуемый препарат*: «Трастузумаб». Лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий. 440 мг / 20 мл (ООО «Мабскейл», Россия).
- *препарат сравнения*: Герцептин®. Лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий. 440 мг / 20 мл (F. Hoffmann-La Roche, Ltd., Швейцария).

Образцы исследуемого препарата и препарата сравнения хранили в холодильнике фармацевтическом в защищенном от света месте при температуре 2–8 °C.

Реактивы

В ходе валидации методики определения антител к трастузумабу в сыворотке крови человека использовали следующие реактивы: набор реагентов для иммуноферментного определения трастузумаба в сыворотке крови (ООО «НПЦ Пробиотек», Россия, партия 02, 03); антитела к трастузумабу, обладающие нейтрализующей активностью (Bio-Rad Laboratories, Inc., США, HCA177); бычий сывороточный альбумин (класса «pure», Sigma-Aldrich, США, A9647); полисорбат-20 (pure, pharma grade, PanReac, Испания, 142312); различные соли калия и натрия, а именно: калия хлорид (х.ч., ООО «Альдоса», Россия), натрия хлорид (х.ч., ООО «Альдоса», Россия), калия дигидрофосфат (ч.д.а., ООО «РусХим», Россия), натрия гидрофосфат (pure, pharma grade, PanReac, Испания, 141677).

Оборудование

В ходе разработке и валидации методики для определения оптической плотности образцов в лунках ИФА-планшета использовали фотометр Stat Fax 3200 (Awareness Technology, США). В качестве вспомогательного оборудования использовали: промыватель планшетов «Аквамарин» (BioSan, Латвия), термошейкер планшетный (BioSan, Латвия), встряхиватель Reax top (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия), весы аналитические OHAUS Pioneer PA-214C (OHAUS Corporation, США), одноканальные и многоканальные дозаторы различного объема (Thermo Fisher Scientific, США), pH-метр-милливольтметр (ООО «НПО «Аквилон», Россия) и мерную посуду (колбы, цилиндры) различной вместимости (Shott Duran, Германия). Воду очищенную 1 типа получали с помощью системы водоподготовки Аквалаб AL-1 (АО «НПК Медиана-Фильтр», Россия). Хранение реактивов и образцов осуществляли при температуре от +2 °С до +8 °С в холодильнике фармацевтическом ХФ-400-2 (АО «ПОЗиС», Россия) и не выше минус 35 °С в морозильнике медицинском ММ-180 (АО «ПОЗИС», Россия).

Методика определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека

Методика определения нейтрализующих антител основана на способности антител к трастузумабу ингибировать связывание препарата с мишенью (HER2). В ходе определения антител, обладающих нейтрализующей активностью, использовали набор реагентов для иммуноферментного определения трастузумаба в сыворотке крови, в состав которого входит планшет, покрытый рецептором HER2 и детектирующий реагент: козьи поликлональные антитела к человеческому Fc-фрагменту антител класса G, меченные пероксидазой хрена.

Согласно методике, образцы (контрольные/исследуемые), содержащие антитела к трастузумабу, инкубировали с раствором трастузумаба (25 нг/мл), таким образом, чтобы для образцов сыворотки крови одновременно достигалось требуемое минимально необходимое разведение (MRD – minimal required dilution). Кроме контрольных и исследуемых образцов в каждый цикл включали калибровочные образцы с известной концентрацией трастузумаба, отдельно приготовленные согласно инструкции к набору реагентов. После инкубации по 100 мкл смеси образцов вносили в лунки планшета, покрытого HER2, и инкубировали в течение 1 часа (250 об/мин) при комнатной температуре (КТ). По окончании инкубации планшет промывали и вносили в лунки по 100 мкл конъюгата, инкубировали 30 минут (250 об/мин) при КТ. После инкубации и промывки планшета во все лунки вносили по 100 мкл субстрата, и по истечении 15 минут инкубации при КТ останавливали реакцию. Измерение оптической плотности проводили при тестовой длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм.

Для каждого цикла строили калибровочную кривую зависимости концентрации трастузумаба от оптической плотности калибровочных образцов. Затем для каждого образца рассчитывали концентрацию трастузумаба, а также абсолютное значение относительной погрешности (RE, %), которая характеризовала насколько антитела к трастузумабу, нейтрализующие препарат в смеси, ингибировали его связывание с мишенью относительно добавленной (номинальной) концентрации 25 нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

В ходе разработки методики основная задача состояла в том, чтобы внести изменения в рекомендуемый инструкцией к ИФА-набору алгоритм проведения анализа, что позволило бы использовать набор, изначально предназначенный для количественного определения трастузумаба, для целей определения нейтрализующих антител к препарату. Был проведен подбор оптимального значения MRD для методики: наилучший результат показало использование концентрации сыворотки крови в 0,2 %; MRD составило 1:200. Также на этапе разработки была подобрана процедура предварительной инкубации исследуемых образцов с трастузумабом и выбрана оптимальная концентрация рабочего раствора трастузумаба (25 нг/мл). Одним из этапов разработки были эксперименты по добавлению в анализ кислотной диссоциации образцов, как меры увеличения толерантности методики к свободному трастузумабу в исследуемых образцах. Однако добавление в анализ кислотной диссоциации, даже в мягких условиях, негативно сказывалось на получаемых результатах. Вследствие этого для данной методики пришлось отказаться от кислотной диссоциации, тем самым снизив устойчивость разработанной методики к присутствию трастузумаба.

Валидация методики

Валидацию методики определения нейтрализующих антител к трастузумабу проводили в соответствии с руководством FDA: Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection[1] и Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского

[1] Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), January 2019. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-testing-therapeutic-protein-products-developing-and-validating-assays-anti-drug. Accessed: 12.04.2022.

экономического союза[1] по параметрам: предел исключения, чувствительность, селективность, специфичность, прецизионность и стабильность.

Предел исключения (cut-point)

Предел исключения определяли в ходе анализа 30 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, которые были проанализированы двумя аналитиками в течение 2 дней. Помимо образцов интактной сыворотки крови, каждый цикл включал образцы положительного контроля (PC – positive control; 20 000 нг/мл и 5000 нг/мл антител к трастузумабу) и образцы отрицательного контроля (NC – negative control; пулированная сыворотка крови человека). Для определения предела исключения была проведена статистическая обработка полученных результатов: относительная погрешность, E, %, для 30 образцов, для 2 аналитиков, 2 дня (итого N = 120). По результатам статистического анализа для использования был выбран фиксированный предел исключения, значение которого составило 14,62 %. При дальнейшем проведении анализа значение относительной погрешности образцов, E, % (т. е. отклонение фактической концентрации трастузумаба в образце от номинальной, добавленной в ходе выполнения анализа – 25 нг/мл), взятое по модулю, сравнивали с рассчитанным значением предела исключения. Образцы, для которых значение относительной погрешности больше либо равно пределу исключения, классифицируются как «положительные».

Чувствительность методики

Определение чувствительности методики проводили в ходе 2 циклов совместно с установлением концентраций образцов PC [на верхнем и нижнем уровнях: HPC (high positive control) и LPC (low positive control] соответственно). Анализировали образцы PC, содержащие антитела к трастузумабу в концентрации от 1000 до 30 000 нг/мл. Каждый цикл включал в себя три серии разведений, образцы PC и NC.

Для определения чувствительности анализа и расчета концентрации LPC были использованы номинальные значения концентраций стандартных образцов, значение относительной погрешности которых было выше, чем значение предела исключения. Значения концентрации антител (нг/мл) переводили в log-форму, а затем рассчитывали чувствительность и концентрацию LPC методики по формуле:

$$\text{Чувствительность, нг/мл} = \log(C_{mean}) + t_{df} \times SD.$$

где C_{mean} – средняя концентрация; t_{df} – односторонний t-критерий Стьюдента, соответствующий уровню значимости 0,05 для определения чувствительности или 0,01 для определения концентрации LPC; SD – стандартное отклонение выборки.

Перевод полученного значения в арифметическую шкалу из логарифмической позволил получить численное значение чувствительности методики (1985,2 нг/мл). Подробная информация о расчете чувствительности методики и LPC приведена в таблице 1.

Таблица 1. Расчет чувствительности методики и концентрации LPC

Table 1. Sensitivity and LPC concentration calculations

Серия разведений, № / Dilution series, No.	Концентрация стандарта, RE, % которого выше, чем предел исключения, нг/мл / Standard concentration. with RE, % value above cut-point, ng/mL	Концентрация стандарта, RE, % которого выше, чем предел исключения, log / Standard concentration. with RE, % value above cut-point, ng/mL (log)
1	1000	3,000
2	1000	3,000
3	1000	3,000
4	2000	3,301
5	1000	3,000
6	1000	3,000
Среднее (log) / Average (log)		3,050
SD (log)		0,123
Чувствительность (log) / Sensitivity (log)		3,298
Чувствительность, нг/мл / Sensitivity, ng/ml		1985,2
LPC (log)		3,464
LPC, нг/мл / LPC, ng/ml		2908,8

По результатам чувствительность методики составила 1985,2 нг/мл нейтрализующих антител к трастузумабу, а рассчитанная концентрация LPC – 2908,8 нг/мл. Для удобства и точности приготовления контрольных образцов практическая концентрации LPC была выбрана на уровне 2909,1 нг/мл антител к трастузумабу. Концентрация HPC была выбрана как верхняя точка в линейном диапазоне при построении калибровочной кривой и составила 20 000 нг/мл антител к трастузумабу.

Селективность

Селективность методики оценивали в ходе двух циклов с использованием 10 индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, включая гемолизные образцы. Каждый из циклов включал в себя по пять индивидуальных образцов интактной сыворотки крови человека, без добавления и с добавлением нейтрализующих антител к трастузумабу до уровней HPC и LPC. Селективность методики оцени-

[1] Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза, утвержденные решением Совета Евразийской Экономической Комиссии № 89, от 3 ноября 2016 г. Доступно по: http://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/11/8903111.pdf. Ссылка активна на 12.04.2022.

Таблица 2. **Прецизионность внутри цикла**

Table 2. **Intra-day precision**

Образец Sample	Набор образцов PC № PC samples set No.						Среднее Mean	CV, %
	1	2	3	4	5	6		
HPC	98,60	97,52	98,52	98,36	98,91	97,86	98,30	0,52
LPC	29,91	33,49	22,28	26,73	24,45	29,91	27,79	14,76

Таблица 3. **Прецизионность между циклами**

Table 3. **Inter-day precision**

	Цикл № Run No.							
Образец Sample	1	2	3	4	5	6	Среднее Mean	CV, %
HPC	98,30	92,36	93,68	98,64	98,15	98,52	96,61	2,91
LPC	27,79	29,83	23,05	31,39	32,42	27,50	28,66	11,73

вались путем сравнения RE, % образцов со значением предела исключения. Селективность методики была подтверждена, так как 90 % индивидуальных образцов (9/10) интактной сыворотки крови человека имели отклик ниже предела исключения, при этом 100 % образцов положительного контроля (HPC, LPC) были «положительными» по результатам сравнения рассчитанного значения RE, % со значением предела исключения.

Прецизионность

Для оценки прецизионности использовали образцы HPC и LPC, которые были проанализированы в ходе 6 циклов двумя аналитиками в течение трех дней. Каждый цикл включал в себя по три набора контрольных образцов (HPC, LPC и NC), первый цикл для первого аналитика включал в себя 6 наборов контролей для оценки прецизионности внутри цикла. Данные, полученные в ходе всех шести циклов, использовались для оценки прецизионности между циклами. Количественно прецизионность методики внутри и между циклами выражалась путем расчета коэффициента вариации (CV) для первого цикла и для всех шести циклов соответственно. Прецизионность рассчитывали с использованием значений RE, % для образцов положительного контроля (HPC, LPC). Полученные результаты приведены в таблице 2 (внутри цикла) и в таблице 3 (между циклами).

Рассчитанные значения CV не превышали 20 %, что соответствует требованиям нормативной документации[1].

[1] Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), January 2019. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-testing-therapeutic-protein-products-developing-and-validating-assays-anti-drug. Accessed: 12.04.2022.

Специфичность

В ходе валидации оценивалась специфичность методики в присутствии препаратов сопутствующей химиотерапии: «Доксорубицин», «Паклитаксел, и «Циклофосфамид». Для приготовления образцов оценки специфичности готовили образцы интерферирующих соединений (в сыворотке крови) и образцы HPC и LPC (в сыворотке крови) в двукратной концентрации. После чего образцы смешивали 1:1 для получения образцов для оценки специфичности с требуемыми концентрациями компонентов. Всего было протестировано по 4 концентрации для каждого из препаратов на уровнях HPC и LPC. Концентрации препаратов в лунках планшета (после всех разведений) составили 50, 25, 15 и 10 нг/мл соответственно. Для контроля специфичности методики также анализировали образцы NC с добавлением интерферирующих соединений.

Методика была признана специфичной в отношении препаратов сопутствующей химиотерапии, поскольку в образцах NC не наблюдалось результатов, превышающих предел исключения, тогда как образцы положительного контроля и на уровне HPC, и на уровне LPC демонстрировали значения RE, % выше предела исключения.

Стабильность

В ходе валидации методики оценивалась: кратковременная стабильность (bench-top stability, BTS: образцы PC перед анализом хранили 20 часов при КТ, 18–25 °C); стабильность при замораживании-размораживании (freeze-thaw stability, F/T: 3 цикла, каждая заморозка не менее 12 часов); а также долгосрочная стабильность (long-term stability, LTS: хранение в условиях низкотемпературной заморозки от минус 50 °C до минус 35 °C, оценка через 30 дней). Циклы по оценке различных видов стабильности помимо непосредственно образцов для оценки стабильности (по 3 набора образцов PC для каждого вида) вклю-

Таблица 4. **Рассчитанные для образцов оценки стабильности значения коэффициентов вариации**

Table 4. **CV values calculated for sample stability assessment**

Краткосрочная («настольная») стабильность Sample bench-top stability (BTS)						
Образец Sample	**1**	**2**	**3**	**Среднее** Mean	**S.D.**	**CV, %**
HPC_BTS20	96,03	96,54	97,95	96,84	0,997	1,03
LPC_BTS20	24,99	34,59	35,05	31,54	5,685	18,02
Стабильность при заморозке-разморозке *Sample freeze-thaw stability (F/T)*						
Образец Sample	**1**	**2**	**3**	**Среднее** Mean	**S.D.**	**CV, %**
HPC_F/T3	97,22	98,46	96,40	97,36	1,033	1,06
LPC_F/T3	29,05	29,60	21,35	26,67	4,612	17,29
Долгосрочная стабильность *Sample long-term stability (LTS)*						
Образец Sample	**1**	**2**	**3**	**Среднее** Mean	**S.D.**	**CV, %**
HPC_LTS30	98,77	98,43	98,64	98,62	0,171	0,17
LPC_LTS30	24,41	24,29	26,47	25,06	1,222	4,88

чали в себя два набора свежеприготовленных образцов РС – для контроля пригодности системы. Стабильность образцов оценивали путем расчета CV между тремя наборами образцов для каждого вида стабильности. Образцы были признаны стабильными, так как коэффициенты вариации не превышали 20 %. Полученные результаты приведены в таблице 4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована методика определения нейтрализующих антител к трастузумабу в сыворотке крови человека методом ИФА. Определение проводилось методом конкурентного ИФА с использованием фотометрического детектирования в видимом диапазоне спектра. Чувствительность методики и концентрация LPC были определены на уровне 1985,2 нг/мл и 2909,1 нг/мл нейтрализующих антител к трастузумабу соответственно. Полученные значения предела исключения и чувствительности валидированной методики позволяют применять ее для определения иммуногенности препаратов трастузумаба при проведении клинических исследований, в том числе исследований биоаналогичности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2021. 252 с.
2. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2021. 239 с.
3. Duan S., Buxton I. L. O. Evolution of Medical Approaches and Prominent Therapies in Breast Cancer. *Cancers*. 2022;14(10):2450. DOI: 10.3390/cancers14102450.
4. Tarantino P., Morganti S., Curigliano G. Biologic therapy for advanced breast cancer: recent advances and future directions. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2020;20(9):1009–1024. DOI: 10.1080/14712598.2020.1752176.
5. Семиглазова Т. Ю., Шарашенидзе С. М., Керимова С. Н., Клименко В. В., Малыгин А. Ю., Дашян Г. А., Палтуев Р. М., Семиглазов В. В., Криворотько П. В., Новиков С. Н., Семиглазов В. Ф. Современные подходы к лечению больных HER2-положительным раком молочной железы с метастазами в головном мозге. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2021;17(1):27–34. DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-1-27-34.
6. Liu X., Fang Y., Li Y., Li Y., Qi L., Wang X. Pertuzumab combined with trastuzumab compared to trastuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:894861. DOI: 10.3389/fonc.2022.894861.
7. Mohammadi M., Jeddi-Tehrani M., Golsaz-Shirazi F., Arjmand M., Bahadori T., Judaki M. A., Shiravi F., Zare H. A., Haghighat F. N., Mobini M., Amiri M. M., Shokri F. A Novel Anti-HER2 Bispecific Antibody with Potent Tumor Inhibitory Effects In Vitro and In Vivo. *Frontiers in Immunology*. 2021;11:600883. DOI: 10.3389/fimmu.2020.600883.
8. Li B., Meng Y., Zheng L., Zhang X., Tong Q., Tan W., Hu S., Li H., Chen Y., Song J., Zhang G., Zhao L., Zhang D., Hou S., Qian W., Guo Y. Bispecific antibody to ErbB2 overcomes trastuzumab resistance through comprehensive blockade of ErbB2 heterodimerization. *Cancer Research*. 2013;73(21):6471–6483. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0657.
9. Komarova, T. V., Sheshukova, E. V., Kosobokova, E. N. Kosorukov V. S., Shindyapina A. V., Lipskerov F. A., Shpudeiko P. S., Byalik T. E., Dorokhovet Y. L. The biological activity of bispecific trastuzumab/pertuzumab plant biosimilars may be drastically boosted by disulfiram increasing formaldehyde accumulation in cancer cells. *Scientific Reports*. 2019;9:16168. DOI: 10.1038/s41598-019-52507-9.
10. Volk A. L., Mebrahtu A., Ko B. K., Lundqvist M., Karlander M., Lee H. J., Frejd F. Y., Kim K. T., Lee J. S., Rockberg J. Bispecific Antibody Molecule Inhibits Tumor Cell Proliferation More Efficiently Than the Two-Molecule Combination. *Drugs in R&D*. 2021;21(2):157–168. DOI: 10.1007/s40268-021-00339-2.
11. Wang Z. H., Zheng Z. Q., Jia S. C., Liu S. N., Xiao X. F., Chen G. Y., Liang W. Q., Lu X. F. Trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer: Mechanisms, emerging biomarkers and targeting agents. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:1006429. DOI: 10.3389/fonc.2022.1006429.
12. Kilany L. A. A., Gaber A. A. S., Aboulwafa M. M., Zedan H. H. Trastuzumab immunogenicity development in patients' sera and in laboratory animals. *BMC Immunology*. 2021;22(1):15. DOI: 10.1186/s12865-021-00405-z.
13. da Luz F.A.C., da Costa Marinho E., Nascimento C. P., de Andrade Marques L., Delfino P. F. R., Antonioli R. M., Silva M. J. B., de Araújo R. A. The benefits of trastuzumab in the treatment of HER2$^+$ breast cancer as a function of exposure time. *Ecancermedicalscience*. 2022;16:1347. DOI: 10.3332/ecancer.2022.1347.

14. Barbier, L., Declerck, P., Simoens, S., Neven P., Vulto A., Huys I. The arrival of biosimilar monoclonal antibodies in oncology: clinical studies for trastuzumab biosimilars. *British Journal of Cancer* 2019;121:199–210. DOI: 10.1038/s41416-019-0480-z.

REFERENCES

1. Kaprin A. D., Starinskij V. V., Shahzadova A. O. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Moscow: MNIOI named after P. A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMITs Radiology" of the Ministry of Health of Russia; 2021. 252 p. (In Russ.)
2. Kaprin A. D., Starinskij V. V., Shahzadova A. O. The State of Oncological Care for the Population of Russia in 2020. Moscow: MNIOI named after P. A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMITs Radiology" of the Ministry of Health of Russia; 2021. 239 p. (In Russ.)
3. Duan S., Buxton I. L. O. Evolution of Medical Approaches and Prominent Therapies in Breast Cancer. *Cancers*. 2022;14(10):2450. DOI: 10.3390/cancers14102450.
4. Tarantino P., Morganti S., Curigliano G. Biologic therapy for advanced breast cancer: recent advances and future directions. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2020;20(9):1009–1024. DOI: 10.1080/14712598.2020.1752176.
5. Semiglazova T. Yu., Sharashenidze S. M., Kerimova S. N., Klimenko V. V., Malygin A. Yu., Dashyan G. A., Paltuev R. M., Semiglazov V. V., Krivorotko P. V., Novikov S. N., Semiglazov V. F. Current approaches to the treatment of HER2-positive breast cancer with brain metastases. *Tumors of female reproductive system*. 2021;17(1):27–34. (In Russ.) DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-1-27-34.
6. Liu X., Fang Y., Li Y., Li Y., Qi L., Wang X. Pertuzumab combined with trastuzumab compared to trastuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:894861. DOI: 10.3389/fonc.2022.894861.
7. Mohammadi M., Jeddi-Tehrani M., Golsaz-Shirazi F., Arjmand M., Bahadori T., Judaki M. A., Shiravi F., Zare H. A., Haghighat F. N., Mobini M., Amiri M. M., Shokri F. A Novel Anti-HER2 Bispecific Antibody with Potent Tumor Inhibitory Effects In Vitro and In Vivo. *Frontiers in Immunology*. 2021;11:600883. DOI: 10.3389/fimmu.2020.600883.
8. Li B., Meng Y., Zheng L., Zhang X., Tong Q., Tan W., Hu S., Li H., Chen Y., Song J., Zhang G., Zhao L., Zhang D., Hou S., Qian W., Guo Y. Bispecific antibody to ErbB2 overcomes trastuzumab resistance through comprehensive blockade of ErbB2 heterodimerization. *Cancer Research*. 2013;73(21):6471–6483. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0657.
9. Komarova, T. V., Sheshukova, E. V., Kosobokova, E. N. Kosorukov V. S., Shindyapina A. V., Lipskerov F. A., Shpudeiko P. S., Byalik T. E., Dorokhovet Y. L. The biological activity of bispecific trastuzumab/pertuzumab plant biosimilars may be drastically boosted by disulfiram increasing formaldehyde accumulation in cancer cells. *Scientific Reports*. 2019;9:16168. DOI: 10.1038/s41598-019-52507-9.
10. Volk A. L., Mebrahtu A., Ko B. K., Lundqvist M., Karlander M., Lee H. J., Frejd F. Y., Kim K. T., Lee J. S., Rockberg J. Bispecific Antibody Molecule Inhibits Tumor Cell Proliferation More Efficiently Than the Two-Molecule Combination. *Drugs in R&D*. 2021;21(2):157–168. DOI: 10.1007/s40268-021-00339-2.
11. Wang Z. H., Zheng Z. Q., Jia S. C., Liu S. N., Xiao X. F., Chen G. Y., Liang W. Q., Lu X. F. Trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer: Mechanisms, emerging biomarkers and targeting agents. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:1006429. DOI: 10.3389/fonc.2022.1006429.
12. Kilany L. A. A., Gaber A. A. S., Aboulwafa M. M., Zedan H. H. Trastuzumab immunogenicity development in patients' sera and in laboratory animals. *BMC Immunology*. 2021;22(1):15. DOI: 10.1186/s12865-021-00405-z.
13. da Luz F.A.C., da Costa Marinho E., Nascimento C. P., de Andrade Marques L., Delfino P. F. R., Antonioli R. M., Silva M. J. B., de Araújo R. A. The benefits of trastuzumab in the treatment of $HER2^+$ breast cancer as a function of exposure time. *Ecancermedicalscience*. 2022;16:1347. DOI: 10.3332/ecancer.2022.1347.
14. Barbier, L., Declerck, P., Simoens, S., Neven P., Vulto A., Huys I. The arrival of biosimilar monoclonal antibodies in oncology: clinical studies for trastuzumab biosimilars. *British Journal of Cancer* 2019;121:199–210. DOI: 10.1038/s41416-019-0480-z.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-198-205
УДК 347.77:614.2:615.2/3

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Регулирование вывода орфанных лекарственных препаратов на рынок Евразийского экономического союза как механизм повышения доступности лечения редких заболеваний (обзор)

А. В. Фотеева[1, 3], Н. А. Конева[1], О. С. Белоглазова[2], Н. Б. Ростова[3, 4]✉

[1] ООО «Парма Клиникал», 614042, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Причальная, зд. 1б
[2] АО «Медисорб», 614042, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Гальперина, д. 6, корп. 2
[3] ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПГФА), 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2
[4] ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ), 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15

✉ **Контактное лицо:** Ростова Наталья Борисовна. **E-mail:** n-rostova@mail.ru

ORCID: А. В. Фотеева – https://orcid.org/0000-0002-3752-7848; Н. А. Конева – https://orcid.org/0000-0001-8164-6521;
О. С. Белоглазова – https://orcid.org/0000-0003-3775-5557; Н. Б. Ростова – http://orcid.org/0000-0001-5579-394X.

Статья поступила: 14.03.2022 **Статья принята в печать:** 20.04.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. Обеспечение качественными, эффективными и безопасными лекарственными препаратами, предназначенными для лечения редких (орфанных) заболеваний среди населения государств-членов Союза, является одним из значимых и перспективных векторов развития для производителей-разработчиков. Обеспечение доступности лекарственными препаратами (ЛП) для пациентов, страдающих редкими заболеваниями, должно регулироваться путем государственного стимулирования разработки и вывода на рынок орфанных препаратов у отечественных производителей за счет актуализации и своевременного обновления нормативно-правовых актов в сфере регистрации ЛП, а также предоставления льгот при инициировании процесса регистрации.

Текст. В статье оценивались возможности и перспективы вывода в обращение орфанных лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза для отечественных производителей.

Заключение. Обзор возможностей и перспектив вывода в обращение орфанных лекарственных препаратов для отечественных производителей говорит о необходимости развития нормативно-правового регулирования аспектов фармацевтической разработки для повышения доступности лечения пациентов с редкими заболеваниями как на уровне РФ, так и в рамках правового поля Евразийского экономического пространства.

Ключевые слова: государственная регистрация лекарственных средств, ускоренная регистрация, орфанные препараты, неудовлетворенная медицинская потребность

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

Вклад авторов. Авторы совместно продумывали концепцию статьи, проводили поиск и сбор фактического материала в доступных публикациях в рецензируемых журналах, официальных интернет-сайтах, нормативно-законодательных актах; писали текст статьи и оформляли его в соответствии с общемедицинским профилем журнала. А. В. Фотеева проверяла статью. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Фотеева А. В., Конева Н. А., Белоглазова О. С., Ростова Н. Б. Регулирование вывода орфанных лекарственных препаратов на рынок Евразийского экономического союза как механизм повышения доступности лечения редких заболеваний. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):198–205. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-198-205

Regulation of the Launch of Orphan Drugs on the Market of the Eurasian Economic Union as a Mechanism to Increase the Availability of Treatment for Rare Diseases (Review)

Alexandra V. Foteeva[1, 3], Nataliia A. Koneva[1], Olga S. Beloglazova[2], Natalya B. Rostova[3, 4]✉

[1] LLC "Parma Clinical", 1b, Prichalnaya str., Perm, Perm Territory, 614042, Russia
[2] JSC "Medisorb", 6/2, Galperina str., Perm, Perm Territory, 614042, Russia
[3] Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia
[4] Perm State National Research University, 15, Bukireva str., Perm, Perm Territory, 614990, Russia

✉ **Corresponding author:** Natalya. B. Rostova. **E-mail:** n-rostova@mail.ru

ORCID: Alexandra V. Foteeva – https://orcid.org/0000-0002-3752-7848; Nataliia A. Koneva – https://orcid.org/0000-0001-8164-6521;
Olga S. Beloglazova – https://orcid.org/0000-0003-3775-5557; Natalya B. Rostova – http://orcid.org/0000-0001-5579-394X.

Received: 14.03.2022 **Revised:** 20.04.2023 **Published:** 25.05.2023

© Фотеева А. В., Конева Н. А., Белоглазова О. С., Ростова Н. Б., 2023
© Foteeva A. V., Koneva N. A., Beloglazova O. S., Rostova N. B., 2023

Abstract
Introduction. Providing high-quality, effective and safe drugs intended for the treatment of rare (orphan) diseases among the population of the Member States of the Union is one of the most significant and promising development vectors for manufacturers-developers. Ensuring the availability of medicines (MP) for patients suffering from rare diseases should be regulated by state incentives for the development and launch of orphan drugs on the market by domestic manufacturers through updating and timely updating of regulatory legal acts in the field of drug registration, as well as providing benefits when initiating the registration process.
Text. The article assessed the possibilities and prospects for the introduction of orphan drugs into circulation within the framework of the Eurasian Economic Union for domestic manufacturers.
Conclusion. A review of the possibilities and prospects for launching orphan drugs for domestic manufacturers indicates the need to develop regulatory and legal regulation of aspects of pharmaceutical development in order to increase the availability of treatment for patients with rare diseases, both at the level of the Russian Federation and within the legal framework of the Eurasian Economic Space.

Keywords: state registration of medicines, accelerated registration, orphan drugs, unmet medical need

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

Contribution of the authors. The authors jointly thought out the concept of the article, searched for and collected factual material in available publications in peer-reviewed journals, official Internet sites, regulatory and legislative acts, wrote the text of the article and designed it by the general medical profile of the journal. Alexandra V. Foteeva checked the article. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Foteeva A. V., Koneva N. A., Beloglazova O. S., Rostova N. B. Regulation of the launch of orphan drugs on the market of the Eurasian Economic Union as a mechanism to increase the availability of treatment for rare diseases. *Drug development & registration*. 2023;12(2):198–205. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-198-205

ВВЕДЕНИЕ

Орфанные препараты (от англ. *an orphan – сирота*) – лекарственные средства (ЛС), разработанные для лечения редких («сиротских») заболеваний. Присвоение статуса орфанности заболеваниям и лекарственным препаратам (ЛП), предназначенным для их лечения, является значимым вопросом во многих странах. Только введение государственного регулирования фармацевтической разработки и исследований орфанных ЛП привело к прорывам в медицине, которые были бы невозможны из-за экономических аспектов этих процессов.

Определение орфанных заболеваний, как и уровень распространенности заболевания на уровне населения отдельных стран, не являются едиными. Некоторые определения опираются на количество пациентов с редкими заболеваниями, другие определения основываются на иных критериях, таких как доступность лечения болезни или возможность облегчения ее течения. В США Акт о редких заболеваниях (Rare Disease Act) 2002 года определяет орфанные болезни как «болезни или состояния, затрагивающие менее 200 000 людей в США». В Японии орфанные болезни определяются как болезни, затрагивающие менее 50 000 пациентов в Японии. Евросоюз (ЕС) приводит следующее определение орфанных болезней: «Орфанное заболевание – это угрожающее жизни и здоровью хроническое заболевание, которое имеет настолько низкую встречаемость, что необходимо применение специальных усилий для предотвращения заболеваемости, ранней смертности и повышения качества жизни больных». Частота встречаемости орфанных заболеваний в ЕС составляет 5 на 10 000 населения [1].

Следует отметить, что понятие орфанности применимо не к конкретной молекуле ЛП, а именно к тем показаниям, при которых назначаются данные препараты. Также как и не весь перечень показаний для медицинского применения регистрационного досье ЛП может иметь орфанный статус. Понятие орфанности распространяется только лишь на определенные нозологические формы заболеваний, утверждаемые уполномоченным органом на государственном уровне [2].

Значимость вопросов лекарственного обеспечения населения в РФ с орфанными заболеваниями определена рядом документов. Так, «орфанные заболевания» получили юридический статус в 2011 году с принятием 21 ноября 2011 г. ФЗ № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»[1]. В соответствии с ч. 9 ст. 83 данного ФЗ граждане РФ, страдающие жизне-угрожающими и хроническими прогрессирующими редкими (орфанными) заболеваниями, имеют право на обеспечение препаратами, предназначенными для лечения этих заболеваний, за счет средств субъектов РФ, а перечень дан-

[1] Федеральный закон Российской Федерации № 323-ФЗ от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (изм., внесенными Постановлениями КС РФ от 13.01.2020 № 1-П, от 13.07.2022 № 31-П). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_121895/ Ссылка активна на 01.12.2022.

ных заболеваний определен Постановлением Правительства РФ[1].

При этом изучение проводимой политики в части регламентации определения орфанных заболеваний и обращения ЛП для их лечения в РФ и в Европе позволяет определить следующие аспекты, требующие особо внимания и решения:

- ✓ многие ЛП для лечения орфанных заболеваний, зарегистрированные в Европе, не зарегистрированы в России;
- ✓ препараты, имеющие статус орфанности в Европе, не имеют такого статуса в России;
- ✓ большая часть ЛП, закупаемых органами исполнительной власти субъектов РФ, для лекарственного обеспечения пациентов с орфанными заболеваниями, не имеет статус орфанного препарата;
- ✓ в РФ не регламентированы специальные государственные стимулирующие меры по разработке орфанных ЛП отечественными производителями;
- ✓ большой перечень ЛП из Европейского официального списка орфанных ЛП может быть перспективным направлением для разработки и регистрации отечественными организациями-производителями[2] [3].

Орфанные ЛП не являются вектором направления инвестиций для крупных фармацевтических компаний по ряду причин, связанных с фармацевтической разработкой, клиническими исследованиями (КИ) и регистрацией. Одна из причин почему нет большого интереса производителей к данным ЛП – это отсутствие большого количества пациентов, которые являются потенциальными потребителями этого ЛП. Крупная фармацевтическая промышленность оценивает разработку и продажу маленьких партий орфанных ЛП как экономически не выгодный процесс и весьма трудозатратный. Окупаемость всех затрат на фармацевтическую разработку, доклинические и клинические исследования редких ЛП невозможно достигнуть за короткий временной промежуток, зачастую это занимает годы [4].

Данных по разработке и исследованиям ЛП для лечения редких заболеваний недостаточно в мировой практике, основанных на проведенных исследованиях самих производителей-разработчиков с орфанными ЛП.

В связи с этим имеется много проблем, связанных с количеством серий ЛП и качеством орфанных ЛП, выводимых как на российский фармацевтический рынок, так и на рынок Евразийского экономического союза.

Организация клинических исследований в условиях ограниченности субъектов исследования

Для обеспечения вывода орфанных ЛП на рынок государства-члена ЕАЭС с целью удовлетворения медицинских потребностей пациентов и обеспечения защиты определенных групп населения возможна регистрация ЛП без полных данных по клиническим исследованиям с исполнением особых обязательств перед уполномоченным органом [5]. Для производителя-разработчика это облегчает инициацию процедуры регистрации в государстве-члене и ускоряет процесс вывода редких препаратов на рынок. Однако при проведении клинических исследований (КИ) на данных пациентах возникает ряд проблем:

- для проведения исследований могут потребоваться пациенты, не получавшие ранее лечения;
- при этом возникает вопрос об этичности использования плацебо как контрольного препарата у части исследуемой популяции пациентов. Авторами работы J. Mitsumoto был проведен анализ более 33 клинических исследований на 19 «редких» препаратах. Без препаратов сравнения и плацебо были проведены 33 % случая КИ, двойное слепое КИ – 27 %, нерандомизированные КИ – 12 % [6];
- при отсутствии проведенных КИ возникают сложности с выбором критериев для оценки эффективности КИ.

Ранее автором R. L. A. de Vrueh уже было отмечено, что все завершенные клинические исследования редких препаратов носят «пилотный характер». Количество участников таких исследований составило менее 100 человек. Таким образом, критерии эффективности препаратов считаются малообоснованными [7].

Присвоение орфанного статуса. Данный статус ЛП присваивается в РФ при соответствии его следующим критериям:

1. ЛП применяется для лечения заболевания, встречающегося с частотой не более 10 на 100 000 населения.
2. ЛП применяется для лечения заболеваний, перечень которых регламентирован Правительством РФ[3].

- в Республике Казахстан 1 случай на 10 000 населения[4];

[1] Постановление Правительства РФ № 403 от 26 апреля 2012 г. «О порядке ведения Федерального регистра лиц, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими редкими (орфанными) заболеваниями, приводящими к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидности, и его регионального сегмента» (с изм. от 5 июня 2020 г.). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_129078/92d969e26a4326c5d02fa79b8f9cf4994ee5633b/ Ссылка активна на 01.12.2022.

[2] Orphan Medical Product Designation. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/orphan-medicines-figures-2000-2021_en.pdf. Accessed: 01.12.2022.

[3] Перечень редких (орфанных) заболеваний от 31 марта 2022 года. Доступно по:https://minzdrav.gov.ru/documents/9700-perechen-redkih-orfannyh-zabolevaniy. Ссылка активна на 01.12.2022.

[4] Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан № 304 от 10 июня 2009 г. «О Порядке формирования Перечня орфанных (редко применяемых) лекарственных средств». Доступно по: https://online.zakon.kz/Document/?doc_id=30437668. Ссылка активна на 01.12.2022.

- в Республике Беларусь не более 1 случая на 10 000 населения[1];
- в Республике Киргизия 10 случаев на 100 000 населения[2];
- в Республике Армения в законе «О лекарственных средствах» от 2016 года с изменениями и дополнениями отсутствует термин «орфанный препарат»[3].

В Союзе заявитель располагает несколькими возможными подходами для ускорения регистрации ЛП на основании, вступивших в силу 28.03.2022 г., изменений в Правила регистрации и экспертизы ЛС для медицинского применения, утвержденных Советом ЕЭК № 36[4] [5]. Все эти подходы имеют свои особенности и соответствующие процедуры. При положительном решении рассмотрения о возможности присвоения статуса орфанного ЛП следует процесс регистрации с оценкой соотношения «польза-риск» и оценка методов контроля качества. Положительным моментом для производителя-разработчика можно считать возможность использования результатов доклинических (ДКИ) и КИ. Такие ДКИ и КИ могут быть проведены за пределами РФ, но в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики и правилами надлежащей клинической практики. Такая практика для стран ЕС считается общепринятым правилом, однако для РФ данный момент считается исключением из правил и привилегией [8]. На сегодняшний день законодательство ЕАЭС дает возможность производителю или разработчику проводить регистрацию орфанных ЛП по нескольким процедурам:

- регистрации в исключительных случаях;
- ускоренной процедуре;
- условной регистрации;
- регистрации с установлением дополнительных требований.

Регистрация в исключительных случаях может быть осуществлена в случае, если заявитель сможет показать, что он не способен предоставить исчерпывающие данные об эффективности и безопасности ЛП в нормальных условиях его применения в силу объективных проверяемых причин. Регистрационное удостоверение (РУ) ЛП выдается при условии выполнения особых обязательств в случае, если заявитель может подтвердить (обосновать), что невозможно предоставить полные данные об эффективности и безопасности ЛП при обычных условиях его применения по одной из следующих причин:

- показания к применению, по которым предлагается применять ЛП, встречаются настолько редко, что заявитель обоснованно не может ожидать получения всестороннего подтверждения доказательств эффективности и безопасности ЛП;
- при текущем состоянии научных знаний не может быть представлена исчерпывающая информация об эффективности или безопасности ЛП;
- получение информации об эффективности или безопасности ЛП будет противоречить общепринятым принципам медицинской этики.

Указанные обязательства включают в себя следующее:

- заявитель должен завершить в срок, установленный уполномоченным органом референтного государства (УО РГ), определенную программу исследований безопасности или эффективности, результаты которой позволяют провести повторную оценку соотношения «польза/риск»;
- для рассматриваемого ЛП должна быть установлена категория отпуска «рецептурные препараты» и применение в определенных случаях только под строгим медицинским наблюдением (например, в стационаре), а для радиофармацевтических ЛП – применение под наблюдением имеющего соответствующее разрешение лица;
- общая характеристика лекарственного препарата (ОХЛП), листок-вкладыш (ЛВ), РУ и любая медицинская информация должны содержать привлекающую внимание пользователя информацию о том, что имеющиеся данные о ЛП являются недостаточными в части подтверждения определенных аспектов безопасности и эффективности.

Продолжение нахождения ЛП, являющегося объектом процедур, описанных в настоящем пункте, на рынке Союза должно зависеть от переоценки таких условий, ежегодно проводимой УО референтного государства, с подготовкой экспертного отчета об оценке ЛП. Процессуальные особенности применения настоящего пункта приведены в приложении № 25 к Правилам регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения[5].

---

[1] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 1222 от 19.11.2020 г. «О перечне орфанных (редких) заболеваний». Доступно по: https://normativka.by/lib/document/91783/ Ссылка активна на 12.01.2022.

[2] В Кыргызстане утвержден Перечень орфанных заболеваний для повышения доступности ЛП. Доступно по: https://gxpnews.net/2019/06/v-kyrgyzstane-utverzhden-perechen-orfannyx-zabolevanij-dlya-povysheniya-dostupnosti-lp/ Ссылка активна на 01.12.2022.

[3] Закон Республики Армения № ЗР-86 от 13 июня 2016 г. «О лекарственных средствах». Доступно по: http://base.spinform.ru/show_doc.fwx?rgn=89529/ Ссылка активна на 01.12.2022.

[4] Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 36 от 17 марта 2022 г. «О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01431480/err_18032022_36. Ссылка активна на 01.12.2022.

[5] Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 36 от 17 марта 2022 г. «О внесении изменений в Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01431480/err_18032022_36. Ссылка активна на 01.12.2022.

Регистрация в исключительных случаях предполагает:

- ✓ принципиальную невозможность предоставления полного объема данных по эффективности и безопасности;
- ✓ ежегодный пересмотр со стороны УО.

Если ситуация меняется и заявитель сможет представить полные данные, регистрация становится постоянной. Раздел 11, часть 2, приложение № 1 описывает специальные процедуры (обязательства), которые могут включать в себя:

- ✓ программу исследований ЛП;
- ✓ условия назначения или введения ЛП;
- ✓ обязанности по уведомлению УО;
- ✓ обязанности по изменению информации о ЛП.

Ускоренная экспертиза. Данный регуляторный процесс имеет особую значимость при регистрации ЛП, в том числе орфанных, а также ЛП, необходимых для поддержания здоровья населения, в частности при отсутствии эффективных методов оказания медицинской помощи в ГЧ, определяемых Экспертным комитетом по ЛС, на основании обращения УО ГЧ, в котором подано обращение заявителя об особой значимости ЛП до подачи заявления на регистрацию. Предусмотрена возможность особого обозначения статуса препарата – «прорывная терапия», которая позволяет также существенно сокращать необходимый объем клинических данных для получения разрешения на регистрацию.

Условная регистрация. В случае обоснования необходимости обеспечения неудовлетворенных медицинских потребностей для ЛП, предназначенных для лечения, профилактики или диагностики серьезных (тяжелых) инвалидизирующих или угрожающих жизни заболеваний, регистрация может быть осуществлена до представления на момент подачи заявления о регистрации исчерпывающих клинических данных, предусмотренных разделом 5, приложением № 1 к Правилам регистрации и экспертизы ЛС для медицинского применения, при условии, что польза от более ранней доступности рассматриваемого ЛП на рынке превышает риск, связанный с отсутствием исчерпывающих данных. При экстренной необходимости в подобных ЛП их регистрация может быть проведена без предоставления исчерпывающих доклинических или биофармацевтических данных. В целях настоящего подраздела под «неудовлетворенными медицинскими потребностями» понимается состояние, для которого:

- в Союзе нет одобренного УО разрешенного и признанного эффективного метода диагностики, профилактики или лечения;
- либо применение подаваемого на условную регистрацию ЛП будет обладать существенным преимуществом перед уже одобренным УО методом диагностики, профилактики или лечения. Условная регистрация может осуществляться только если соотношение «польза/риск» ЛП положительное, а также если заявитель вероятно сможет после проведения процедуры условной регистрации представить исчерпывающие недостающие данные по безопасности, эффективности и качеству ЛС. Условная регистрация должна сопровождаться выполнением держателем РУ особых условий. Эти особые условия и предельный срок их выполнения в качестве условий регистрации устанавливаются УО государства-члена и подлежат ежегодной оценке этим УО. В рамках особых условий ДРУ необходимо обязать завершить проводимые исследования или провести новые исследования с целью подтверждения положительного соотношения «польза/риск». ОХЛП и ЛВ должны содержать понятную формулировку о том, что регистрация ЛП осуществлена с условием выполнения особых условий в соответствии с Правилам регистрации и экспертизы ЛС для медицинского применения. В отношении определенных категорий ЛП в целях обеспечения неудовлетворенных медицинских потребностей пациентов и защиты интересов здоровья населения может потребоваться регистрация на основании менее полных, чем обычно данных, но при выполнении установленных особых обязательств. Условная регистрация применима к ЛП с таким соотношением «польза/риск», для которого польза от допуска на рынок рассматриваемого ЛП будет превышать риск, связанный с отсутствием части данных о безопасности и эффективности ЛП на момент его регистрации (т. е. к ЛП с доказанной способностью обеспечивать неудовлетворенные медицинские потребности системы здравоохранения). При этом необходимо соблюсти ВСЕ следующие условия:
  - ✓ положительное соотношение «польза/риск» ЛП;
  - ✓ заявитель способен в последующем (после регистрации ЛП) представить полные клинические данные (а также при необходимости доклинические данные и данные о качестве) – отличие от регистрации в исключительных случаях;
  - ✓ регистрация ЛП позволит обеспечить неудовлетворенные медицинские потребности системы здравоохранения;
  - ✓ польза для здоровья населения от допуска на рынок ЛП превысит риск, связанный с отсутствием части данных о безопасности и эффективности ЛП на момент его регистрации (при условии предоставления таких данных в дальнейшем).

Регистрация с установлением дополнительных требований. Уполномоченным органом РГ в отношении ЛП при его регистрации и осуществлении процедур, связанных с регистрацией, могут устанавливаться следующие дополнительные требования, которые указываются в РУ, Едином реестре, ОХЛП, ЛВ:

- проведение пострегистрационных исследований эффективности ЛП, при необходимости – исследований различных аспектов эффективности ЛП,

которые не могут быть исследованы до начала реализации ЛП;
- другие условия или ограничения в целях безопасного и эффективного применения ЛП в соответствии с требованиями Правил надлежащей практики фармаконадзора Союза.

Условием регистрации и подтверждения регистрации (перерегистрации) ЛП уполномоченной организацией может быть установлено обязательство по проведению ДРУ:
- пострегистрационных исследований безопасности ЛП в случае наличия опасений по поводу рисков, связанных с применением данного ЛП. В случае, если риски относятся более чем к одному ЛП, УО государства-члена способствуют проведению ДРУ таких ЛП совместных пострегистрационных исследований безопасности;
- пострегистрационных исследований эффективности ЛП, если понимание заболевания или клиническая методология показывают, что предыдущие оценки эффективности требуют существенного пересмотра.

Как видно из таблицы 1, регламентированная многовариантность процедур, по которым можно регистрировать орфанный ЛП, облегчает организациям разработчикам и производителям процесс вывода орфанных ЛП на фармацевтический рынок, обеспечивая доступ к лечению пациентов с редкими заболеваниями.

Процедуры проведения клинических исследований и регистрации орфанных препаратов, основанные на неполных данных о качестве, эффективности и безопасности, могут привести к развитию терапии осложнений у пациентов с «редкими» заболеваниями. Проведенные КИ на малых группах пациентов и ускоренный процесс регистрации может влиять на контроль за безопасным обращением орфанных ЛП. Небольшая выборка пациентов и ускоренный процесс внедрения в систему здравоохранения с целью применения на пациентах таких препаратов несут в себе потенциальный риск безопасного применения. Зачастую это связано с необходимостью очень быстрого вывода таких препаратов на рынок и их применение в медицинской практике из-за отсутствия альтернативных принципов лечения орфанных заболеваний. Но, несмотря на «ускорение» процесса фармацевтической разработки и регистрации, имеющее негативные моменты, существует превалирующее достоинство процесса [9]. Оправданием такого риска становится обеспечение пациентов единственно возможным способом лечения орфанных заболеваний, который положительно влияет на качество жизни пациентов с этими заболеваниями.

Отсутствие аналогов на мировом рынке приводит к тому, что орфанные препараты становятся уникальными и эксклюзивными в своем роде. Фармацевтические компании, разработавшие и выпускающие такие ЛП, могут считаться монополистами за счет того, что нет конкурирующих компаний [10]. Такие условия создают возможность обладания разработчика-производителя эксклюзивными маркетинговыми правами на орфанный препарат и возможность для него необоснованно завышать стоимость редких препаратов.

Развитие регуляторных процедур ЕАЭС имеет принципиальное значение для интересов национальных фармацевтических предприятий в области разработки и регистрации орфанных препаратов. С одной стороны, это возможность ускорения темпа вывода на рынок редких лекарств. Однако, с другой стороны, надо отметить, что руководствуясь приоритетом здоровья пациентов, разработчик-производитель несет определенные риски. Поэтому по мере развития требований по разработке орфанных ЛП необходимо сближать интересы фармацевтических организаций и потребности пациентов, страдающих орфанными заболеваниями. Это важно и с точки зрения решения важнейших медицинских задач государства – повышения качества жизни пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дефицит ЛП для лечения орфанных заболеваний в сочетании с недоступностью существующих методов значительно ухудшают жизнь пациентов с орфанными болезнями. Инновационная терапия позволяет людям с редкими заболеваниями вести полноценную, активную жизнь. Поэтому важно продолжать исследования редких заболеваний, вести разработку новых ЛП и повышать их ассортиментную и ценовую доступность для пациентов, ставя во главу угла жизнь и здоровье пациента.

Евразийская экономическая комиссия принимает меры, цель которых – оперативное реагирование на угрозу жизни и здоровью пациентов с орфанными заболеваниями. Принимаемые решения помогают стабилизировать ситуацию с лекарствами на фармацевтическом рынке и имеют важное значение для населения стран Союза. Кроме того, регулирующие органы продолжают работать над новыми мерами к ускорению выхода в обращение препаратов для пациентов с орфанными заболеваниями.

Ускорение выведения на отечественный рынок новых препаратов для применения в тех областях, где существует неудовлетворенная лекарственная потребность, станет положительным вектором развития отечественного законодательства в сфере регулирования обращения ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев А. А. Бремя орфанных болезней. *Газета. Медицинская газета*. 7 марта 2012. № 16. С. 10.
2. Рождественский Д. А. Регистрация орфанных и биотехнологических препаратов по правилам ЕАЭС. *Вопросы организации и информатизации здравоохранения*. 2018;2(95):76–81.
3. Фотеева А. В., Ростова Н. Б., Исупова А. Д., Гербергаген Е. С. Орфанные препараты: международные подходы и национальное регулирование. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2021;29(6):1490–1497. DOI: 10.32687/0869-866X-2021-29-6-1490-1497.

Таблица 1. Сопоставление процедуры регистрации в исключительных случаях, ускоренной экспертизы, условной регистрации и регистрации с установлением дополнительных требований в ЕАЭС

Table 1. Comparison of the procedure for registration in exceptional cases, accelerated examination, conditional registration and registration with the establishment of additional requirements in the EAEU

Регистрация в исключительных случаях Registration in exceptional cases	**Ускоренная экспертиза** Accelerated examination	**Условная регистрация** Conditional Registration	**Регистрация с установлением дополнительных требований** Registration with additional requirements
Процедура может быть применена: • для орфанных ЛП. Исчерпывающие данные по эффективности и безопасности не представлены, но регистрация обоснована в связи с исключительными обстоятельствами. В рамках такой регистрации будут рассматриваться результаты КИ, проведенных в любой стране мира, вне зависимости от даты их начала/завершения The procedure can be applied: • for orphan drugs. Comprehensive data on efficacy and safety are not presented, but registration is justified due to exceptional circumstances. As part of such registration, the results of clinical trials conducted in any country of the world will be considered, regardless of their start/end date	Процедура может быть применена: • для орфанных ЛП; • для препаратов, применяемых исключительно несовершеннолетними гражданами; • для ЛП, представляющих особую значимость для здоровья населения (данные ЛП определяет экспертный комитет при ЕЭК). Если препарат заявлен на регистрацию с целью обращения в одном только референтном государстве для лечения орфанного заболевания, включенного в перечни, которые ведутся в соответствии с законодательством этого государства, то исключается необходимость проведения отдельной процедуры установления орфанного статуса. Заявитель вправе запросить проведение ускоренной и условной регистрации The procedure can be applied: • for orphan drugs; • for drugs used exclusively by minors; • for medicinal products that are of particular importance for public health (these medicinal products are determined by the expert committee under the EEC). If a drug is applied for registration for the purpose of circulation in only one reference state for the treatment of an orphan disease included in the lists maintained in accordance with the legislation of that state, then the need for a separate orphan status determination procedure is eliminated. The applicant has the right to request an accelerated and conditional registration	Процедура может быть применена: • для орфанных ЛП; • ЛП применяется для лечения тяжелых, инвалидизирующих или опасных для жизни заболеваний; • ЛП используется в чрезвычайных ситуациях The procedure can be applied: • for orphan drugs; • medicines is used to treat severe, disabling or life-threatening diseases; • medicines is used in emergency situations	Процедура может быть применена: • для ЛП, обладающих прорывным эффектом в отношении лечения ранее трудноизлечимых заболеваний; • для ЛП, в которых имеется высокая потребность у систем здравоохранения стран ЕАЭС; • для орфанных ЛП The procedure can be applied: • for medicines that have a breakthrough effect in the treatment of previously intractable diseases; • for medicines in which there is a high demand among the healthcare systems of the EAEU countries; • for orphan drugs
• РУ выдается на 5 лет; • ежегодная переоценка «польза/риск»; • выдача бессрочного РУ в случае подтверждения регистрации заявителем • MA is issued for 5 years; • annual benefit/risk reassessment; • issuance of an unlimited MA in case of confirmation of registration by the applicant	• РУ выдается на 5 лет • MA is issued for 5 years	• РУ выдается на 1 год; • ежегодная переоценка «польза/риск»; • выдача РУ на 5 лет в случае выполнения особых условий; • после перерегистрации выдача бессрочного РУ • MA is issued for 1 year; • annual benefit/risk reassessment; • issuance of MA for 5 years in case of fulfillment of special conditions • after re-registration, issuance of an indefinite MA	• РУ выдается на 5 лет в случае подтверждения обязательств • MA is issued for 5 years in case of confirmation of obligations

4. Мищенко М. А., Сыбатова Е. П., Мищенко Е. С. Современное состояние и перспективы развития рынка орфанных лекарственных препаратов. *MODERN SCIENCE*. 2022;3–2:223–228.
5. Нефидова О. Г., Бабаскин Д. В., Сазонов А. Д., Камалетдинова А. А. Анализ основных изменений в правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения в рамках Евразийского экономического союза. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(2):222–226. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-222-226.
6. Mitsumoto J., Dorsey E. R., Beck C. A., Kieburtz K., Griggs R. C. Pivotal studies of orphan drugs approved for neurological diseases. *Ann Neurology*. 2009;66(2):184–190. DOI: 10.1002/ana.21676.
7. De Vrueh R. L. A. Why R&D into Rare Diseases Matter. In: Bali R. K., Bos L., Gibbons M. C., Ibell S., editors. Rare Diseases in the Age of Health 2.0. London: Springer Nature; 2014. P. 3–20. DOI: 10.1007/978-3-642-38643-5_1.
8. Кугач А. А., Кугач В. В. Экспертиза и регистрация орфанных лекарственных препаратов. *Вестник фармации*. 2021;1(91):20–35. DOI: 10.52540/2074-9457.2021.1.20.
9. Brabers A. E. M., Moors E. H. M., van Weely S., de Vrueh R. L. A. Does market exclusivity hinder the development of Follow-on Orphan Medicinal Products in Europe? *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6(1):59. DOI: 10.1186/1750-1172-6-59.
10. Tambuyzer E. Rare diseases, orphan drugs and their regulation: questions and misconceptions. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(12):921–929. DOI: 10.1038/nrd3275.

REFERENCES

1. Lebedev A. A. The burden of orphan diseases. *Newspaper. Medical newspaper*. March 7, 2012. No. 16. P. 10. (In Russ.)
2. Rozhdestvenskiy D. A. Registration of orphan and biotechnological products under the rules of eurasian economic UNITY. *Issues of organization and informatization of healthcare*. 2018;2(95):76–81. (In Russ.)
3. Foteeva A. V., Rostova N. B., Isupova A. D., Gerbergagen E. S. The orphan drugs: international approaches and national regulation. *Problems of social hygiene, health care and the history of medicine*. 2021;29(6):1490–1497. (In Russ.) DOI: 10.32687/0869-866X-2021-29-6-1490-1497.
4. Mishchenko M. A., Sybatova E. P., Mishchenko E. S. Current state and development prospects of the orphan drug market. *MODERN SCIENCE*. 2022;3–2:223–228. (In Russ.)
5. Nefidova O. G., Babaskin D. V., Sazonov A. D., Kamaletdinova A. A. Analysis of the Main Changes in Assessment and Approval of Medicines for Human Use in the Eurasian Economic Union. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(2):222–226. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-222-226.
6. Mitsumoto J., Dorsey E. R., Beck C. A., Kieburtz K., Griggs R. C. Pivotal studies of orphan drugs approved for neurological diseases. *Ann Neurology*. 2009;66(2):184–190. DOI: 10.1002/ana.21676.
7. De Vrueh R. L. A. Why R&D into Rare Diseases Matter. In: Bali R. K., Bos L., Gibbons M. C., Ibell S., editors. Rare Diseases in the Age of Health 2.0. London: Springer Nature; 2014. P. 3–20. DOI: 10.1007/978-3-642-38643-5_1.
8. Kugach A. A., Kugach V. V. Expertise and registration of orphan medicinal preparations. *Bulletin of Pharmacy*. 2021;1(91):20–35. (In Russ.) DOI: 10.52540/2074-9457.2021.1.20.
9. Brabers A. E. M., Moors E. H. M., van Weely S., de Vrueh R. L. A. Does market exclusivity hinder the development of Follow-on Orphan Medicinal Products in Europe? *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6(1):59. DOI: 10.1186/1750-1172-6-59.
10. Tambuyzer E. Rare diseases, orphan drugs and their regulation: questions and misconceptions. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(12):921–929. DOI: 10.1038/nrd3275.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-206-210
УДК 001.891.32

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Молекулярный докинг: методологические подходы к оценке рисков

А. Х. Тальдаев[1, 2]✉, И. Д. Никитин[2], Р. П. Терехов[2], И. А. Селиванова[2]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» (ИБМХ), 119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8
[2] Институт фармации им. А. П. Нелюбина. ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Тальдаев Амир Халилевич. **E-mail:** t-amir@bk.ru

ORCID: А. Х. Тальдаев – https://orcid.org/0000-0003-2593-1963; И. Д. Никитин – https://orcid.org/0000-0001-8044-0548;
Р. П. Терехов – https://orcid.org/0000-0001-9206-8632; И. А. Селиванова – https://orcid.org/0000-0002-2244-445X.

Статья поступила: 09.01.2023 **Статья принята в печать:** 02.05.2023 **Статья опубликована:** 25.05.2023

Резюме

Введение. В практику разработки лекарственных препаратов все полнее внедряются методы компьютерной химии, в частности нековалентный молекулярный докинг. Ранее для данного сравнительно молодого инструмента научных исследований не применяли подход управления рисками потенциальных ошибок.

Цель. Создание системы оценки риска ошибки для нековалентного молекулярного докинга.

Материалы и методы. Разработка системы по оценке риска ошибки базировалась на ведущих мировых практиках по нековалентному молекулярному докингу.

Результаты и обсуждения. В результате дедуктивного анализа процесса молекулярного докинга установили области возникновения ошибок и предложили риск-ориентированный алгоритм, который апробировали на выборке статей, полученной в ходе систематического обзора. Выявлена тенденция к частому ограниченному предоставлению информации по методологии расчетного эксперимента, а также по применению практик доказанно ведущих к нерелевантным результатам молекулярного докинга.

Заключение. Полученные данные нельзя экстраполировать на все исследования, ссылающиеся на результаты молекулярного моделирования, однако посредством предложенного риск-ориентированного алгоритма внимание исследователей фокусируется на оценке качества подобных публикаций. Авторы надеются, что разработанный инструмент по оценке риска ошибки в нековалентном молекулярном докинге будет доработан и в итоге внедрен в практику, благодаря чему удастся снизить долю некачественных работ в области разработки лекарственных препаратов на самых ранних этапах.

Ключевые слова: молекулярный докинг, разработка лекарственных средств, молекулярное моделирование, виртуальный скрининг, управление рисками

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

Вклад авторов. Р. П. Терехов и И. А. Селиванова придумали и разработали эксперимент. А. Х. Тальдаев и И. Д. Никитин провели анализ литературных данных. А. Х. Тальдаев, И. Д. Никитин и Р. П. Терехов участвовали в обработке данных. А. Х. Тальдаев, Р. П. Терехов и И. А. Селиванова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-305).

Для цитирования: Тальдаев А. Х., Никитин И. Д., Терехов Р. П., Селиванова И. А. Молекулярный докинг: методологические подходы к оценке рисков. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):206–210. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-206-210

Molecular Docking: Methodological Approaches of Risk Assessment

Amir Kh. Taldaev[1, 2]✉, Ilya D. Nikitin[2], Roman P. Terekhov[2], Irina A. Selivanova[2]

[1] Institute of Biomedical Chemistry named after V. N. Orekhovich, 10/8, Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russia
[2] A. P. Nelyubin Institute of Pharmacy. 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:** Amir Kh. Taldaev. **E-mail:** t-amir@bk.ru

ORCID: Amir Kh. Taldaev – https://orcid.org/0000-0003-2593-1963; Ilya D. Nikitin – https://orcid.org/0000-0001-8044-0548;
Roman P. Terekhov – https://orcid.org/0000-0001-9206-8632; Irina A. Selivanova – https://orcid.org/0000-0002-2244-445X.

Received: 09.01.2023 **Revised:** 02.05.2023 **Published:** 25.05.2023

Abstract

Introduction. Computational chemistry methods and, particularly, the noncovalent molecular docking are increasingly implemented into the practice of drug development. Previously, a risk management of potential biases did not applied for this relatively young research instrument.

Aim. The study objective was to design the risk assessment system for noncovalent molecular docking.

Materials and methods. The development of bias risk assessment system was based on the world's leading practices in noncovalent molecular docking.

© Тальдаев А. Х., Никитин И. Д., Терехов Р. П., Селиванова И. А., 2023
© Taldaev A. Kh., Nikitin I. D., Terekhov R. P., Selivanova I. A., 2023

Results and discussions. As a result of the deductive analysis of the molecular docking process, bias domains were identified and a risk-based algorithm was proposed, which was tested on a sample of articles obtained during a systematic review. A tendency to frequent limited provision of information on the methodology of the computational experiment, as well as on the application of practices proven to lead to irrelevant results of molecular docking, has been revealed.
Conclusion. The data obtained cannot be extrapolated to all studies that refer to the results of molecular modeling. However, through the proposed risk-based algorithm, the attention of researchers is focused on assessing the quality of such publications. We hope that the developed tool for bias risk assessment in noncovalent molecular docking will be finalized and eventually put into practice. It will possibly reduce the share of low-quality work in the field of drug development at the earliest stages.

Keywords: molecular docking, drug development, molecular modeling, virtual screening, risk assessment

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

Contribution of the authors. Roman P. Terekhov and Irina A. Selivanova invented and designed the experiment. Amir Kh. Taldaev and Ilya D. Nikitin analyzed the literature data. Amir Kh. Taldaev, Ilya D. Nikitin and Roman P. Terekhov participated in data processing. Amir Kh. Taldaev, Roman P. Terekhov and Irina A. Selivanova participated in writing the text of the article. All the authors participated in the discussion of the results.

Funding. This 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 World-Class Research Centers "Digital Biodesign and Personalized Healthcare" (No 075-15-2022-305).

For citation: Taldaev A. Kh., Nikitin I. D., Terekhov R. P., Selivanova I. A. Molecular docking: methodological approaches of risk assessment. *Drug development & registration*. 2023;12(2):206–210. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-206-210

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время при разработке лекарственных средств исследователи все чаще прибегают к использованию методов компьютерной химии, в частности докинга. Так, например, число статей по молекулярному докингу флавоноидов с 2016 по 2020 годы увеличилось в 2,4 раза. Это, очевидно, связано с распространением интеллектуальных технологий и повышением цифровой грамотности ученых. Для молекулярного моделирования, как «молодого» инструмента научных исследований, до сих пор не разработаны общепризнанные принципы, вписывающиеся в концепцию доказательной медицины.

Цель данной работы заключается в разработке методологического подхода к оценке риска ошибки в исследованиях методом нековалентного молекулярного докинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рекомендации формировали в ходе дедуктивного анализа процесса нековалентного молекулярного докинга с последующим поиском лучших научных практик, применяемых в вариативных случаях дизайна вычислительного эксперимента.

Разработанные рекомендации апробировали в ходе контент-анализа статей, вошедших в итоговую выборку систематического обзора, который был опубликован в 2021 году [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для систематизации областей возникновения ошибок, способных оказать влияние на результаты молекулярного докинга, была предложена следующая классификация в соответствии с этапами осуществления расчетного эксперимента:

- отбор лигандов;
- оптимизация структуры лигандов;
- выбор белковой мишени;
- подготовка белковой мишени;
- докинг;
- оценка результатов.

На первом этапе при работе со структурами молекул потенциальных кандидатов в лекарственные препараты следует заранее исключить из выборки соединения, характеризующиеся большим размером, низким профилем безопасности и ограниченной биологической доступностью, – это позволит существенно оптимизировать дальнейшие расчеты [2]. Ионизация является важным параметром для структуры лиганда, поэтому ее следует контролировать, принимая в расчет константу кислотности (pK_a) низкомолекулярного соединения и pH среды, в которой локализована белковая мишень [3]. В случае жесткого докинга другим важным этапом минимизации является генерация всех возможных конформеров, обладающих оптимальными длинами связей и углами между атомами для локализации молекулярной сис-

темы в области минимумов потенциальной энергии. Данный этап особенно важен при подготовке лигандов, поскольку энергия связывания конформеров с биологической мишенью может существенно различаться, что в итоге приведет к ошибке при интерпретации результатов расчетного эксперимента [4].

При выборе модели белковой молекулы наиболее объективным параметром является ее разрешение. Если данное значение превышает 2,5 Å, то положение в пространстве атомов мишени нельзя однозначно определить, что повышает риск ошибки в ходе молекулярного докинга [5]. Кроме того, следует уделять большое внимание методу для установления структуры белка. Только в ходе спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) можно выявить пространственное строение макромолекулы в условиях, близких к физиологическим [6]. Вместе с тем обнаружено, что протонирование аминокислотных остатков пептида в совокупности с добавлением утерянных мономеров и боковых цепей позволяет нивелировать риск ошибки при работе со структурами, полученными в ходе рентгеноструктурного анализа (РСА) и криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) [7]. Также для белковых макромолекул следует добавлять необходимые ионы металлов, молекулы воды, аминокислоты или их боковые радикалы, утерянные в ходе вычислительного эксперимента. Важно контролировать ионизацию остатков аминокислот, содержащих основные центры в боковых радикалах, таких как аргинин, лизин, гистидин, аспарагин и глутамин. Эти процедуры сделают модель более корректной с биохимической точки зрения [8–9].

Критически важным этапом молекулярного докинга является выбор программного обеспечения. Инструменты, представленные в данной области, различаются по алгоритмам, лежащим в основе осуществляемых расчетов, и по способу количественной оценки результатов вычислительного эксперимента. Алгоритм Монте-Карло и эмпирические методы оценки зарекомендовали себя как надежные подходы в компьютерной химии, что подтверждается данными *in vitro* [5].

Наконец, необходимо убедиться, что метод молекулярного моделирования работает корректно для выбранной системы, поэтому целесообразно проведение ре-докинга с референсным лигандом, положение которого в активном центре биологической мишени было установлено ранее [10]. Другим важным элементом контроля эксперимента *in silico* является проведение визуального осмотра его результатов с целью выявления структурных артефактов, сформировавшихся в ходе компьютерных расчетов [11]. Тем не менее однозначно подтвердить результаты молекулярного докинга могут лишь количественные данные по константам связывания, полученные *in vitro* [12].

Представленные рекомендации с учетом управления рисками были систематизированы и положены в основу алгоритма для проведения вычислительного эксперимента по молекулярному докингу (рисунок 1).

Для апробации разработанного инструмента использовали выборку статей из систематического обзора по молекулярному докингу флавоноидов, по которой проводили мета-анализ значений скоринг-функций [1]. В результате было сформировано резюме по оценке риска ошибки (рисунок 2).

Выбранные источники характеризуются ограниченной информацией по процедурам, проводимым исследователями при подготовке белковой мишени и оценке результатов молекулярного докинга. Причина этого, возможно, в недостаточно скрупулезном описании раздела «Материалы и методы». Более того, в некоторых публикациях приведены методики, которые напрямую ассоциированы с оценкой риска ошибки в результатах компьютерного моделирования, что может быть связано с отсутствием подходящих белковых мишеней в базах данных и наличием свободного программного обеспечения. Исходя из данных контент-анализа, можно предположить, что в анализируемой выборке статей присутствует ряд ограничений, снижающих уровень их доказательности.

Разумеется, полученные данные нельзя экстраполировать на все исследования, ссылающиеся на результаты нековалентного молекулярного докинга. Тем не менее следует уделять больше внимания качеству подобных публикаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдается рост числа статей, посвященных разработке лекарственных препаратов, в которых применяются инструменты компьютерного моделирования. Подобная тенденция повышает риски недобросовестного использования методов нековалентного молекулярного докинга и спекуляций, не соответствующих принципам доказательной медицины.

Предложенный алгоритм можно использовать в качестве образца при оценке уровня доказательности публикаций. Также он призван упростить процесс планирования эксперимента по нековалентному молекулярному докингу. Согласно нашим данным, это начальные попытки систематизации оценки риска ошибки в исследованиях *in silico*, поэтому их верификация остается дискуссионной и требует дальнейшего обсуждения в профессиональном сообществе. Авторы надеются, что в перспективе разработанный инструмент будет модифицирован и внедрен в практику, благодаря чему удастся снизить долю некачественных работ в области разработки лекарственных препаратов на самых ранних этапах.

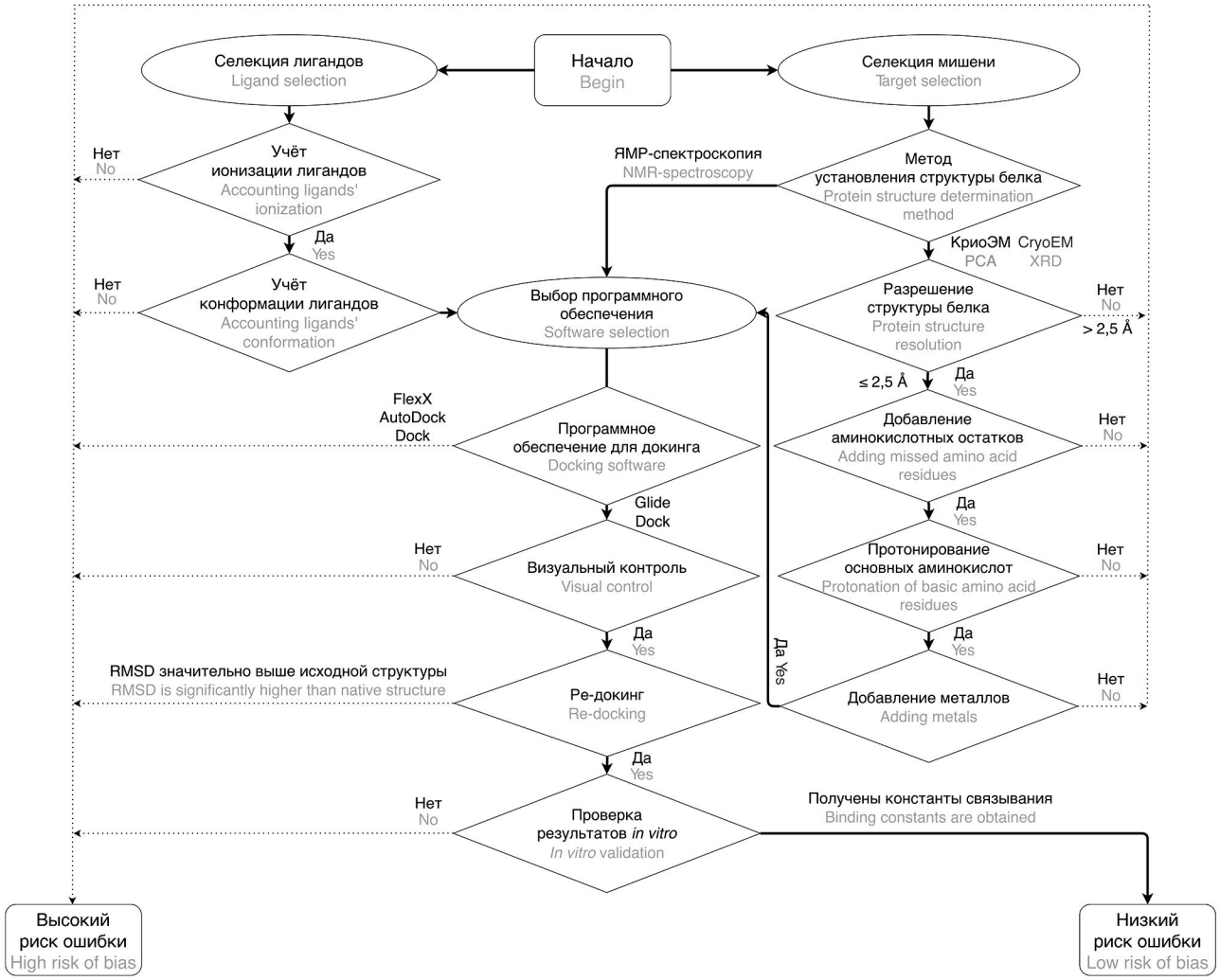


Рисунок 1. Блок-схема риск-ориентированного алгоритма для проведения нековалентного молекулярного докинга

Figure 1. The flowchart of a risk-oriented algorithm for noncovalent molecular docking

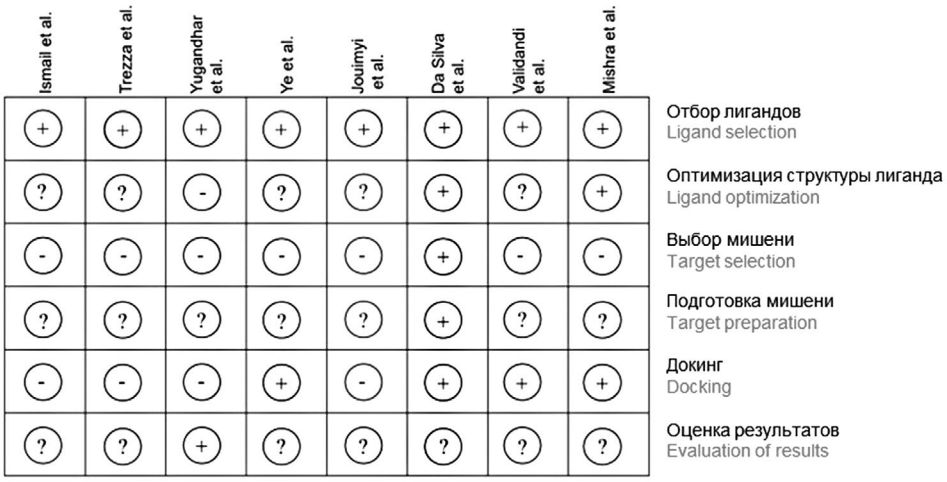


Рисунок 2. Резюме по оценке риска ошибки в мета-анализе, представленном в систематическом обзоре [1]:
«+» – низкая оценка риска ошибки; «–» – высокая оценка риска ошибки; «?» – недостаток данных для оценки риска ошибки

Figure 2. Summary of the bias risks in the systematic review [1]:
"+" is a low risk of bias; "–" is a high risk of bias; "?" is unclear risk of bias

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Terekhov R. P., Nikitin I. D., Taldaev A. Kh., Selivanova I. A. Computer modeling of the interaction between flavonoids and biological targets. *Pharmaceutical Business and Drug Technology*. 2021;2:24–36. (In Russ.) DOI: 10.33920/med-13-2102-01.
2. Kumar A., Zhang K. Y. J. Hierarchical virtual screening approaches in small molecule drug discovery. *Methods*. 2015;71(1):26–37. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.07.007.
3. Onufriev A. V., Alexov E. Protonation and pK changes in protein–ligand binding. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2013;46(2):181–209. DOI: 10.1017/S0033583513000024.
4. Vieth M., Hirst J. D., Brooks C. L. Do active site conformations of small ligands correspond to low free-energy solution structures? *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 1998;12:563–572. DOI: 10.1023/A:1008055202136.
5. Höltje H.-D., Sippl W., Rognan D., Folkers G. Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. 3rd Edition. New Jersey: Wiley-VCH; 2008. 320 p.
6. Billeter M. Comparison of protein structures determined by NMR in solution and by X-ray diffraction in single crystals. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1992;25(3):325–377. DOI: 10.1017/S0033583500004261.
7. Lohning A. E., Levonis S. M., Williams-Noonan B., Schweiker S. S. A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017;17(18):2023–2040. DOI: 10.2174/1568026617666170130110827.
8. Riccardi L., Genna V., de Vivo M. Metal–ligand interactions in drug design. *Nature Reviews Chemistry*. 2018;2:100-112. DOI: 10.1038/s41570-018-0018-6.
9. Kim M. O., Nichols S. E., Wang Y., McCammon J. A. Effects of histidine protonation and rotameric states on virtual screening of M. tuberculosis RmlC. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2013;27(3):235–246. DOI: 10.1007/s10822-013-9643-9.
10. Chen Y.-C. Beware of docking! *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015; 36(2):78–95. DOI: 10.1016/j.tips.2014.12.001.
11. Bender B. J., Gahbauer S., Luttens A., Lyu J., Webb C. M., Stein R. M., Fink E. A., Balius E. A., Balius T. E., Carlsson J., Irwin J. J., Shoichet B. K. A practical guide to large-scale docking. *Nature Protocols*. 2021;16:4799–4832. DOI: 10.1038/s41596-021-00597-z.
12. Macip G., Garcia-Segura P., Mastres-Truyol J., Saldivar-Espinoza B., Ojeda-Montes M. J., Gimeno A., Cereto-Massagué A., Garcia-Vallvé S., Pujadas G. Haste makes waste: A critical review of docking-based virtual screening in drug repurposing for SARS-CoV-2 main protease (M-pro) inhibition. *Medicinal Research Reviews*. 2022;42(2):744–769. DOI: 10.1002/med.21862.

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+

Материалы конференций / Conference Proceedings

Фармакотерапия онкозаболеваний: поиск новых препаратов и подходов

✉ **Контактное лицо:** Белова Мария Владимировна. **E-mail:** maniabel@gmail.com

Резюме

Введение. Настоящая публикация представляет собой материалы традиционной научной конференции студентов старших курсов Института фармации Сеченовского университета и факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова под общим девизом «Drug. Лекарство или… сложности перевода», которая состоялась 27 мая 2022 года. Каждый год темой такой конференции становятся самые актуальные медико-социальные проблемы, связанные с эффективностью и безопасностью лекарств. Данная конференция была приурочена к проходившему в это время X Юбилейному международному междисциплинарному конгрессу по заболеваниям органов головы и шеи, и посвящена проблеме фармакотерапии онкологических заболеваний.

В России, как и в мире, онкологические заболевания широко распространены и занимают второе место среди причин смертности. Так, согласно статистическим данным, каждый 40-й человек в России имеет онкологическое заболевание.

Тысячи исследователей во всем мире стремятся понять этиологию рака, повысить эффективность диагностики и лечения заболевания, обеспечивая медленный, но неуклонный прогресс в решении этих проблем.

Ранняя диагностика и своевременное целенаправленное лечение являются залогом успешной терапии и благоприятного исхода.

В прозвучавших докладах были рассмотрены основные направления создания противоопухолевых лекарственных препаратов, обеспечивающих большую эффективность и безопасность лечения, современные подходы к ранней диагностике рака с помощью микроРНК как маркеров опухоли. Большой интерес вызвало сообщение о возможности предсказания токсичности препаратов еще до стадии химического синтеза на основании компьютерного драг-дизайна. Также было уделено внимание проблемам паллиативного лечения и реабилитации онкологических пациентов, психологическим, этическим и юридическим аспектам этого. Обсуждение и медицинская оценка этих вопросов безусловно вызовет интерес достаточно широкой аудитории. Далее приведены лишь три сообщения из прозвучавших, дающие представление о «классических» методах, новом направлении в лечении, и технологической реализации таргетной терапии опухоли.

Ключевые слова: онкология, фармакотерапия, таргетная терапия опухолей, диагностика, микроРНК, токсичность

Pharmacotherapy of Oncological Diseases: Search for New Drugs and Approaches

✉ **Corresponding author:** Maria V. Belova. **E-mail:** maniabel@gmail.com

Abstract

Introduction. This publication represents the materials of the traditional scientific conference of senior students of the Institute of Pharmacy of the Sechenov University and the Faculty of Fundamental Medicine of the Lomonosov Moscow State University under the general motto "Drug. Medicine or... Difficulties in translation", which took place on May 27, 2022. Every year the topic of such a conference is the most pressing medical and social problems related to the effectiveness and safety of medicines. This conference was timed to coincide with the 10th anniversary international congress on diseases of the head and neck organs, which was taking place at that time, and was devoted to the problem of pharmacotherapy of oncological diseases.

In Russia, as well as in the world, oncological diseases are widespread and occupy the second place among the causes of death. So, according to statistics, every 40th person in Russia has an oncological disease.

Thousands of researchers around the world are striving to understand the etiology of cancer, improve the efficiency of diagnosis and treatment of the disease, ensuring slow but steady progress in solving these problems.

Early diagnosis and timely targeted treatment are the key to successful therapy and a favorable outcome.

The presentations discussed the main directions in the development of anticancer drugs that provide greater efficacy and safety of treatment, modern approaches to early cancer diagnosis using microRNA as tumor markers. Of great interest was the report on the possibility of predicting the toxicity of drugs even before the stage of chemical synthesis on the basis of computer-aided drug design. Also, attention was paid to the problems of palliative care and rehabilitation of cancer patients, psychological, ethical and legal aspects of this. Discussion and medical assessment of these issues will certainly arouse the interest of a fairly wide audience. The following are only three reports from those that have sounded, giving an idea of the "classical" methods, a new direction in treatment, and the technological implementation of targeted tumor therapy.

Keywords: oncology, pharmacotherapy, targeted tumor therapy, diagnostics, miRNA, toxicity

ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ – КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ КЛАССОВ

К. А. Балацкая, В. А. Затулина, М. В. Белова

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

CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS – A BRIEF DESCRIPTION OF THE MAIN CLASSES

Xenia A. Balatskaya, Vera A. Zatulina, Maria V. Belova

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

Противоопухолевая химиотерапия – метод лечения больных со злокачественными новообразованиями с использованием препаратов, которые способны тормозить пролиферацию опухолевых клеток (цитостатическое действие) или приводить к их полной гибели и апоптозу (цитотоксическое действие).

При помощи химиотерапии можно уменьшить размер опухоли перед операцией, уничтожить раковые клетки, которые могли остаться после хирургического вмешательства, свести к минимуму развитие метастазов, а также улучшить результаты других видов лечения.

К принципам химиотерапии относят выбор активных при данной опухоли препаратов, назначение адекватных доз, их коррекция и соблюдение режимов введения с учетом индивидуальной клинической ситуации. Терапия обычно проводится циклами или курсами длительностью от 3 до 6 месяцев в зависимости от стадии опухолевого процесса.

Классификация противоопухолевых веществ основана на принципах действия и химическом строении. Выделяют:

- Алкилирующие агенты.
- Антиметаболиты.
- Противоопухолевые антибиотики.
- Препараты растительного и животного происхождения.

Алкилирующие агенты довольно разнородны по химическому строению, но все обладают высокой общей токсичностью. Механизм их действия основан на алкилировании гуаниновых оснований (за счет образования ковалентных связей) обеих цепочек двуспиральной молекулы ДНК, что приводит к изменению пространственного строения молекулы и блокировке процессов транскрипции и репликации. В результате злокачественные клетки разрушаются и их воспроизведение прекращается. Наиболее известными препаратами этой группы являются хлорэтиламины (хлорметин, «Мелфалан» и т. д.); производные нитрозомочевины («Кармустин», «Ломустин» и т. д.); этиленимины (тиофосфамид, гексафосфамид, бензотэф); эфиры дисульфоновых кислот (бусульфан, треосульфан); комплексные соединения платины («Цисплатин», «Карбоплатин»); триазины (дакарбазин, прокарбазин). Большинство этих препаратов сильно угнетают ростки кроветворения в костном мозге, а также подавляют клеточный и гуморальный иммунитет. Разрушение быстро делящихся клеток приводит к нарушению целостности слизистых: кишечника, ЖКТ, ротовой полости [1, 2].

Антиметаболиты – аналоги веществ, обеспечивающих нормальные биохимические процессы в клетке. По химическому строению подобны витаминам, пуриновым и пиримидиновым основаниям. Механизм их действия обусловлен вступлением в конкурентные отношения с нормальными метаболитами и блокированием обменных процессов в клетках, что приводит к нарушению передачи генетической информации и пролиферации клеток [2, 3]. К препаратам этой группы относятся антифолаты – «Метотрексат» (наиболее часто используют при опухолях шеи и головы, также при хорионэпителиоме и раке молочной железы); ингибиторы тимидилат-синтетазы – «Ралтитрексид»; фторпиримидины – 5-фторурацил, тегафур, фторфуран (применяются при неоперабельных формах рака желудка и кишечника); антагонисты пуринов – «Меркаптопурин»; ингибиторы рибонуклеозиддифосфатредуктазы – гидроксикарбамид. Препараты рассматриваемой группы лишь отчасти избирательны в отношении опухолевых клеток, так как поражают еще и быстро пролиферирующие нормальные клетки, в результате чего происходит угнетение кроветворения, повреждение слизистых оболочек ЖКТ. Обладают нейро-, нефро- и гепатотоксичностью, вызывают алопецию [1].

Противоопухолевые антибиотики оказывают комбинированное иммунодепрессивное и антибактериальное действие, но не применяются в качестве антимикробных средств [1]. Механизм их действия заключается в ингибировании синтеза нуклеиновых кислот путем нарушения вторичной спирализации ДНК и в связывании с липидами клеточных мембран, изменяя транспорт ионов [3]. К противоопухолевым антибиотикам относятся антрациклины («Рубомицин», карминомицин, доксимицин, идарубицин, валрубицин, даунорубицин), которые наиболее эффективны; флеомицины (блеомицин, блеомицитин, пепломицин); прозводные ауреловой кислоты («Оливомицин», пликамицин); прочие антибиотики (брунеомицин, митомицин), действующие аналогично алкилирующим агентам; актиномицины (дактиномицин). Противоопухолевым антибиотикам свойственны высокая антимитотическая активность и низкая избирательность действия, в результате чего все подобные препараты обладают потенциально необратимой куму-

лятивной дозозависимой кардиотоксичностью[1] [2 3]. Для уменьшения дозы и снижения частоты и выраженности токсических эффектов их применяют в комбинации с другими противоопухолевыми средствами.

Противоопухолевый эффект препаратов растительного происхождения основан на способности алкалоидов растений блокировать митоз клеток в стадии метафазы, оказывая, таким образом, антимитотическое действие [3]. Препараты данной группы делят на:

1. Микротрубочковые ингибиторы, такие как винкаалкалоиды, содержащиеся в растении барвинок розовый (винбластин, винкристин, эрибулин); таксаны, синтезируемые из европейского тисса (паклитаксен, иксабепилон). Механизм их действия заключается в денатурации белка тубулина с последующей его деполяризацией, приводящей к распаду митотического веретена, отсутствию анафазы и гибели клеток. А механизм таксанов – это стимуляция полимеризации клеточного тубулина и сдвиг равновесия в сторону образования дефектных трубочек [2].
2. Ингибиторы топоизомераз ДНК I, II. К первой группе относят топотекан и иринотекан, а ко второй – этопозид и тенипозид. Они препятствуют респирализации и репликации ДНК, тормозят вступление клеток в митоз, в результате чего происходит их гибель [3].

Антимитотическое действие средств растительного происхождения делает их крайне токсичными для всех видов клеток организма. Особенно ярко выражен нейротоксический эффект: наблюдаются нарушения нервно-мышечной передачи, неврологические осложнения, в том числе парестезия, двигательные расстройства, выпадение сухожильных рефлексов и др. [1].

Говоря о препаратах растительного происхождения, стоит также обратить внимание на препараты конопли. Синтез аналогов классических каннабиноидов начался в 60-е годы XX века, впервые они были воссозданы американской компанией Pfizer. Каннабиноиды, выделяемые из растения *Cannabis sativa*, могут являться потенциальными противоопухолевыми препаратами. В ряде исследований было выявлено, что данные вещества обладают антипролиферативным и проапоптотическим эффектами, известно, что они препятствуют неоваскуляризации опухоли, миграции раковых клеток, адгезии, инвазии и метастазированию [4]. Однако клиническое использование Δ9-тетрагидроканнабинола и подобных ему веществ ограничено ввиду их воздействия на психику человека. Психоактивные эффекты опосредованы непосредственной стимуляцией CB_1-рецепторов, находящихся в ЦНС. Избежав влияния на рецепторы, находящихся в головном мозге, можно добиться эффектов, описанных ранее. Поэтому в последнее время возрастает интерес к веществам сходных с каннабидиолом, который влияет преимущественно на CB_2-рецепторы, расположенные в селезенке, поджелудочной железе и иммунокомпетентных клетках.

Все эффекты каннабиноидов опосредованы через эндоканнабиноидную систему – универсальную сигнальную систему, выполняющую в организме важные функции: от регуляции баланса энергии, метаболизма углеводов и липидов до участия в реализации иммунного ответа. При стимуляции CB-рецепторов происходит активация связанных с ними G-белков, в результате чего происходят изменения в клеточных функциях.

Дронабинол» и «Набилон» (аналоги Δ9-тетрагидроканнабинола) на сегодняшний день применяются как противорвотные для купирования отрицательных проявлений химиотерапии, помогая повысить качество жизни онкобольных [4]. Наиболее перспективным считается разработка препаратов, влияющих на CB_2-рецепторы, ведь в большей степени при борьбе с онкозаболеваниями важно воздействие на иммунную систему человека.

Несмотря на достаточно высокую эффективность, препараты, используемые в химиотерапии, чрезвычайно токсичны для здоровых клеток организма ввиду неизбирательности их действия. Именно поэтому необходимо создавать препараты таргетной терапии, которые, в отличие от химиотерапевтических лекарственных средств, действуют непосредственно на клетки опухоли, не вызывая общей интоксикации организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аляутдина Р. Н., ред. Фармакология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2022. 352 с.
2. Романов Б. К., Дмитриева Н. Б., Зацепилова Т. А. Противоопухолевые препараты. *Российский медицинский журнал*. 2018;24(3):146–150. DOI: 10.1882/0869-2106-2018-24-3-146-150.
3. Сергеева П. В., Шимановского Н. Л., ред. Биологическая фармакология. М.: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2010. 624 с.
4. Bajtel Á., Kiss T., Tóth B., Kiss S., Hegyi P., Vörhendi N., Csupor-Löffler B., Gede N., Hohmann J., Csupor D. The Safety of Dronabinol and Nabilone: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Pharmaceuticals* (Basel). 2022;15(1):100. DOI: 10.3390/ph15010100.

REFERENCES

1. Alyautdina R. N., editor. Pharmacology. Moscow: GEOTAR-Media; 2022. 352 p. (In Russ.)
2. Romanov B. K., Dmitrieva N. B., Zatsepilova T. A. Antitumor drugs. *Medical Journal of the Russuan Federation*. 2018;24(3):146–150. (In Russ.) DOI: 10.1882/0869-2106-2018-24-3-146-150.
3. Sergeeva P. V., Shimanovsky N. L., editors. Biological pharmacology. Moscow: LLC "Medical Information Agency"; 2010. 624 p. (In Russ.)
4. Bajtel Á., Kiss T., Tóth B., Kiss S., Hegyi P., Vörhendi N., Csupor-Löffler B., Gede N., Hohmann J., Csupor D. The Safety of Dronabinol and Nabilone: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Pharmaceuticals* (Basel). 2022;15(1):100. DOI: 10.3390/ph15010100.

[1] Основные аспекты фармакотерапии злокачественных новообразований. Доступно по: https://www.rlsnet.ru/library/articles/onkologiya/osnovnye-aspekty-farmakoterapii-zlokachestvennyx-novoobrazovanij-66. Ссылка активна на 31.03.2023.

ИММУННАЯ ТЕРАПИЯ – НОВОЕ В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Е. Г. Власова, В. В. Смирнов

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

IMMUNE THERAPY IS NEW DIRECTION IN THE TREATMENT OF CANCER

Eva G. Vlasova, Valery V. Smirnov

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

Иммунная терапия – подход к лечению онкологических заболеваний с точки зрения иммунных реакций организма на появление в организме опухолевых клеток [1].

Инициирующим шагом является «иммуногенная» (т. е. не вследствие апоптоза) смерть опухолевых клеток, приводящая к повышению экспрессии и появлению на их поверхности таких маркеров, как кальретикулин, одновременно с выделением из гибнущих клеток АТФ и ядерного негистонового высокомобильного группового белка-1 (HMGB1). Выделение перечисленных иммуногенных факторов во время гибели опухолевых клеток приводит к развитию местной воспалительной реакции. После этого дендритные клетки мигрируют в дренирующий лимфатический узел, где происходит процессинг фагоцитированных опухолевых антигенов и их презентация дозревшими дендритными клетками для наивных Т-лимфоцитов [2]. За счет одновременного взаимодействия главного комплекса гистосовместимости (MHC) в комплексе с презентируемым антигеном и Т-клеточного рецептора (TCR) (сигнал 1), а также ко-стимуляции CD28-рецепторов на поверхности Т-клеток (сигнал 2) происходит активация Т-эффекторных клеток [3].

Следующим этапом должны произойти миграция и инфильтрация активированного эффекторного Т-лимфоцита в опухоль, где будет реализована киллерная функция опухоль-специфичной иммунокомпетентной клетки. Попавшие в опухолевое микроокружение активированные Т-эффекторные клетки способны к цитолизу злокачественных клеток, которые презентируют на своей поверхности антигены в комплексе с MHC I класса [1, 4].

Очевидно, что, как и любая сложная схема взаимодействий, противоопухолевый иммунный цикл регулируется практически на всех этапах по принципу динамического равновесия, чтобы избежать избыточной активации цикла и появления аутореактивных клонов Т-клеток. К сожалению, те же механизмы, которые используются для «сдерживания» этих процессов, могут быть использованы и опухолевыми клетками для избегания иммунного ответа, направленного на них. Целью же современной иммунотерапии является восстановление нормального функционирования противоопухолевого иммунного цикла. С этой целью разработано множество методов, воздействующих на те или иные его этапы. Мы рассмотрим только несколько: ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, моноклональные антитела к различным мишеням, адаптивная клеточная терапия.

Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа или просто чекпойнт-ингибиторы – одна из наиболее актуальных групп онко-иммунологических препаратов. В рамках иммунного ответа чекпойнты отвечают за уменьшение иммунного ответа и сокращение числа активированных Т-лимфоцитов и их киллерной способности, например для предотвращения избыточной стимуляции иммунитета и аутоиммунных реакций. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) уже зарегистрировано несколько препаратов из данной группы, относящихся к двум разным подгруппам с разными точками действия: цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4) и рецептор запрограммированной клеточной смерти 1 и его лиганд (PD-1 и PD-L1).

Антитела – антагонисты к CTLA-4. Ипилимумаб (Yervoy®, Bristol-Myers Squibb Company, США), зарегистрированный в 2011 г., стал первым одобренным к применению препаратом из этой группы. Являющийся моноклональным антителом, препарат связывается с CTLA-4 на поверхности незрелых Т-лимфоцитов. В норме CTLA-4 связывает комплексы B7-1 и B7-2 на поверхности дендритных клеток, не позволяя реализоваться «второму» активирующему сигналу от CD28 и подавляя каскад реакций от TCR при презентации антигена Т-лимфоциту. Кроме того, CTLA-4 экспрессируется и в Т-регуляторных клетках, которые с его помощью уменьшают способность дендритных клеток к эффективной презентации антигена. Таким образом, блокада активности CTLA-4 на клетках иммунной системы снижает влияние отрицательной регуляции и позволяет в большей степени реализоваться уже существующему иммунному ответу на опухоль.

Антитела – антагонисты к PD-1. Следующим этапом развития иммунотерапии рака стала регистрация в 2014 г. моноклональных антител, блокирующих PD-1, – ниволумаба (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb Company, США) и пембролизумаба (Keytruda®, ООО «МСД Фармасьютикалс», Россия); и в 2016–2017 гг. – блокирующих PD-L1 – атезолизумаба (Tecentriq®, F. Hoffmann-La Roche, Ltd, Швейцария), авелумаба (Bavencio®, ООО «Мерк», Россия), дурвалумаба (Imfinzi®, AstraZeneca AB, Швеция). PD-1 – рецептор, расположенный на поверхности активированных Т-лимфоцитов и предотвращающий активацию сигнального каскада PI3-киназы. В итоге это приводит к уменьшению пролиферации, цитотоксичности и высвобождения цитокнов из активированных Т-лимфоцитов.

Наряду с CTLA-4 и PD-1 многие из белков-регуляторов противоопухолевого иммунного цикла изучаются в качестве потенциальных точек воздействия при лечении онкологических заболеваний. Для части из них уже идут клинические исследования соответствующих препаратов.

Ген активации лимфоцитов 3 (LAG3) экспрессируется во многих иммунокомпетентных клетках, в том числе и в активированных Т-лимфоцитах и Т-регуляторных клетках. При взаимодействии TCR и комплекса «MHC II + антитело» антигенпрезентирующей клетки LAG3 блокирует взаимодействие CD4 с MHC класса II, что приводит к подавлению активирующего сигнала лимфоциту.

Логично предположить, что наряду с многочисленными ингибиторами противоопухолевого иммунного цикла существуют и его активаторы – агонисты.

Антитела – агонисты к 4-1BB. Одна из наиболее изученных молекул данного семейства – 4-1BB (CD137, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9), экспрессируемая на поверхности Т-лимфоцитов, NK-клеток и моноцитов. Стимуляция Т-клеток с помощью специфичного лиганда, 4-1BBL, синтезируемого антигенпрезентирующими клетками, через каскад реакций и регуляторов приводит к уменьшению частоты апоптоза лимфоцитов. Доклинические исследования показали противоопухолевый эффект антител – агонистов 4-1BB как в условиях монотерапии, так и в комбинации с различными видами иммунотерапии [5].

Адаптивная клеточная терапия построена на идее применения активированных различными способами иммунных клеток. Основные методики получения компетентных противоопухолевых клеток в настоящее время – это отбор и размножение *ex vivo* лимфоцитов, инфильтрировавших опухоль (TIL), и дополнительная модификация лимфоцитов с помощью генных технологий привнесения субъединиц TCR или химерного антигенного рецептора (CAR) в Т-клетки (CAR-T). Вероятно, самой перспективной на данный момент является именно последняя методика. В июле 2017 г. FDA одобрило применение CAR-T терапии для лечения острого лимфобластного лейкоза у пациентов с 3 до 25 лет[1].

Иммунотерапия онкологических заболеваний за последнее десятилетие доказала свою эффективность во множестве клинических исследований. К сожалению, ни одно из этих лекарств, скорее всего, не станет «серебряной пулей» для всего спектра онкологических заболеваний. Для грамотного выбора тактики лечения, способного подарить пациенту дополнительные годы жизни и уберечь от ненужных трат времени и средств на заведомо неработающую терапию, требуются способы предсказания их эффективности, применяемые индивидуально для каждого пациента. Таким образом, ключевой парадигмой развития онкоиммунологии должна стать прецизионнная, предсказательная медицина, построенная на сочетании новейших методов молекулярно-генетической диагностики, биоинформатики и клинической медицины. По нашему мнению, только такая комбинация позволит подбирать оптимальное лечение для пациента на основе уникальных свойств его организма, злокачественной опухоли и ее микроокружения.

[1] Novartis CAR-T cell therapy CTL019 unanimously (10–0) recommended for approval by FDA advisory committee to treat pediatric, young adult r/r B-cell ALL. Available at: https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-car-t-cell-therapy-ctl019-unanimously-10–0-recommended-approval-fda. Accessed: 31.03.2023.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tsarev I. L., Melerzanov A. V. Review of approaches to immunotherapy in oncology. *Research and practice in medicine*. 2017;4(3):51–65. (In Russ.) DOI: 10.17709/2409-2231-2017-4-3-5.
2. Kakimi K., Karasaki T., Matsushita H., Sugie T. Advances in personalized cancer immunotherapy. *Breast Cancer*. 2017;24(1):16–24. DOI: 10.1007/s12282–016–0688–1.
3. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:51–72. DOI: 10.1146/annurev-immunol032712–100008.
4. Cerundolo V., Hermans I. F., Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol*. 2004;5(1):7–10. DOI: 10.1038/ni0104–7.
5. Curran M. A., Kim M., Montalvo W., Al-Shamkhani A., Allison J. P. Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. *PLoS One*. 2011;6(4):e19499. DOI: 10.1371/journal.pone.0019499.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ОРИГИНАЛЬНОГО ОТЕЧЕСТВЕННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ЦИФЕТРИЛИН

Е. А. Панкратова[1], Г. М. Родионова[1], З. С. Шпрах[2]

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

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL METHODS FOR THE LIPOSOMAL DOSAGE FORM OF THE ORIGINAL DOMESTIC DRUG CIFETRILIN

Elizaveta A Pankratova[1], Galina M. Rodionova[1], Zoya S. Shprakh[2]

[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] FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

Работа выполнена как дипломная на базе НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (НИИ ЭДиТО) «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

Нейроэндокринные опухоли – патология, характеризующаяся нарушениями работы гипофиза и желез внутренней секреции. Заболеваемость данной патологией неуклонно растет [1]. Прогноз выживаемости зависит от стадии заболевания, на которой был обнаружен злокачественный рост. Основу лекарственной терапии при нейроэндокринных опухолях составляют аналоги соматостатина.

В 2014 году в НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России была синтезирована субстанция оригинального лекарственного средства цифетрилин [2]. Аналог гипоталамического фактора соматостатина замедляет рост клеток опухолей за счет связывания с рецепторами соматостатина SSTRs 1–5. Препараты фармакологической группы аналогов соматостатина используются в терапии нейроэндокринных опухолей различной локализации, прежде всего, ЖКТ и бронхолегочной системы.

Цифетрилин представляет собой пентапептид, метиловый эфир Nα-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-Nα-карбобензокси-L-лизил-L-треонина (рисунок 1). Карбоксильные функциональные группы молекулы защищены переведением в метиловый эфир по реакции этерификации [2], обеспечивая бóльшую стабильность соединения.

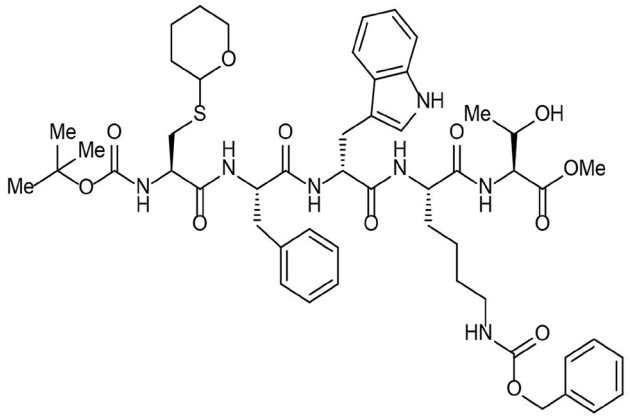


Рисунок 1. Цифетрилин

Figure 1. Cyfetriline

В связи с тем, что молекула цифетрилина гидрофобна, на основе синтезированной субстанции в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО была создана пероральная лекарственная форма «Цифетрилин таблетки 6 мг», которая в настоящее время уже прошла 1 фазу клинических исследований у пациентов с нейроэндокринными опухолями [3–5].

С целью повышения биодоступности цифетрилина, возможности его парентерального введения, что приведет к повышению эффективности и снижению побочных эффектов терапии, в НИИ ЭДиТО разработана инъекционная липосомальная лекарственная форма цифетрилина [6, 7]. Кроме активного компонента, липосомы включают следующие вспомогательные вещества (ВВ): сахароза (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), соевый фосфатидилхолин (СФХ) S PC ≥ 98 % (Lipoid GmbH, Германия), холестерин ≥99 % (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-2000-ДСФЭ) 18:0/18:0 (Lipoid GmbH, Германия).

Цель исследования: разработка методики контроля качества липосомальной лекарственной формы оригинального аналога соматостатина цифетрилина и применение ее для оценки однородности дозирования, а также стабильности липосомальной лекарственной формы цифетрилина при хранении.

Материалы и методы

Разработку методики количественного определения цифетрилина в липосомальной форме осуществляли методом УФ-спектрофотометрии[1] на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., США). Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 10 (MS Excel, SPSS) (StatSoft Inc., США).

Разработка методики количественного определения цифетрилина в липосомальной форме

Дизайн разработки методики количественного определения активного ингредиента в лекарственной форме включал экспериментальное изучение спектров поглощения активного ингредиента и ВВ, выбор концентрации растворов и длины волны, при которой следует проводить измерение.

УФ-спектр раствора цифетрилина в 95%-м спирте имеет несколько максимумов поглощения. Наибольшее значение удельного показателя поглощения регистрируется при длине волны 282 ± 2 нм, то есть данный максимум имеет аналитическое значение. На рисунке 2 приведен спектр поглощения спиртового раствора цифетрилина.

Максимум поглощения в спектре раствора липосомальной лекарственной формы, не содержащей активного ингредиента (спектр раствора ненагруженных липосом), наблюдали при длине волны 283 нм (рисунок 3), что практически совпадает с максимумом цифетрилина. Следовательно, проводить измерение оптической плотности следует относительно раствора ненагруженных липосом, что делает методику специфичной в отношении цифетрилина.

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 31.03.2023.

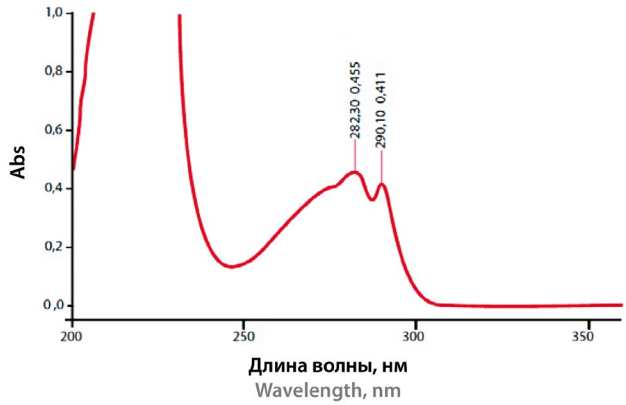


Рисунок 2. **Спектр поглощения цифетрилина**

Figure 2. **Absorption spectrum of cifetriline**

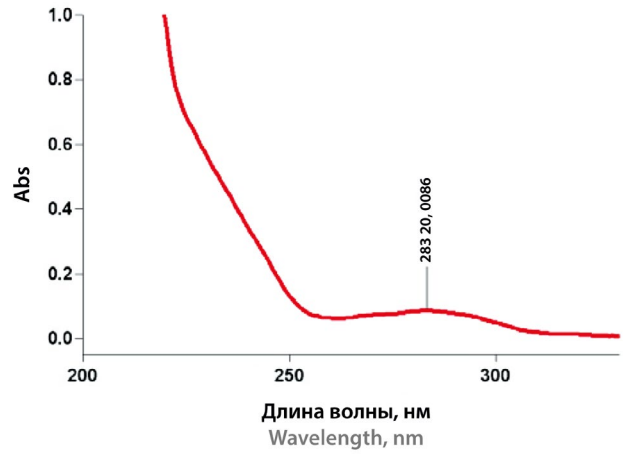


Рисунок 3. **Спектр поглощения липосомальной лекарственной формы без добавления активного ингредиента**

Figure 3. **Absorption spectrum of a liposomal dosage form without active ingredient addition**

Количественное определение цифетрилина в липосомальной лекарственной форме проводили методом спектрофотометрии[1]. Для снижения систематических и случайных ошибок в методику введен способ расчета по стандартному образцу (СО).

В качестве испытуемого раствора использовали спиртовой раствор липосомальной лекарственной формы цифетрилина, СО – субстанцию цифетрилина с установленным количественным содержанием действующего вещества, раствора сравнения – спиртовой раствор ненагруженных липосом.

Методика

Испытуемый раствор. Липосомальную дисперсию цифетрилина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 6 мл воды очищенной, встряхивают в течение 2 минут, прибавляют 50 мл спирта 95%-го, встряхивают до полного растворения. Доводят объем раствора до метки спиртом 95%-м и энергично встряхивают в течение 10 минут. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца. Около 6 мг (точная навеска) СО цифетрилина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл воды очищенной и 3 мл спирта 95%-го, взбалтывают в течение 30 мин или обрабатывают ультразвуком и доводят объем раствора спиртом 95%-м до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения. Дисперсию ненагруженных липосом помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 6 мл воды очищенной, встряхивают в течение 2 минут, прибавляют 50 мл спирта 95%-го, встряхивают до полного растворения. Доводят объем раствора до метки спиртом 95%-м и энергично встряхивают в течение 10 минут. Раствор используют свежеприготовленным.

Измеряли оптическую плотность испытуемого раствора и раствора СО цифетрилина на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны (282 ± 2) нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

На рисунке 4 приведен спектр поглощения раствора липосомальной лекарственной формы цифетрилина, полученный по данной методике.

Содержание цифетрилина (X, мг/мл) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(A - A_{ср.}) \cdot a_0 \cdot 100}{A_0 \cdot 50},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО цифетрилина; $A_{ср.}$ – оптическая плотность раствора ненагруженных липосом; a_0 – навеска СО цифетрилина, мг.

Результаты количественного определения цифетрилина в липосомальной лекарственной форме представлены в таблице 1.

Таблица 1. **Результаты количественного определения цифетрилина в липосомальной лекарственной форме**

Table 1. **The results of the quantitative determination of cifetriline in a liposomal dosage form**

№ образца лекарственной формы Dosage form sample number	**Оптическая плотность, А** Optical density, A	**Содержание цифетрилина, мг/мл** Content of cifetriline, mg/ml
1	0,544	6,33
2	0,545	6,34
3	0,547	6,38
4	0,542	6,29
5	0,545	6,34
6	0,549	6,41

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 31.03.2023.

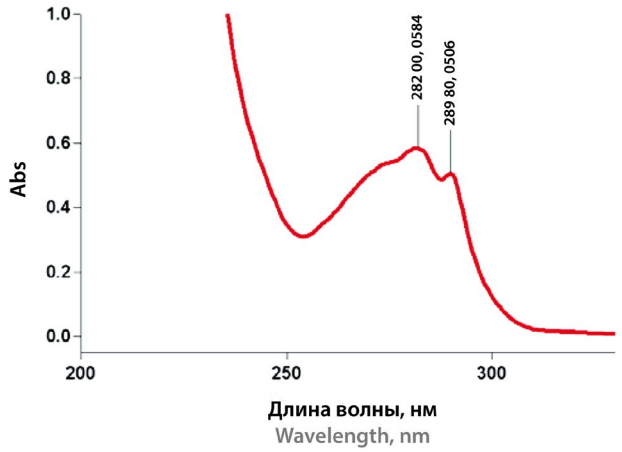


Рисунок 4. Спектр поглощения липосомальной лекарственной формы цифетрилина

Figure 4. Absorption spectrum of a liposomal dosage form of cifetriline

Определение однородности дозирования цифетрилина в липосомальной лекарственной форме методом спектрофотометрии

Для получения более стабильной в хранении ЛФ липосомальная дисперсия была лиофилизирована.

Для лиофилизированной липосомальной лекарственной формы цифетрилина проводили определение однородности дозирования в соответствии с ОФС.1.4.2.0008.15 «Однородность дозирования» методом спектрофотометрии, способ 1 в условиях испытания «Количественное определение»[1].

От испытуемой серии препарата отбирали случайным образом пробу в количестве 30 единиц, из них в произвольном порядке отбирали 10 единиц для проведения первого этапа испытания. Оставшиеся 20 единиц лекарственной формы сохраняли для проведения второго этапа испытания в случае несоответствия результатов требованиям показателей приемлемости.

Измеряли оптическую плотность 10 образцов порознь испытуемого раствора и раствора СО цифетрилина на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны (282 ± 2) нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм. Параллельно проводили определение раствора СО цифетрилина относительно раствора сравнения (в условиях испытания «Количественное определение»).

Содержание действующего вещества в каждой единице испытуемого препарата, выраженное в процентах от номинального значения, обозначали как величину А:

$$A = \frac{B}{L} \cdot 100,$$

где B – содержание цифетрилина в единице испытуемого препарата, полученное как указано в разделе «Количественное определение»; L – номинальное содержание цифетрилина в единице испытуемого препарата.

Для каждой из 10 отобранных единиц испытуемого препарата ($n = 10$) определяли массу по разности масс заполненной и полностью опорожненной упаковки с точностью взвешивания ±0,0002 г. С использованием полученных результатов в каждой из 10 единиц препарата вычисляют содержание действующего вещества в процентах (x_i) от номинального значения.

Вычисление показателей приемлемости проводили в соответствии с Государственной Фармакопеей Российской Федерации XIV издания[2]. Для полученной совокупности значений X_i рассчитали величины среднего арифметического ($X_{ср.}$) и стандартного отклонения (S). Соответственно, найденной величине $X_{ср.}$ выбрали эталонное значение дозы (M) и рассчитали значения первого (AV) и при необходимости второго ($|M - x_i|_{max}$) показателей приемлемости результатов испытания на «однородность дозирования». В таблице 2 приведены результаты исследования однородности дозирования и значения показателей приемлемости.

Результат испытания на однородность дозирования можно признать удовлетворительным, поскольку при $n = 10$ первый показатель приемлемости AV ≤ L1 и для величин X_i выполняется условие $|M - X_i| \le 0{,}01 \cdot L2 \cdot M$.

Изучение стабильности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы цифетрилина при хранении

Для изучения сохранности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы цифетрилина проводили ее исследования в процессе хранения в сухом, защищенном от света месте при температуре –18 °С. Испытание проводили на одной серии образцов в день производства серии через 6 и 12 месяцев хранения.

Содержание цифетрилина в лиофилизированной липосомальной лекарственной форме непосредственно после получения составило 6,18 мг во флаконе. Через 6 месяцев хранения показания не изменились. Через 12 месяцев хранения при количественном определении цифетрилина в единице лекарст-

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 31.03.2023.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 31.03.2023.

Таблица 2. **Результаты исследования однородности дозирования**

Table 2. **Results of Dosing Uniformity Study**

n	x_i, мг	w_i, мг	x_i, %	*S*	*A*	*k*	*X*, %	*M*	AV	L1
1	6,99	729,85	115,21	1,09	116,50	2,4	113,77	101,5	14,90	15
2	7,00	728,68	115,19		116,67					
3	6,70	746,80	112,99		111,67					
4	7,04	722,12	114,80		117,33					
5	6,39	779,88	112,54		106,50					
6	6,95	729,41	114,48		115,83					
7	6,98	716,23	112,89		116,33					
8	7,08	713,46	114,07		118,00					
9	6,61	754,87	112,68		110,17					
10	6,58	759,21	112,81		109,67					

венной формы отмечено существенное и достоверное возрастание оптической плотности испытуемого раствора в максимуме поглощения при аналитической длине волны (282 ± 2) нм. Одновременно наблюдали возрастание оптической плотности раствора ненагруженных липосом, которые хранились в таких же условиях (таблица 3).

Таблица 3. **Результаты анализа липосомальной лекарственной формы цифетрилина по показателю «Количественное определение при хранении»**

Table 3. **The results of the analysis of the liposomal dosage form of cifetriline in terms « Quantitative determination during storage»**

Серия Series	**Оптическая плотность испытуемого раствора, А** Optical density of the test solution, A		**Оптическая плотность раствора ненагруженных липосом, А** Optical density of the unloaded liposomes solution, A	
Срок хранения Shelf life	**0**	**12 месяцев** 12 months	**0**	**12 месяцев** 12 months
с.030321	0,457	0,596	0,085	0,170
с.050421	0,458	0,540		
с.060421	0,451	0,544		

Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе хранения в предложенных условиях происходят изменения физико-химических свойств лиофилизированной липосомальной лекарственной форме цифетрилина из-за деструкции ВВ, входящих в ее состав.

Следует отметить, что исследования фармацевтической субстанции показали, что цифетрилин при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С (холодильная камера), то есть при значительно более высокой температуре, выдерживает хранение практически без изменений в течение трех лет [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения цифетрилина в липосомальной лекарственной форме – спектрофотометрия в ультрафиолетовой области спектра.

Проведено исследование однородности дозирования цифетрилина в лабораторных образцах лиофилизированного лекарственного средства, получены результаты, удовлетворяющие требованиям Государственной фармакопеи и нормативной документации.

Проведенное исследование стабильности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы цифетрилина при хранении в течение 6 и 12 месяцев показало необходимость совершенствования состава вспомогательных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stueven A. K., Kayser A., Wetz C., Amthauer H., Wree A., Tacke F., Wiedenmann B., Roderburg C., Jann H. Somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumors: past, present and future. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):3049. DOI: 10.3390/ijms20123049.
2. Шпрах З. С., Ярцева И. В., Игнатьева Е. В., Смирнова А. П., Сушинина Л. П., Устинкина С. В., Смирнова Л. И., Будько А. П., Зимакова Н. И. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. *Химико-фармацевтический журнал.* 2014;48(3):19–22.
3. Коняева О. И., Кульбачевская Н. Ю., Ермакова Н. П., Чалей В. А., Меркулова И. Б., Абрамова Т. В., Бухман В. М., Шпрах З. С. Предклиническое токсикологическое изучение аналога гипоталамического гормона цифетрилина. *Российский биотерапевтический журнал.* 2018;17(2):63–70.

4. Шпрах З. С., Борисова Л. М., Киселева М. П., Смирнова З. С. Доклиническое изучение противоопухолевой активности Цифетрилина на экспериментальных опухолях животных. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019;82(8):27–31.
5. Шпрах З. С., Игнатьева Е. В., Ярцева И. В., Дмитричева Н. А., Смирнова Л. И. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрелина в таблетках. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(3):55–61.
6. Dmitrieva M., Shprakh Z., Orlova O., Ignatyeva E., Lantsova A., Nikolaeva L., Krasniuk I. Selection of the composition of a liposomal dosage form of a russian somatostatin analogue with antitumor activity. *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(6):65–68. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i6.39253.
7. Sanarova E., Lantsova A., Oborotova N., Polozkova A., Dmitrieva M., Orlova O., Nikolaeva L., Borisova L., Shprakh Z. Development of a liposomal dosage form for a new somatostatin analogue. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;81(1):146–149.

REFERENCES

1. Stueven A. K., Kayser A., Wetz C., Amthauer H., Wree A., Tacke F., Wiedenmann B., Roderburg C., Jann H. Somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumors: past, present and future. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):3049. DOI: 10.3390/ijms20123049.
2. Shprakh Z. S., Yartseva I. V., Ignatieva E. V., Smirnova A. P., Sushinina L. P., Ustinkina S. V., Smirnova L. I., Budko A. P., Zimakova N. I. Synthesis and chemical-pharmaceutical characteristics of somatostatin analog with antitumor activity. *Chemical-pharmaceutical journal*. 2014;48(3):19–22. (In Russ.)
3. Konyaeva O. I., Kulbachevskaya N. Yu., Ermakova N. P., Chaley V. A., Merkulova I. B., Abramova T. V., Bukhman V. M., Shprakh Z. S. Preclinical toxicological study of the analogue of the hypothalamic hormone cyfetriline. *Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):63–70. (In Russ.)
4. Shprakh Z. S., Borisova L. M., Kiseleva M. P., Smirnova Z. S. Preclinical study of the antitumor activity of Cifetriline on experimental animal tumors. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2019;82(8):27–31. (In Russ.)
5. Shprakh Z. S., Ignatieva E. V., Yartseva I. V., Dmitricheva N. A., Smirnova L. I. Development and validation of a method for the quantitative determination of cyfetrelin in tablets. *Russian Journal of Biotherapy*. 2016:15(3):55–61. (In Russ.)
6. Dmitrieva M., Shprakh Z., Orlova O., Ignatyeva E., Lantsova A., Nikolaeva L., Krasniuk I. Selection of the composition of a liposomal dosage form of a russian somatostatin analogue with antitumor activity. *Inter J Appl Pharm*. 2020;12(6):65–68. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i6.39253.
7. Sanarova E., Lantsova A., Oborotova N., Polozkova A., Dmitrieva M., Orlova O., Nikolaeva L., Borisova L., Shprakh Z. Development of a liposomal dosage form for a new somatostatin analogue. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;81(1):146–149.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-222-223

Check for updates

CC BY 4.0

Исправление к статье: «Иммунотропное влияние водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей»

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

Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(2):59–64. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64. Статья опубликована: 25.05.2022.

На странице 59 в исходную версию статьи авторы исправили заголовок статьи.
Вместо: Иммунотропное влияние водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей
Исправлено на: Влияние способа экстракции водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей

На странице 60 в раздел «Для цитирования» был исправлен заголовок статьи.
Вместо: Лигачёва А. А., Гулина Е. И., Шабанова Ю. В., Трофимова Е. С., Кривощеков С. В., Гуркин Н. В., Шурупова М. Н., Шерстобоев Е. Ю., Данилец М. Г., Белоусов М. В. Иммунотропное влияние водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):59–64. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64
Исправлено на: Лигачёва А. А., Гулина Е. И., Шабанова Ю. В., Трофимова Е. С., Кривощеков С. В., Гуркин Н. В., Шурупова М. Н.,Шерстобоев Е. Ю., Данилец М. Г., Белоусов М. В. Влияние способа экстракции водорастворимых полисахаридов растений рода *Saussurea* на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):59–64. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64

Внесение исправление не повлияло на содержание статьи.

Обновлена онлайн-версия статьи на сайте журнала.

Erratum: "Immunomodulatory Effects of Water-soluble Polysaccharides from Plants of the *Saussurea* DC Genus on Murine Peritoneal Macrophages"

Anastasia A. Ligacheva, Ekaterina I. Gulina, Iuliia V. Shabanova, Evgenia S. Trofimova, Sergey. V. Krivoshchekov, Nikita. V. Gurkin, Margarita N. Shurupova, Evgenii Yu. Sherstoboev, Marina G. Danilets, Mikhail V. Belousov

Drug development & registration. 2022;11(2):59–64. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64. Published: 25.05.2022.

On page 60 of the original version of the article, the authors corrected the title of the article.
Instead: Immunomodulatory Effects of Water-soluble Polysaccharides from Plants of the *Saussurea* DC Genus on Murine Peritoneal Macrophages
Corrected to: Effect of Water-soluble Polysaccharides Plant Extraction of the *Saussurea* Genus on the Activity of Mice Peritoneal Macrophage NO-synthase

On page 60, the heading of the article has been corrected in the "For citation" section.
Instead: Ligacheva A. A., Gulina E. I., Shabanova I. V., Trofimova E. S., Krivoshchekov S. V., Gurkin N. V., Shurupova M. N., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Belousov M. V. Immunomodulatory effects of water-soluble polysaccharides from plants of the Saussurea DC genus on murine peritoneal macrophages. *Drug development & registration*. 2022;11(2): 59–64. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64
Corrected to: Ligacheva A. A., Gulina E. I., Shabanova I. V., Trofimova E. S., Krivoshchekov S. V., Gurkin N. V., Shurupova M. N., Sherstoboev E. Yu., Danilets M. G., Belousov M. V. Effect of water-soluble polysaccharides plant extraction of the *Saussurea* genus on the activity of mice peritoneal macrophage NO-synthase. *Drug development & registration*. 2022;11(2): 59–64. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-59-64

The correction did not affect the content of the article.

The online version of the article on the journal's website has been updated.

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.

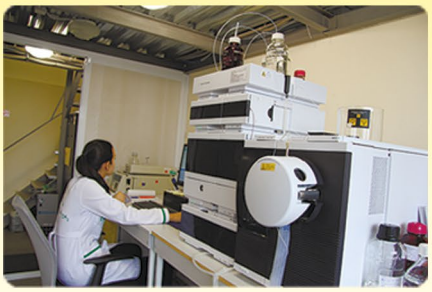
В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:

- *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