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

2023. Том 12, № 3 2023. Volume 12, No. 3

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»
117149, город Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

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, № 3

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2023. Volume 12, No. 3

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 27

Поиск и разработка новых лекарственных средств

Способ получения тимохинона из жирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.)
А. К. Уэйли, Е. В. Бурцева, Е. В. Кулдыркаева, А. С. Новосад, Н. Л. Бабак, Е. В. Жохова, А. О. Уэйли, М. Ю. Гончаров, И. И. Тернинко, Г. П. Яковлев 29

Фармацевтическая технология

Изучение биофармацевтических свойств новой мукоадгезивной лекарственной формы для терапии дегенеративных заболеваний глаз
М. Н. Анурова, Е. О. Бахрушина, И. В. Лапик, А. Р. Тураева, Н. Б. Демина, Б. Б. Сысуев, И. И. Краснюк 41

Разработка и изучение антибактериальных покрытий *in situ* для обработки имплантатов
Е. О. Бахрушина, А. А. Попова, М. В. Помыткина, М. Н. Анурова, Н. Б. Демина, И. И. Краснюк 49

Разработка инъекционной формы 4'-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида на основе человеческого сывороточного альбумина для химиотерапии рака молочной железы
Т. С. Ковшова, С. А. Бойко, М. А. Меркулова, Н. С. Осипова, Н. И. Моисеева, Ю. А. Малиновская, С. Н. Мантров, С. Э. Гельперина 58

Оценка рисков для качества геля с коллагеназой камчатского краба в процессе фармацевтической разработки
Ю. О. Иванкова, Б. Б. Сысуев, С. Б. Евсеева 66

Разработка состава и технологии таблеток на основе сухого экстракта астрагала перепончатого
М. В. Ароян, Д. Э. Лохматова, Д. Д. Ванторина, Е. К. Новикова, И. Е. Каухова, М. В. Нечаев 73

Методы анализа лекарственных средств

Анализ этанольных извлечений корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. методом ГХ/МС
А. М. Джумабаева, А. С. Кожамжарова, Л. Н. Ибрагимова, И. И. Тернинко, Е. С. Сурбеева, З. Б. Сакипова 80

Состав и содержание гидролизуемых таннинов в листьях фейхоа, *Acca sellowiana*
Т. А. Кроль, Д. Н. Балеев, В. И. Осипов 89

Горец щавелелистный (горец развесистый): идентификация, химический состав, фармакологическое действие, перспективы использования в медицинской практике (обзор)
А. А. Гудкова, А. С. Чистякова, А. А. Костылева, А. С. Болгов, А. И. Сливкин 96

Оценка подлинности клеточных линий с помощью RTCA-профилирования для экспертизы качества препаратов на основе жизнеспособных клеток человека
М. А. Водякова, О. А. Рачинская, Н. С. Покровский, И. С. Семенова, Е. В. Мельникова, В.А. Меркулов 104

Сравнительное изучение анатомо-диагностических признаков листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.), ежевики аллеганской (*R. allegheniensis* Porter) и ежевики несской (*R. nessensis* Hall)
М. Б. Ильина, Е. В. Сергунова, Н. В. Бобкова 111

Стандартизация фармацевтической субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля
В. В. Пермикин, Е. Ю. Никитина, Е. В. Шадрина, Т. Г. Хонина 118

Стандартизация фармсубстанции литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-l-гулоновой кислоты как радиосенсибилизирующего агента
М. С. Третьякова, С. В. Кривощеков, Е. В. Плотников, Е. В. Дорожко, О. А. Воронова, М. С. Ларькина, К. С. Бразовский, М. В. Белоусов 125

Идентификация и количественное определение флавоноидов методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации
А. М. Полуянов, А. Ю. Соколова, А.-Д. Койнова, С. Д. Куликова, Е. А. Малашенко, Н. В. Бобкова 134

Доклинические и клинические исследования

Антибактериальная активность эфирных масел тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.)
О. Г. Шаповал, А. С. Шереметьева, Н. А. Дурнова, Н. К. Мухамадиев, Г. Т. Раббимова, М. Х. Назирбеков, М. А. Купряшина 143

Особенности набора пациентов в клинических исследованиях на примере международных мультицентровых клинических исследований (ММКИ)
С. С. Милованов 151

Реиннервация мимических мышц с использованием аллогенного биоматериала в эксперименте
Л. А. Мусина, О. Р. Шангина, А. И. Лебедева, А. В. Прусаков, А. В. Яшин, В.С. Понамарёв, В. Д. Раднатаров, А. М. Лунегов 169

Фармакологическая активность облепихи крушиновидной листьев: *in silico* и *in vivo*
Н. А. Ковалёва, О. В. Тринеева, А. В. Бузлама, А. Ю. Кузнецов 174

Оценка антистафилококковой активности пиримидинового производного
А. А. Цибизова, А. Л. Ясенявская, И. Н. Тюренков, А. А. Озеров, О. А. Башкина, М. А. Самотруева 190

Исследование элементного состава лекарственного растительного сырья Воронежской области
Н. А. Дьякова 195

Улучшение структуры миокарда после развившегося фиброзного перерождения в условиях применения аллогенного биоматериала
А. И. Лебедева, С. А. Афанасьев, Е. М. Гареев, Д. С. Кондратьева, Л. А. Мусина, С. В. Попов, А. В. Прусаков, А. В. Яшин, В. С. Понамарёв, В. Д. Раднатаров 202

Противоаритмическая активность аминокислотосодержащих производных нибентана на моделях ранних окклюзионных и реперфузионных аритмий
С. М. Напалкова, О. В. Буюклинская 212

Сравнительное адаптивное исследование фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов GP30121 и Цераксон® с использованием коррекции на уровень эндогенного аналита
А. Н. Арефьева, А. Р. Доротенко, С. М. Носков, И.Е. Макаренко, Р. В. Драй, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Н. С. Багаева, И. Е. Шохин 218

Определение фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС
Т. Н. Комаров, П. А. Карпова, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, П. К. Карнакова, Н. С. Багаева, К. Я. Заславская, П. А. Белый, И. Е. Шохин 229

Оценка биоаналогичности и иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) в рамках двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования I фазы с участием здоровых добровольцев
М. А. Колганова, Е. Е. Бекетов, В. В. Писарев, А. В. Иванов, С. В. Васильев, И. Е. Шохин 240

Регуляторные вопросы

Методологические подходы к управлению рисками применения высокотехнологических лекарственных препаратов
А. А. Таубэ, Н. Ю. Вельц 250

Исправления 261

CONTENTS

Introduction 10

Events 27

Research and development of new drug products

A Method for the Isolation of Thymoquinone from Black Caraway Seed Oil (*Nigella sativa* L.)
Andrey K. Whaley, Yelena V. Burtseva, Ekaterina V. Kuldyrkaeva, Alexander S. Novosad, Nikolay L. Babak, Elena V. Zhokhova, Anastasiya O. Whaley, Mikhail Yu. Goncharov, Inna I. Terninko, Gennadiy P. Yakovlev 29

Pharmaceutical Technology

Biopharmaceutical Properties of New Mucoadhesive Dosage Form for Eye Degenerative Diseases Treatment
Maria N. Anurova, Elena O. Bakhrushina, Ivan V. Lapik, Anastasia R. Turaeva, Natalia B. Demina, Boris B. Sysuev, Ivan I. Krasnyuk 41

Development and Study of Antibacterial *In situ* Coatings for Processing Implants
Elena O. Bakhrushina, Anna A. Popova, Maria V. Pomytkina, Maria N. Anurova, Natalia B. Demina, Ivan I. Krasnyuk 49

Development of Injectable Formulation of 4'-O-benzyloxycarbonyl-etoposide Derivative Based on Human Serum Albumin for the Chemotherapy of Breast Cancer
Tatyana S. Kovshova, Svetlana A. Boiko, Maria A. Merkulova, Nadezhda S. Osipova, Natalia I. Moiseeva, Julia A. Malinovskaya, Sergey N. Mantrov, Svetlana E. Gelperina 58

The Quality Risk Assessment of Paralithodes Camtschaticus Collagenase Gel in the Process of Pharmaceutical Development
Julia O. Ivankova, Boris B. Sysuev, Snezhana B. Evseeva 66

Development of the Composition and Technology of Tablets Based on *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge Dry Extract
Mariya V. Aroyan, Dar'ya E. Lohmatova, Dar'ya D. Vantorina, Ekaterina K. Novikova, Irina E. Kaukhova, Mikhail V. Nechaev 73

Analytical Methods

Screening of the Alcohol Fraction of *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. by GC/MS Method
Ainur M. Jumabayeva, Assel S. Kozhamzharova, Liliya N. Ibragimova, Inna I. Terninko, Elizaveta S. Surbeeva, Zuriyadda B. Sakipova 80

Composition and Content of Hydrolysable Tannins in Feijoa Leaves, *Acca sellowiana*
Tatiana A. Krol, Dmitry N. Baleev, Vladimir I. Ossipov 89

***Persicaria lapathifólia*: Identification, Chemical Composition, Pharmacological Action, Prospects for Use in Medical Practice (Review)**
Alevtina A. Gudkova, Anna S. Chistyakova, Anna A. Kostyleva, Aleksei S. Bolgov, Aleksei I. Slivkin 96

Evaluation of Cell Line Identity Using RTCA Profiling for Quality Control of Products Containing Viable Human Cells
Marina A. Vodyakova, Olga A. Rachinskaya, Nikita S. Pokrovsky, Irina S. Semenova, Ekaterina V. Melnikova, Vadim A. Merkulov 104

Comparative Study of Anatomical and Diagnostic Features of the Leaves of the European Dewberry (*Rubus caesius* L.), Allegheny Blackberry (*R. allegheniensis* Porter) and European Blackberry (*R. nessensis* Hall)
Margarita B. Ilina, Ekaterina V. Sergunova, Natalia V. Bobkova 111

Standardization of the Pharmaceutical Substance of the Silicon-zinc-boron-containing Glycerohydrogel
Vasiliy V. Permikin, Elena Yu. Nikitina, Elena V. Shadrina, Tat'yana G. Khonina 118

Standardization of the Pharmaceutical Substance of Lithium Salt Gamma-lactone of 2,3-dehydro-l-gulonic Acid as a Radio-sensitizing Agent
Maria S. Tretyakova, Sergei V. Krivoshchekov, Evgenii V. Plotnikov, Elena V. Dorozhko, Olesya A. Voronova, Maria S. Larkina, Konstantin S. Brazovskiy, Mikhail V. Belousov 125

Identification and Quantitative Determination of Flavonoids by HPLC-UV Method in the Raw Materials of Some Representatives of the Genus *Rumex* of Three Vegetation Time
Andrey M. Poluyanov, Anna Yu. Sokolova, Anna-Daniela Koynova, Sofia D. Kulikova, Evgeniya A. Malashenko, Natalia V. Bobkova 134

Preclinical and clinical study

Antibacterial Activity of Essential Oils of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus marschallianus* Willd.
Olga G. Shapoval, Anna S. Sheremetyeva, Natalya A. Durnova, Nurali Q. Mukhamadiev, Gulnora T. Rabbimova, Mavlonbek K. Nazirbekov, Maria A. Kupryashina 143

Patterns of Patient Recruitment in Clinical Studies on the Example of International Multicenter Clinical Studies (IMCTs)
Svyatoslav S. Milovanov 151

Innervation of Facial Muscles Using an Allogeneic Biomaterial in an Experiment
Lyalya A. Musina, Olga R. Shangina, Anna I. Lebedeva, Alexey V. Prusakov, Anatoliy V. Yashin, Vladimir S. Ponamarev, Vladimir D. Radnatarov, Alexandr M. Lunegov 169

Pharmacological Activity of Sea Buckthorn Leaves: *In silico* and *In vivo*
Natalya A. Kovaleva, Olga V. Trineeva, Anna V. Buzlama, Alexandr Yu. Kuznetsov 174

Evaluation of the Antistaphylococcal Activity of the Pyrimidine Derivative
Alexandra A. Tsibizova, Anna L. Yasenyavskaya, Ivan N. Tyurenkov, Alexandr A. Ozerov, Olga A. Baskina, Marina A. Samotrueva 190

Examination of Elemental Composition of Herbal Medicinal Raw Materials of Voronezh Region
Nina A. Dyakova 195

Improvement of Myocardial Structure after Developed Fibrous Degeneration Under the Use of Allogenic Biomaterial
Anna I. Lebedeva, Sergey A. Afanasiev, Evgeny M. Gareev, Dina S. Kondratieva, Lyalya A. Musina, Sergey V. Popov, Alexey V. Prusakov, Anatoliy V. Yashin, Vladimir S. Ponamarev, Vladimir D. Radnatarov 202

Antiarrhythmic Activity of Amino Acids Containing Nibentan Derivatives in Case of Symptoms of Occlusive and Reperfusion Arrhythmias
Svetlana M. Napalkova, Olga V. Buyuclinskaya 212

An Open-label Randomized Crossover Study with Adaptive Design of the Pharmacokinetics and Bioequivalence of GP30121 and Ceraxon® Corrected for Endogenous Analyte Level
Anna N. Arevefa, Artem R. Dorotenko, Sergey M. Noskov, Igor E. Makarenko, Roman V. Drai, Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Natalya S. Bagaeva, Igor E. Shokhin 218

Determination of Favipiravir in Human Blood Plasma by HPLC-MS/MS
Timofey N. Komarov, Polina A. Karpova, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Polina K. Karnakova, Natalia S. Bagaeva, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely, Igor E. Shohin 229

A Double-blind Randomized Comparative Phase I Study to Assess Biosimilarity and Immunogenicity of "Trastuzumab" (LLC "Mabscale", Russia) and Herceptin® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in Healthy Volunteers
Maria A. Kolganova, Evgeny E. Beketov, Vladimir V. Pisarev, Andrei V. Ivanov, Sergey V. Vasiliev, Igor E. Shokhin 240

Regulatory Issues

Methodological Approaches to Risk Management of Advanced Therapy Medicinal Products
Alexandra A. Taube, Nataliya Yu. Velts 250

Erratums 261

Редакционная статья / Editorial article

На новом месте – новые возможности

В феврале 2023 года состоялось открытие лабораторного комплекса ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» в здании по адресу: Симферопольский бульвар, д. 8. В связи с переездом лаборатории Российский федеральный телеканал «НТВ» выпустил репортаж, где генеральный директор ООО «ЦФА» дал интервью о текущей деятельности компании и перспективах.

New place, new opportunities

In February 2023, the opening of the laboratory complex of LLC "Center for Pharmaceutical Analytics" took place in the building at 8 Simferopol Boulevard. In connection with the relocation of the laboratory, the Russian federal television channel "NTV" released a report where the general director of LLC "CPHA" gave an interview about the current activities of the company and prospects.

ПРОШЛОЕ – ЭТО ИСТОРИЯ

Здание 1936 года постройки, где сейчас размещается лаборатория имеет свою богатую историю, ранее тут располагался Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения (ВНЦ МДЛ). Под руководством члена-корреспондента РАН профессора Евгения Сергеевича Северина работала плеяда ученых, хорошо известных в области биохимии, генетике, молекулярной биологии в нашей стране и за рубежом. Среди них: академик РАН А. Г. Габибов – директор Института биоорганической химии РАН им. М. М. Шемякина и Ю. А Овчинникова; доктор химических наук профессор И. Н. Курочкин – директор Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН; доктор биологических наук А. Н. Федоров – директор Федерального центра основ биотехнологии РАН; доктор биологических наук, профессор А. Н. Глухов – заведующий кафедрой биохимии МГМУ им. И. М. Сеченова.

Сергей Евгеньевич Северин внес колоссальный вклад в развитие отечественной науки, под руководством и при его участии разработаны тест-системы для диагностики различных заболеваний (тиреоидиты, острый инфаркт миокарда, патология предстательной железы), проводились работы по исследованию механизмов межклеточных взаимодействий и их структурных компонентов, изучалась проблема старения с точки зрения регуляции теломеразной активности, проводились исследования, посвященные изучению опухолевых маркеров и созданию тест-систем на их основе с использованием иммунохимических и молекулярно-биологических методов; под его редакцией вышел усовершенствованный учебник «Биологическая химия с упражнениями и задачами», который до сих пор переиздается и пользуется большим спросом у преподавателей и студентов Первого МГМУ им. И. М. Сеченова.

КОЛЛЕКТИВ – САМОЕ ВАЖНОЕ В РАБОТЕ

Что интересно, на данный момент коллектив ООО «ЦФА» насчитывает более 80 % сотрудников-выпускников ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет). Коллектив составляет около 30 сотрудников – специалистов своего дела. Особенностью ООО «ЦФА» как компании всегда был научный подход, что подтверждается большим количеством успешно выполненных работ, которые можно смело отнести к нестандартным.

Компания состоит из двух подразделений. Первое – это исследовательский центр (ИЦ) во главе с директором ИЦ, к. фарм. н. **Тимофеем Комаровым**. В центр входит лаборатория биоаналитических исследований ИЦ, заведующей которой является **Ольга Арчакова**; отдел обеспечения качества ИЦ возглавляет **Мария Попова**; работа отдела биостатистики ИЦ осуществляется под руководством **Натальи Багаевой**. Вторым подразделением является отдел развития бизнеса (ОРБ), возглавляемый **Андреем Полуяновым**, к которому структурно относится научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств», проектный отдел ОРБ и бухгалтерия.

Переезд позволил расширить офисную зону, теперь каждый отдел имеет свое комфортное и укомплектованное рабочее пространство. *Лабораторная зона расширилась в разы*: так, появилась отдельная комната для пробоподготовки и зона приготовления растворов, хроматографические комнаты, имеющие отдельные боксы для каждого прибора, зона приемки образцов, комната для хранения образцов и для хранения отходов, комната для проведения иммуноферментного анализа и изолированная весовая. Все комнаты оснащены современной и высокопроизводительной системой приточно-вытяжной вентиляции.

Введение новой биоаналитической лаборатории, оснащенной современным оборудованием, особенно актуально в свете увеличения препаратов, внесенных в список дефектуры. Принимая вызов, отечественные производители наращивают объемы исследований воспроизведенных отечественных препаратов, в том числе передовых противоопухолевых, противовирусных, антибактериальных, противодиабетических и других как химико-фармацевтических, так и биологических. Ведущие отечественные заказчики обращаются с запросом на проведение работ именно в ООО «ЦФА».

СОВРЕМЕННОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ДЕЛ НА РЫНКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Сейчас специалисты Центра проводят аналитический этап клинических исследований в среднем для 70 препаратов в год. Анализ выполняется двумя современными группами методов: хроматографических (преимущественно ВЭЖХ-МС/МС) и лиганд-связывающих (ИФА с использованием готовых наборов). Система менеджмента ООО «ЦФА» сертифицирована по требованиям стандартов: GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Сертификации Русского Регистра, в системе Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт); ГОСТ Р ИСО 9001-2015 в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации); международного стандарта ISO 9001:2015 в системе Сертификации Русского Регистра, участника международного форума по аккредитации IAF, сертификат соответствия единого образца IQNet. *Область сертификации*: научно-исследовательская работа, проведение биоаналитических исследований, проведение фармакокинетических исследований, проведение ТСКР (теста сравнительной кинетики растворения), определение противолекарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.

В среднем исследование одного препарата занимает около месяца. Работа команды выстроена таким образом, что каждый этап автоматизирован: от приемки материалов для выполнения работ до получения итоговых документов и их отправки заказчику. Только грамотно выстроенная и слаженная коллективная работа позволяет поддерживать такой высокий темп работы, сохраняя качество.

«*Расширение лаборатории открывает новые возможности в свете увеличения запросов на проведение исследований в области клинических исследований. Это позволяет оперативно и эффективно отвечать на запросы рынка*», – говорит доктор фармацевтических наук, генеральный директор Центра Фармацевтической Аналитики **Шохин Игорь Евгеньевич**.

УДК 615.11

Редакционная статья / Editorial article

Роль указов Петра I в формировании и развитии российской фармации. Часть 2

К. С. Гузев✉

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

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

Резюме

Во второй части статьи представлены следующие шаги Петра I по совершен-ствованию функционирования аптечной службы России. С целью совершенствования руководства зарождающейся аптечной службы Петр I выделяет Главную аптеку в Аптекарском приказе и назначает ее руководителя, наделенного четко прописанными правами и ответственностью. Развитию аптечной службы в России способствовала организация госпиталей, при которых были учреждены аптеки. В них, как правило, работали иностранцы, но они передавали аптекарскую науку молодым из всякого чина людям. В это же время Петр I стимулирует появление химических производств, выдавая российским предпринимателям жалованные грамоты на их открытие. Для обеспечения финансовой устойчивости работы госпиталей и организованных при них аптек царь издает Указ о вычете с рубля по копейке со всех военных и гражданских служивых людей на содержание госпиталей. Особое внимание Петр I уделяет подготовке собственных кадров. Для этого он вначале приглашает специалистов из-за границы, но в дальнейшем своими указами постоянно направляет на обучение в школах грамоте, арифметике и геометрии всех молодых людей. Наиболее одарённых дворянских, боярских и купеческих детей направляют для обучения за границу. В последний год жизни Петр I учреждает Академию наук, в которую, по его планам, должен был входить университет, где на медицинском факультете изучались бы медицинские и фармацевтические науки. Таким образом, Петр I последовательно и системно сформировал основные направления отечественной аптечной службы, которая, гармонично развиваясь, должна была обеспечивать гражданское здоровье.

The Role of the Decrees of Peter the Great in the Formation and Development of Russian Pharmacy. Part 2

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

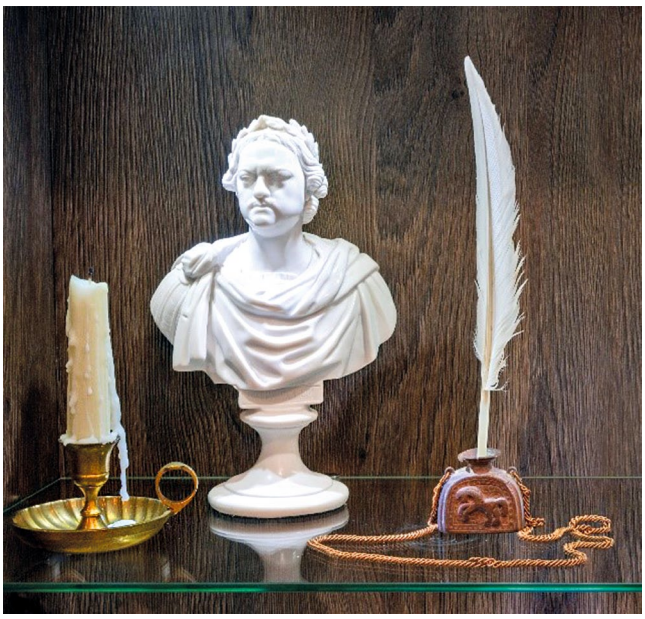
The second part of the article presents the next steps of Peter the Great to improve the functioning of the pharmacy service in Russia. To improve the management of the nascent pharmacy service, the Emperor established the Main Pharmacy in the Pharmaceutical Prikaz (i.e. chamber) and appointed its head, endowed with clearly defined rights and responsibilities. The development of the pharmacy service in Russia was facilitated by the organization of hospitals, in which pharmacies were established. Usually, foreigners worked there, but they shared their pharmaceutical knowledge with young people of different social strata. At the same time, Peter the Great stimulated the emergence of chemical industries, issuing letters of commendation to Russian entrepreneurs to open chemical industries. To ensure the maintenance and financial sustainability of hospitals and pharmacies the Emperor issues a decree on a new tax (one kopeck from each ruble) for all military and civilian service people. Peter the Great paid special attention to the training of local people as personnel. So, at first, he invited specialists from abroad, but later, he constantly sent all young people to study literacy, arithmetic and geometry in schools by his Decrees. The most talented children of nobles, boyars and merchants were sent to study abroad. In the last year of his life, Peter the Great established the Academy of Sciences, which, according to his plans, should include the University, where medical and pharmaceutical sciences would be studied at the Faculty of Medicine. Thus, Peter the Great consistently and systematically formed the main directions of the domestic pharmacy service, which, while developing harmoniously, was supposed to ensure civil health.

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

К. А. Валишевский

Пятый шаг – совершенствование руководства аптечной службы.

В 1706 г. наступает пора выделить Главную аптеку в Аптекарском приказе и назначить в ней отдельного руководителя. Для этого Петр I выпустил очередной указ «Об определении Комиссара в Главную аптеку для управления всякими делами», который предписывал: «*В главной… аптеке быть комиссаром Павлу Веселовскому и всякое управление чинить, как надлежит, по данным ему статьям, а особливо приказ воспринимать от Доктора Арескина. А где есть гарнизоны, в те города ко всем комендантам надлежит послать Указ о сборе денег за медикаменты, чтобы сборные деньги присылали в Москву в Его Государеву главную аптеку и отдавали вышеупомянутому комиссару с росписью; также какие лекарства понадобятся и те лекарства присылать*



росписи тому же комиссару и против тех росписей брать лекарства с расписками»[1]. В указе четко прописано, что должен делать новый руководитель Главной аптеки и как гарнизонное начальство может получать необходимые для службы гарнизона лекарства. Все должно быть записано, оплачено и получено по согласованному с комиссаром Главной аптеки перечню.

В 1721 г. Правительствующий сенат учреждает Медицинскую коллегию и переподчиняет ей все имеющиеся в России вольные аптеки. Доктор Блюментрост подал Его Величеству прошение, в котором просил: «…*во всех учрежденных штатах всегда усмотряется, яко все привилегии имеющие аптеки, под властию Коллегии Медицинской суть, и должны лекарства свои по уложенной цене продавать; также аптеки свои некоторым физикам от тоя Коллегии Медицинской, в то время по оному делу приставлены, допущать ежегодно осматривать, чтобы подданные граждане не могли жалобы творить ради негодных лекарств и несправедливой цены*». Таким образом, вновь организованная структура должна строго следить за работой аптек. В ее задачи входил контроль за качеством отпускаемых лекарственных средств, а также их ценой, которая должна была быть фиксированной и не вызывать недовольства у обывателя[2].

Шаг шестой – обучение фармацевтическому делу.

Фармацевтическое образование в России связано с появлением и развитием госпитальных школ, в дальнейшем преобразованных в медико-хирургические училища, а впоследствии в соответствующие академии.

25 мая 1706 г. Петром I был подписан указ о строительстве в Москве первого в России военного госпиталя. В указе предписывалось: «*За Яузой рекой против немецкой слободы в пристойном месте, для лечения болящих людей построить госпиталь, а у того лечения быть доктору Бидло, да двум лекарям Андрею Рыбкину, а другому, кто прислан будет, да из иноземцев и из русских, изо всякого чина людей набрать для аптекарской науки 50 человек*». В соответствии с этим указом впервые в России было организовано централизованное обучение молодых аптекарей. На строительство и организацию всей работы госпиталя понадобилось полтора года, и с 21 ноября 1707 г. Московский военный госпиталь начал свое существование. На момент открытия в структуру госпиталя входили «…*два больших сада, из коих один Ботанический, аптека, Анатомический театр, медицинское училище и церковь. В нем работали доктор, штаб-лекарь, оператор, акушер, 6 лекарей, 10 подлекарей, аптекарь и учеников лекарских и аптекарских 54*»[3, 4].

Развивая тему подготовки докторов и фармацевтов в 1712 г., Петр I издает указ «Об учреждении во всех Губерниях гошпиталей»[5]. В нем предписывалось: «*По всем Губерниям учинить гошпитали для самых увечных таких, которые ничем работать не могут, ни стеречь также, и зело престарелым; также прием незазрительной и прокормление младенцам, которые не от законных жен рождены, дабы вящего греха не делали, сиречь убивства, по примеру Новгородского Архиерея*». Первые такие «гошпиталя» были организованы в Москве, Петербурге, Киеве, Екатеринбурге, Ревеле и Риге. Учреждение этих госпиталей явилось важным шагом Петра I, так как в них уже работали в основном отечественные доктора и фармацевты с учениками. Это ускорило процесс подготовки этих специалистов в столичных госпиталях. Позднее по указанию Петра I были открыты Санкт-Петербургский сухопутный госпиталь (1716 г.), Санкт-Петербургский Адмиралтейский госпиталь (1719 г.) и Кронштадтский морской госпиталь (1720 г.). При каждом госпитале были организованы аптеки, где работали, как правило, уже опытные фармацевты, передававшие свои знания молодым гезелям (помощникам). И. Б. Зархин так описывает этапы обучения будущих фармацевтов: «*Обучение состояло из нескольких этапов. Ученик поступал в одну из аптек или аптекарский огород в обучение на 5–6 лет. Затем, выдержав экзамен на гезеля, направлялся для прохождения службы в полевую аптеку на 2–3 года. После этого, выдержав экзамен на звание провизора (аптекаря), он получал право на самостоятельную фармацевтическую деятельность*»[6].

[1] ПСЗРИ. 2124 10.12.1706. Т. IV. С. 358.

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

[3] Алелеков А. Н. История Московского военного госпиталя в связи с историею медицины в России. К 200-летнему его юбилею. 1707–1907 гг. М. 1907. 719 с.

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

[5] ПСЗРИ. 2477. 31.01.1712. Т. IV. С. 791.

[6] Зархин И. Б. Очерки из истории отечественной фармации. М.: Медгиз; 1956. 187 с.

Шаг седьмой – организация отечественной химической промышленности.

До Петра I какой-либо промышленности в современном понимании в России не было. По территории России были разбросаны отдельные промыслы, принадлежащие небольшим группам мастеров и ремесленников, получающих соль, соду, селитру, деготь, поташ, древесный уголь, уксусную кислоту и прочие продукты, не требующие сложной переработки сырья.

К первому упоминанию об организации химического предприятия можно отнести указ Петра I от 8 августа 1713 г. «О делании селитры в Малороссии, о привозе оной на продажу в Москву и непропуске за границу»[1]. В указе сказано: «*В малороссийских городах всяких чинов людям селитренные заводы размножить, и селитру велеть варить без остановки, чтобы селитры было в выварке многое число; а ту селитру покупать у них… повольною ценою, и купя привозить в Москву, а оприч Москвы, в иные города и за рубеж с того селитрою отнюдь никого не пропускать; и для того в пристойных местах поставить заставы крепкия чтобы с тою селитрою, опричь Москвы, ни каким способом никуды ни в какие города за рубеж никто проехать не мог*». Прямое отношение к возникновению отечественной химической промышленности имеет и «Жалованная грамота на учреждение завода купоросного масла и крепкой водки», выданная русским ремесленникам в 1718 г. В ней говорилось: «*Лантрат Афанасьевич Савелов и купцы братья Дмитрий и Данило Томилины во Гжельской и Селинской волостях обнаружили купоросную руду, из которой были получены черный купорос, краска мумия, сера горючая. Из того купоросу сделано масло, дух купоросный и водка крепкая. Поэтому Великий Государь по результатам опытов отдает ту купоросную руду во владение для делания тех вещей этим компанейщикам для устройства где та руда имеется всякие заводы и продавать те вещи в Нашем государстве, а также и иным Государствам*»[2]. В том же году аналогичная грамота выдана купцу Павлу Вестову – «*О даче купцу Вестову на десять лет привилегии на устройство в Москве сахарного завода и о невзыскании с него пошлины, как за привоз, так и за продажу сахара в течение трех лет*». Из текста грамоты узнаем: «*Московскому купцу Павлу Вестову в Москве сахарный завод заводить своим коштом, и в ту компанию призывать ему кого похочет, на то ему дать из Мануфактур-коллегии привилегию на десять лет. Для оной фабрики вывозить ему из-за моря сахар-сырец, и в Москве из того варить сахар головной и продавать свободно… И за продажу пошлин с него не брать 3 года*»[3]. В 1719 г. Петром I выдана именная грамота, дающая привилегию на устройство скипидарного завода, – «*О привилегии, данной Стольнику Савелову и купцу Томилину на устроение заводов для делания на оных скипидара, канифоли и гарпиуса*», в которой есть такие строки: «*Великий Государь повелел: для размножения в Российском Государстве фабрики Стольнику Афанасию Тимофееву, да из купечества Ивану, Дмитрию, Данилу Томилиным построить заводы в Московском уезде и в дворцовых волостях… На которых заводах варить и делать, и размножать им скипидар, канифоль и гарпиус, и как можно то дело им размножать и распространять и те вещи за прииск и за положенное в том иждивением продавать в Российском Государстве, а буде у них что излишне и в дело пойти сможет, то и для продажи в других государствах*»[4].

Из текстов этих указов и именных грамот видно желание Петра I развивать собственное, российское, промышленное производство химических продуктов. Более того, эти документы касаются непосредственно производства лекарственных средств и сырья для их производства. Поэтому эти факты были нами расценены как непосредственно касающиеся фармации.

Шаг восьмой – финансовое обеспечение функционирования медицинской и аптечной служб России.

Для бесперебойной работы госпиталей и аптек, действующих при них, необходимо было организовать их финансовое обеспечение. Денег в государстве было немного, но Петр I вышел из этого положения, издав указ «О вычете из жалования у всяких чинов людей, кроме солдат, с рубля по копейке на содержание гошпиталя», который предписывал: «*На содержание госпиталей и довольствия больных, у всяких чинов людей, как воинских, так и духовных и статских и прочих, кто какое звание имеет, кроме рядовых, а денежное жалование в руку получают, вычитать на каждый год от каждого рубля по копейке, и оные определенные на гошпиталь деньги на другие расходы отнюдь не держать, и отдавать оныя определенным из Военной Коллегии лазаретным Комиссарам*»[5]. Этот указ позволил Аптечному приказу, а затем и Медицинской коллегии свободно существовать, своевременно закупая необходимые медикаменты для снабжения ими армии, флота и гражданских (вольных) аптек.

Шаг девятый – народное образование и наука.

Издавна было заведено приглашать на службу в Россию ученых, инженеров, врачей, аптекарей и мастеров других специальностей, которых не было в российском государстве. После посещения Европы Петр I перенял эту практику у своих предшественников. Так, для развития в России управленческих кадров, различных производств и образования Петру I пришлось приглашать иностранцев на русскую службу. Причем им часто предоставлялись значительные преференции. Так, в указе, изданном 16 апреля 1702 г., «О вызове иностранцев в Россию, с обещанием им свободы вероисповеданий» им гарантировалась сво-

[1] ПСЗРИ. 2705 08.08.1713. Т. V. С. 49.
[2] ПСЗРИ. 3180. 09.03.1718. Т. V. С. 552.
[3] ПСЗРИ. 3181. 14.03.1718. Т. V. С. 554.
[4] ПСЗРИ. 3358. 23.04.1719. Т. V. С. 695.
[5] ПСЗРИ. 3867 12.12.1721. Т. VI. С. 466.

бода вероисповедания[1]. Другим указом от 20 августа 1715 г. он призвал «…*в Россию Ученых и в Правоведении искусных людей для отправления в Коллегии дел*». О необходимости приглашения иноземных специалистов в Сенате докладывал генерал Вейд. Выслушав его сообщение, Петр I наложил следующую резолюцию: «*Ученых приглашать со следующими условиями: принятым на службу выдавать по 500 руб. и готовый без найма двор; поскольку они иноземцы, надлежит приставить к каждому толмача; приехавшим давать чин асессорский и жалованье, а будут выше чином, то сохранить его, при прежнем жаловании; а если дело свое будет исполнять достойно – то сверх жалования награждены будут*»[2].

Следующей важной задачей, которую государь решал на протяжении всего своего правления, являлась подготовка отечественных кадров. В первую очередь Петр I заставлял учиться своих подданных. Так, грамотой от 26 сентября 1701 г. «О невозбранении обучения в Киевской Академии Русским, приходящим из других стран людям»[3] он разрешал всем желающим учиться в церковных учреждениях. Выучившихся и желающих учиться дальше он призывал повышать свое образование грамотой «О обучении поповских и дьяконских, и прочих церковнослужительских детей в Греческой и Латинских школах, о не посвящении в попы и дьяконы тех, которые учиться не хотят и о неприеме оных ни в какие чины, кроме солдатского звания»[4]. Иногда ему приходилось действовать против воли учеников: «*О высылке детей разного сословия, кроме Дворянских, для учения в школы*»[5]. Важно отметить, что Петр I стремился обучить не только детей знатных особ, – учиться должны все. Об этом свидетельствует множество указов, подписанных им в разное время: «Об обучении всякого чина людей, кроме Дворян, Арифметике, Геометрии и нечинении им никакого притеснения»[6], «О высылке из городов для учения Арифметике и Геометрии Дьячих и подьячих детей, им о бытии оным учениками в ведении Адмиралтейской Коллегии»[7], «О учреждении школы для обучения подъячих арифметике и письмоводству»[8], «О обучении Дворян приказного чина, Дьячих и подьяческих детей Арифметике и Геометрии, о посылке для этого в Губернии учеников из Математических школ и об учреждении училищ при Архиерейских домах и монастырях»[9], «О высылке знатных особ детей в Санкт-Петербургскую школу»[10], «О наборе в Инженерную школу учеников»[11].

Особое место занимали учащиеся, подготавливаемые для государственной и военной службы, что отражено в указах: «О посылке в Кенигсберг подъячих для научения Немецкому языку, и о сборе на содержание их денег с прочих подъячих»[12], «О посылке в Венецию, Францию и Англию дворянских детей для определения в морскую службу»[13], «О посылке во Францию Дворянских детей для научения морской службе»[14].

Ну и конечно, огромное значение для развития образования в России имеет указ об организации Академии наук – «О учреждении Академии и о назначении для содержания оной доходов таможенных и лицентных, собираемых с городов Нарвы, Дерпта, Пернова и Аренсбурга». Великий Государь указал: «...*учредить Академию, в которой бы учились языкам, также прочим наукам и знатным художествам, и переводили бы книги… на содержание оной определить доходы, которые собираются с городов Нарвы, Дерпта, Пернова и Аренсбурга таможенных и лицентных, 24 912 рублей*…». Важно отметить, что составной частью Академии, по мысли Петра I, должен был стать университет, в котором, кроме философии и юриспруденции, учились бы и медицине. В пункте 2 параграфа 15 указа сказано: «Медицинский факультет совершенно из 2 класса, сиречь Анатомика, Химика и Ботаника сочинен быть может»[15]. К сожалению, Петр I не успел реализовать свою мечту касательно университета. Это смогла сделать его дочка Елизавета Петровна в 1755 г.[16, 17]

В заключение необходимо отметить еще одно важное начинание Петра I. С 1719 г. (по другим источникам с 1721 г.) император один за другим подписывает указы, касающиеся работы государственной Синодальной библиотеки. Для этого он переподчинил Патриаршую библиотеку Синоду и выпустил несколько указов, регламентирующих ее функционирование. К этой группе указов относятся распоряжения «О присылке в Сенат из Санкт-Петербургской Типографии всех гражданских и прочих книг, которые будут печатаны, по два экземпляра»: «Из Санкт-*Петербургской Типографии всех гражданских и прочих книг, которые будут печатаны, (оприч военного Устава и Артикула, понеже оные в Сенате есть) прислать в Сенат по одной для сохранения в Архиву, а по другой*

[1] ПСЗРИ. 1910. 16.04.1702. Т. VI. С. 192.
[2] ПСЗРИ. 2928. 20.08.1715. Т. V. С. 165.
[3] ПСЗРИ. 1870. 26.09.1701. Т. IV. С. 173.
[4] ПСЗРИ. 2308. 11.11.1710. Т. IV. С. 581.
[5] ПСЗРИ. 3447. 06.11.1719. Т. V. С. 751.
[6] ПСЗРИ. 3575. 30.04.1720. Т. VI. С. 187.
[7] ПСЗРИ. 3703. 09.01.1720. Т. VI. С. 289.
[8] ПСЗРИ. 3845. 10.11.1721. Т. VI. С. 451.
[9] ПСЗРИ. 2778. 28.02.1714. Т. V. С. 86.
[10] ПСЗРИ. 2968. 20.12.1715. Т. V. С. 186.
[11] ПСЗРИ. 2739. 19.11.1715. Т. V. С. 70.
[12] ПСЗРИ. 2997. 19.02.1716. Т. V. С. 200.
[13] ПСЗРИ. 2999. 02.03.1716. Т. V. С. 201.
[14] ПСЗРИ. 3058. 03.01.1717. Т. V. С. 484.
[15] ПСЗРИ. 4443. 28.01.1724. Т. VI. С. 220.
[16] Шевырев С. История Императорского Московского университета, написанная к столетнему его юбилею (1755–1855). М. 1855. 584 с.
[17] Сточик А.М., Затравкин С.Н. Медицинский факультет Московского университета в XVIII в. М.: Медицина; 1996. 368 с.

для известия, также и впредь, которые будут печататься, присылать по две же книги»[1]; «О внесении в Сенат всех копий со всех Именных указов, которые состоятся в Коллегии и прочих присутственных местах»: «*О чем какие Его Царского Величества Именные указы в коллегиях или в Санкт-Петербургской Губернии и в городовой канцелярии состоятся, а касаются правления или ведению Сенатскому (кроме тайных дел) с тех со всех указов, для известия, в Сенат сообщать копиями за руками, того же числа*»[2]; «О бытии при Сенате типографскому печатному стану иностранных языков и об определении при оном искусного Переводчика и Секретаря»[3]; «О присылке из всех Епархий и монастырей древних рукописных летописей и подобных книг в Москву в Синод»: «*Великий Государь указал: из всех Епархий и монастырей, где, о чем по описям куриозные, то есть древних лет рукописных на хартиях и на бумаге церковные и гражданские летописцы, степенные, хронографы и прочие им подобные, что где таковых обретается, взять в Москву в Синод, и для известия оныя списать, и те списки оставить в библиотеке, а подлинные разослать в те же места, откуда взяты будут*…»[4]; «О сообщении из Правительствующего Сената копий с Именных Указов Синоду»[5]. Таким образом, Петр I в начале XVIII в., продолжив традиции Патриаршей библиотеки, преобразовал ее в Синодальную библиотеку, существующую по сей день.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тезис о том, что Петр I сильно заботился о здоровье своего народа, слегка преувеличен. На протяжении многих лет, особенно в начале царствования, он редко подписывал указы, касающиеся медицины, санитарии, фармации. Таких указов в молодые годы Петра I было мало. Судя по всему, эти указы ему готовили ближние бояре (обычно в указе присутствовала приписка: «Именной Указ с боярским приговором»), но эти проблемы их мало интересовали. По возвращении Петра I в Россию из Европы после Великого посольства (1697–1698 гг.) количество таких указов увеличилось, и касались они, кроме медицинских и фармацевтических мероприятий, санитарного состояния городов, торговли продуктами питания, а также деятельности городских властей при моровых поветриях.

Анализ содержания указов, касающихся фармации, свидетельствует о последовательном и системном формировании структуры аптечной службы. В самом начале эта служба находилась «под прикрытием» госпиталей, затем, после учреждения вольных аптек, она стала самостоятельно функционировать, сохранив в неизменном состоянии свою военную ветвь. Организованная Медицинская коллегия, кроме выдачи разрешения на организацию аптек, получила право на их инспектирование. Некоторые указы иногда повторялись, что может свидетельствовать о трудном осуществлении предписанных мероприятий. Несомненно, сложно было находить исполнителей (инициативных ремесленников, докторов, аптекарей, ученых, да и вообще честных людей), не было ни денег, ни опыта, ни поддержки окружения. Напротив, многие указы встречали активное сопротивление, что требовало постоянного контроля и напряжения всех сил.

Однако, несмотря на все трудности, связанные с организацией управления Российской империей, постоянными войнами, строительством армии, флота, новых городов и постоянной нехваткой денег, Петр I все же смог заложить в России основы функционирования фармацевтической службы. Медленно, но верно он своими указами формировал структуру, которая охватила практически все грани фармацевтической деятельности, начиная от контроля за ввозом лекарств, заканчивая учреждением Академии наук.

P. S. До Октябрьской революции фармацевтическая общественность праздновала день фармацевта 20 ноября. В этот день в 1701 г. Петр I подписал указ «О заведении в Москве вновь осьми аптек… и уничтожении зелейных лавок». Они были убеждены, что этот день для России является очень важным, так как этим указом Петр Алексеевич «даровал народу вольные аптеки в России». Однако правительство современной России решило иначе. Оно утвердило профессиональный праздник, День фармацевтического работника, 19 мая 2021 г., обосновав это тем, что именно в этот день в 1581 году в России с разрешения государя Ивана Грозного открылась первая царская аптека.

[1] ПСЗРИ. 3361. 30.04.1719. Т. V. С. 696.
[2] ПСЗРИ. 3372. 11.05.1719. Т. V. С. 699.
[3] ПСЗРИ. 3843. 05.11.1721. Т. VI. С. 451.
[4] ПСЗРИ. 3908. 16.02.1722. Т. VI. С. 511.
[5] ПСЗРИ. 4319. 02.10.1723. Т. VII. С. 130.

Рекламная статья / Sponsored article

Проект ГОСТ Р Получение, хранение и распределение воды фармацевтического назначения. Вода очищенная и вода для инъекций

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке АО «НПК МЕДИАНА-ФИЛЬТР»

Система водоподготовки является существенной частью производственного цикла лекарственных препаратов. Существующие на сегодняшний день регламентирующие документы нормируют состав и основные принципы получения, хранения и распределения воды для инъекций и воды очищенной, например, отсутствие застойных зон, возможность санитарной обработки, циркуляция воды в контуре. Однако эти рекомендации носят общий, декларативный характер, иногда противоречат друг другу, часто избыточны, и главное, не содержат конкретных технических рекомендаций, которые могли бы учесть инженеры при проектировании оборудования, изготовители при производстве, эксплуатирующие организации при эксплуатации. Наличие стандарта с указанным выше содержанием обеспечит техническую поддержку для функционирования национального законодательства: Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказа Минпромторга России от 14.06.2013 № 916, Рекомендаций ЕЭК № 31 от 13.12.2017.

Project GOST R Production, Storage and Distribution of Pharmaceutical Water. Purified Water and Water for Injection

The authors prepared the article with the financial support of JSC "NPK MEDIANA-FILTER"

The water treatment system is an essential part of the drug production cycle. The current regulatory documents normalize the composition and basic principles for the production, storage and distribution of water for injection and purified water. However, these recommendations are of a general nature, sometimes contradict each other, and, most importantly, do not contain specific technical recommendations that could be taken into account by engineers when designing equipment, manufacturers during production, and operating organizations during operation. Having a standard with the above content will provide technical support for the functioning of national legislation.

ВВЕДЕНИЕ

Стандарт состоит из 10 разделов, наиболее важные из них: общие требования, технологии и материалы рекомендуемые для проектирования СВП, отбор проб, контрольно-измерительные приборы (КИП) и параметры, подлежащие контролю в СВП, проектирование системы хранения и распределения ВФН, эксплуатация и техническое обслуживание СВП, аттестация системы водоподготовки. А также включает 8 приложений с рисунками и схемами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В стандарте впервые определены такие дефиниции как, Обессоленная вода, Обратноосмотическая вода (RO-вода), Деионизованная вода, Сверхчистая вода, Ультрачистая вода, Вода фармацевтического назначения (ВФН).

Ключевой, оригинальной идеей стандарта являются требования:

- четко определить границы трех отдельных блоков: системы предварительной подготовки, системы получения ВФН, а также системы хранения и распределения ВФН;
- соблюдение сформулированных для каждого блока требований к проектированию и надзору (санитарному для блока предварительной подготовки и лицензионному начиная с границы системы получения ВФН).

Первый блок – это система предварительной подготовки питьевой воды для получения воды корректированной по составу содержащихся в ней примесей, предназначена для корректировки содержания примесей в питьевой воде с целью обеспечения устойчивой работы второго блока – система получения ВФН. В таблице 1 приведены ориентировочные

значения содержания примесей в воде на выходе первого блока.

Таблица 1. Рекомендуемые уровни содержания примесей в питьевой воде после блока предварительной подготовки и корректировки содержания примесей в питьевой воде (состав частично обессоленной воды)

Table 1. Recommended impurity levels in drinking water after pretreatment block and correction of the content of impurities in drinking water (composition of partially demineralized water)

Параметр Parameter	**Рекомендуемое значение** Recommended value	**Значение по СанПин 1.2.3685** Value according to SanPin 1.2.3685
Электропроводность, мкСм/см, 20 °С Electrical conductivity, μS/cm, 20 °C	менее 50 less than 50	Не норм. Not the norm.
Солесодержание, мг/л (сухой остаток) Salt content, mg/l (dry residue)	менее 15 less than 15	менее 1000 less than 1000
Железо общее, мг/л Iron total, mg/l	менее 0,05 less than 0,05	0,3
Мутность, мг/л Turbidity, mg/l	менее 0,5 less than 0,5	1,5
Коллоидный индекс Silt Density Index	менее 3 less than 3	Не норм. Not the norm.
Жесткость, мг-экв Hardness, mEq	менее 0,1 less than 0,1	7
Алюминий Aluminum	менее 0,05 less than 0,05	0,2
Кремний, мг/л Silicon, mg/l	менее 0,5 less than 0,5	20
Окисляемость, перм мгO_2/л Oxidability, perm mgO_2/l	менее 0,5 less than 0,5	5

Второй блок предназначен для непосредственного получения ВФН из питьевой воды, скорректированной по составу примесей, блок всегда включает оборудование для обессоливания воды, корректировки по микробиологическим параметрам, эндотоксинам и содержанию общего органического углерода (УОО). Это может быть как одноступенчатый, так и много ступенчатый процесс с учетом рекомендаций действующей государственной фармакопеи РФ.

Третий блок представляет собой систему, которая сохраняет параметры химического и микробиологического состава, полученные во втором блоке, и распределяет воду по местам потребления – это система хранения и/или распределения. В случае потреблений ВФН сразу в момент получения (из трубопровода), система именуется системой распределения, и требования по хранению на нее не распространяются, в частности требования по температуре.

Ниже приводятся примеры схем такой организации СВП.

На рисунке 1 приведена схема получения ВФН мембранными методами в системе с циркуляцией. Блок 1 представляет собой систему получения питьевой воды с корректированным составом. Блок 2 – систему получения ВФН.

На рисунке 2 приведена схема получения ВФН, в частности ВДИ мембранными методами в системе с циркуляцией. Блок 1 представляет собой систему получения питьевой воды с корректированным составом, отличающуюся отсутствием фильтра умягчителя, вместо которого организовано дозирование антискаланта (поз. 3). Блок 2 представляет систему получения ВФН.

На рисунке 3 приведена схема получения ВФН (кроме воды для гемодиализа) мембранными методами в системе с циркуляцией. Блок 1 представляет собой систему получения питьевой воды с корректированным составом, отличающийся отсутствием фильтров умягчителя и угольного, вместо которых организовано дозирование антискаланта и метабисульфита натрия (поз. 2, 3). Блок 2 – систему получения ВФН.

На рисунке 4 приведена схема получения ВФН мембранными методами в системе с циркуляцией. Блок 1 представляет собой систему получения питьевой воды с корректированным составом, отличающийся полным отсутствием классических засыпных фильтров, вместо которых работает Установка ультрафильтрации (может быть выполнена в моноблочном дизайне с установкой обратного осмоса). Такая схема обеспечивает максимальную защиту от микробиологической контаминации Блока 2 системы получения ВФН.

Следует учитывать, что на рисунках 1–4 показано не все вспомогательное оборудование, например, важным этапом обработки воды в Блоке 2, перед установкой обратного осмоса, является удаление углекислоты, которое может осуществляться на модулях мембранной дегазации или путем дозирования щелочи до pH (8,3–8,6), такой прием позволяет резко повысить электрическое сопротивление воды за счет связывания углекислоты в ионную форму (гидрокарбонаты) и последующего улавливания на мембранах обратного осмоса. На рисунках 1–4 на последней стадии присутствует ультрафильтр, однако, он может находиться и в системе хранения и распределения, тогда в схеме получения, он отсутствует.

Стандартом определены границы каждого блока. Блок предварительной подготовки воды – начало от отсечной арматуры трубопровода питьевой воды централизованного водоснабжения, направляющей воду в СВП до границы первой единицы оборудования второго блока (не включая его).

Блок Получение ВФН – начало границы фиксируется на первой арматуре устройства для финишной корректировки солевого или микробиологического состава воды, конец на арматуре направляющей воду в систему хранения и/или распределения, клапан сброса не кондиционной ВФН также входит в блок получения ВФН.

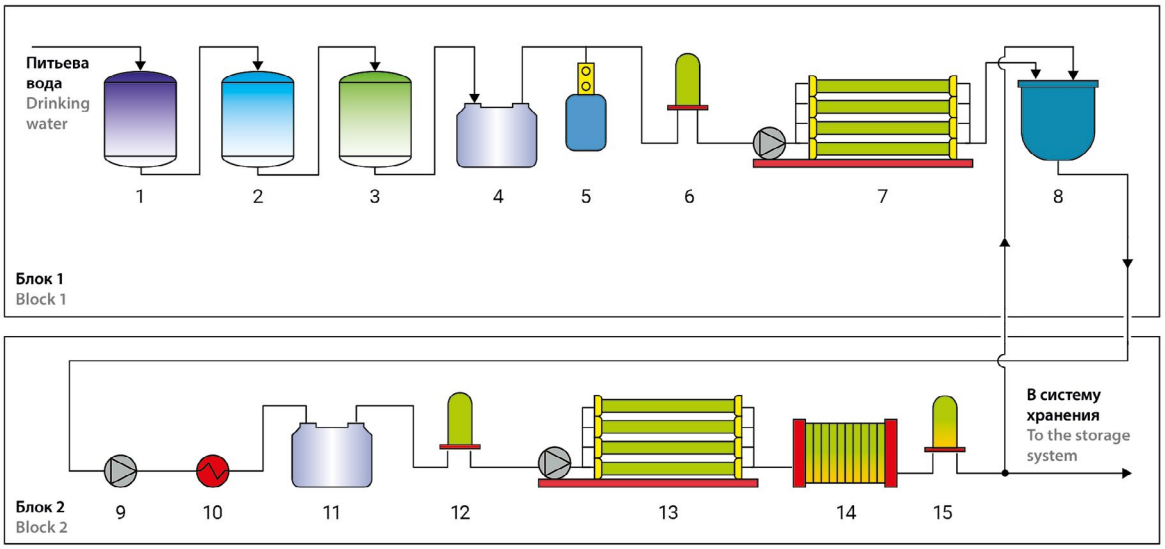


Рисунок 1. **Пример организации схемы получения ВФН**

Обозначения:
1 – фильтр с зернистой загрузки для удаления взвешенных веществ (гидроантрацит, песок, каталитическая загрузка и т. п); 2 – фильтр умягчения воды; 3 – фильтр с активированным углем; 4, 11 – УФ-лампа проточного типа; 6, 12, 15 – механический фильтр с рейтингом не хуже 5 мкм; 5 – станция дозирования щелочи; 7, 13 – установка обратного осмоса (одно- или двух ступенчатая); 8 – емкость обратноосмотической воды; 9 – насосная установка; 10 – теплообменник охлаждающий; 14 – установка электродеионизации воды (может быть совмещена в одно изделие с поз. 13)

Figure 1. **An example of organizing a scheme for obtaining a VFN**

Designations:
1 – multi-layer filter to remove suspended solids (hydroanthracite, sand, catalytic load, etc.); 2 – water softening filter; 3 – filter with activated carbon; 4, 11 – flow UV lamp; 6, 12, 15 – filter with a rating of at least 5 microns; 5 – alkali dosing station; 7, 13 – reverse osmosis (one- or two-stage); 8 – tank of reverse osmosis water; 9 – pumping unit; 10 – cooling heat exchanger; 14 – module electrodeionization (can be combined into one product with item 13)

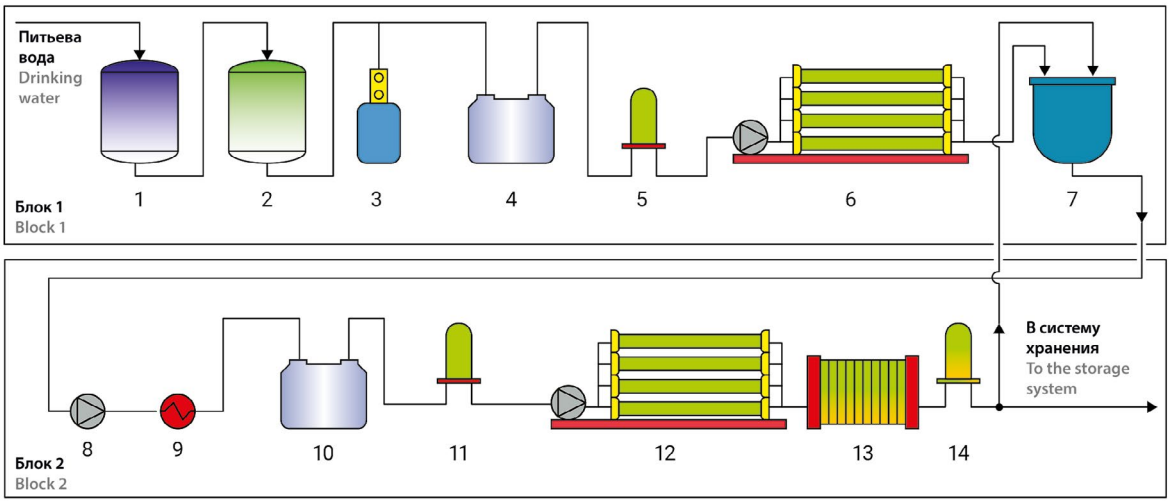


Рисунок 2. **Пример организации схемы получения ВФН, с дозированием антискаланта.**

Обозначения:
1 – фильтр с зернистой загрузки для удаления взвешенных веществ; 2 – фильтр с активированным углем; 3 – станция дозирования ингибитора отложений (антискалант); 4, 10 – УФ-лампа проточного типа; 5, 11 – механический фильтр с рейтингом не хуже 5 мкм; 6, 12 – установка обратного осмоса (одно- или двух ступенчатая); 7 – емкость обратноосмотической воды; 8 – насосная установка; 9 – теплообменник охлаждающий; 13 – установка электродеионизации воды (может быть совмещена в одно изделие с поз. 13); 14 – ультрафильтр с рейтингом не менее 15 кДа (для получения ВДИ)

Figure 2. **An example of the organization of the scheme for obtaining VFN, with dosing of the antiscalant.**

Designations:
1 – multi-layer filter to remove suspended solids; 2 – filter with activated carbon; 3 – dosing station for scale inhibitor (antiscalant); 4, 10 – flow UV lamp; 5, 11 – filter with a rating of at least 5 microns; 6, 12 – reverse osmosis (one- or two-stage); 7 – tank of reverse osmosis water; 8 – pumping unit; 9 – cooling heat exchanger; 13 – module electrodeionization (can be combined into one product with item 13); 14 – ultrafilter with a rating of at least 15 kDa (for obtaining WFI)

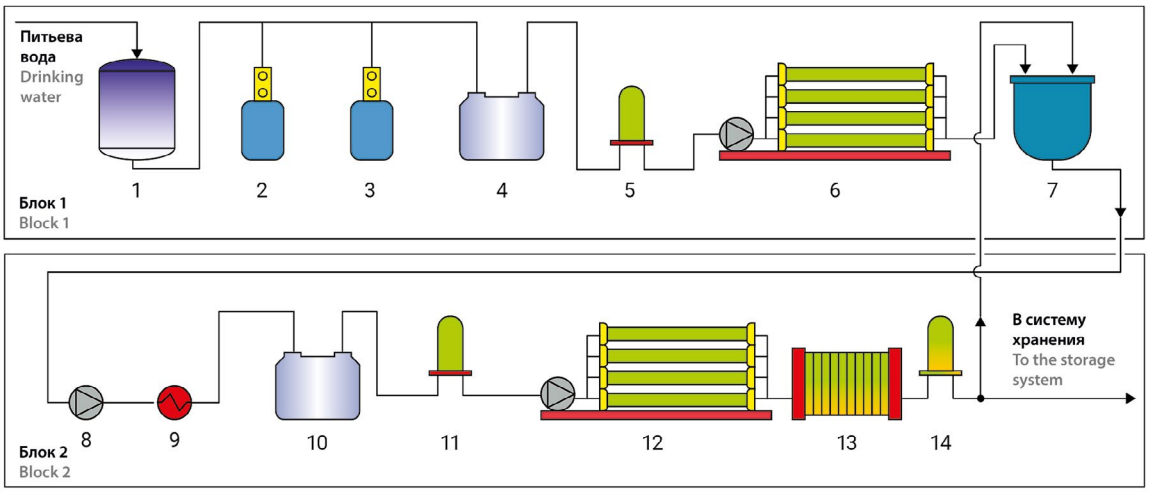


Рисунок 3. **Пример организации схемы получения ВФН (кроме воды для гемодиализа), с дозированием антискаланта.**

Обозначения:
1 – фильтр с зернистой загрузки для удаления взвешенных веществ; 2 – станция дозирования ингибитора отложений (антискалант); 3 – станция дозирования метабисульфита натрия; 4, 10 – УФ-лампа проточного типа; 5, 11 – механический фильтр с рейтингом не хуже 5 мкм; 6, 12 – установка обратного осмоса (одно- или двух ступенчатая); 7 – емкость обратноосмотической воды; 8 – насосная установка; 9 – теплообменник охлаждающий; 13 – установка электродеионизации воды (может быть совмещена в одно изделие с поз. 13); 14 – ультрафильтр с рейтингом не менее 15 кДа (для получения ВДИ)

Figure 3. **An example of the organization of the scheme for obtaining VFN (except for water for hemodialysis), with dosing of antiscalant.**

Designations:
1 – multi-layer to remove suspended solids; 2 – dosing station for scale inhibitor (antiscalant); 3 – dosing station for sodium metabisulphite; 4, 10 – flow UV lamp; 5, 11 –filter with a rating of at least 5 microns; 6, 12 – reverse osmosis (one- or two-stage); 7 – tank of reverse osmosis water; 8 – pumping unit; 9 – cooling heat exchanger; 13 – module electrodeionization (can be combined into one product with item 13); 14 – ultrafilter with a rating of at least 15 kDa (for obtaining WFI)

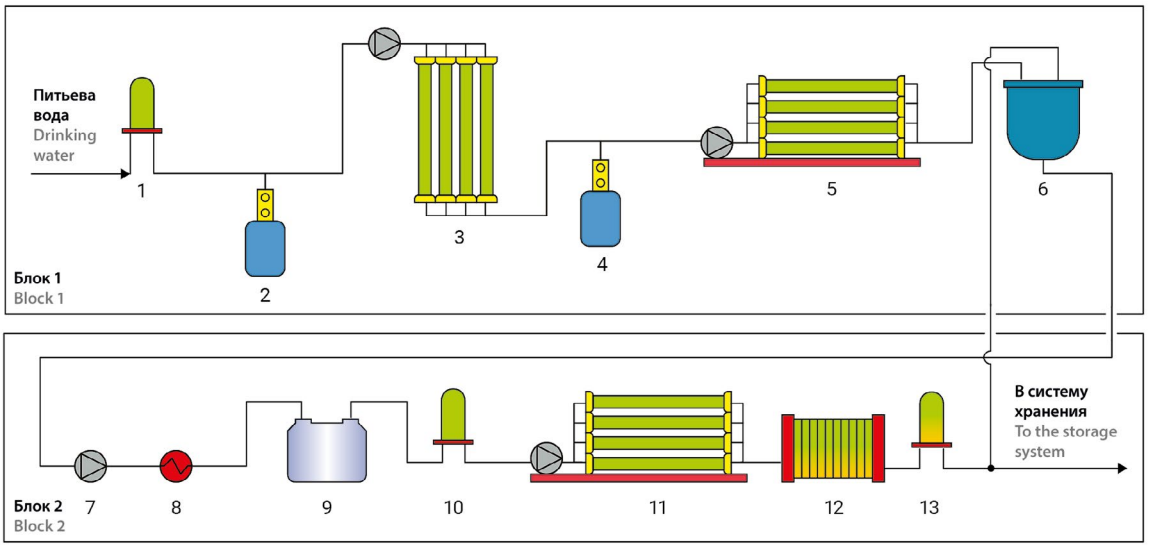


Рисунок 4. **Пример организации схемы получения ВФН кроме воды для гемодиализа), интегрированная мембранная система.**

Обозначения:
1 – фильтр -сетка 90–150 мкм; 2 – станция дозирования гипохлорита натрия / метабисульфита натрия; 3 – установка ультрафильтрации; 4 – станция дозирования метабисульфита натрия / ингибитора солевых отложений; 5, 11 – установка обратного осмоса; 6 – емкость обратноосмотической воды; 7 – насосная установка; 8 – теплообменник охлаждающий; 9 – УФ-лампа проточного типа; 10 – механический фильтр с рейтингом не хуже 5 мкм; 12 – установка электродеионизации воды (может быть совмещена в одно изделие с поз. 13); 13 – ультрафильтр с рейтингом не менее 15 кДа (для получения ВДИ)

Figure 4. **An example of the organization of the scheme for obtaining VFN except for water for hemodialysis), an integrated membrane system.**

Designations:
1 – filter 90–150 μm; 2 – dosing station for sodium hypochlorite / sodium metabisulphite; 3 – ultrafiltration unit; 4 – dosing station for sodium metabisulphite / scaling inhibitor; 5, 11 – reverse osmosis ; 6 – tank of reverse osmosis water; 7 – pumping unit; 8 – cooling heat exchanger; 9 – flow UV lamp; 10 – filter with a rating of at least 5 microns; 12 – module electrodeionization (can be combined into one product with item 13); 13 – ultrafilter with a rating of at least 15 kDa (for obtaining WFI)

Блок хранения и распределения ВФН – началом является резервуар хранения ВФН, в случае его отсутствия, границей начала является участок окончания оборудования второго блока, а окончанием – место возврата ВФН в СВП для осуществления рециркуляции или/и точки подачи воды потребителю.

Четкое определение границ блока имеет важное значение с точки зрения надзора за организацией работы каждого блока, а также требований к проектированию и материалам.

Требования к проектированию блока предварительной подготовки питьевой воды (блок 1 рисунки 1–4) для получения воды фармацевтического назначения (ВФН) определяются национальным санитарным и строительным законодательством в области централизованного водоснабжения населенных мест питьевой водой с дополнительным требованием получения воды определенного качества (приведено в таблице 1). Таким образом материалы и технологии подготовки воды в блоке предварительной подготовки должны соответствовать национальному санитарному законодательству в области централизованного водоснабжения населенных мест питьевой водой[1, 2].

Все проектные решения при конструировании блоков непосредсвенного получения и системы хранения и распределения ВФН должны быть проверены на выполнение 3 критериев: исключение застойных (не промываемых потоком воды) зон; обеспечение полного опорожнение воды из любого участка блока, трубопровода и исключение или минимизация влияния конструктивных решений, способствующих закреплению и росту биопленки: например, контактирующие с ВФН резьбовые соединения, не санитарные схемы уплотнения, и соединения гибких подводок, поверхность без склонности к прикреплению к ней микрофлоры. Критерий исключения застойных зон должен проверяться Правилом 2D для блока хранения и распределения ВФН и 3D для блока непосредсвенного получения ВФН. А для трубопроводов, системы хранения и распределения в режиме хранения должен выполняться критерий турбулентного потока со значением числа Рейнольдса не менее 10 000. В режиме раздачи ВФН требования к турбулентности не применимы. Линейная скорость не является критерием исключения застойных зон.

Температура воды в блоке хранения и распределения ВФН не должна быть выше 25 °С при холодном способе хранения, а при горячем должна быть не ниже 65 °С. Не рекомендуется превышать значение 80 °С температуры хранения. При этом в случае холодного хранения должны быть предусмотрены дополнительные меры по микробиологической стабилизации воды, например, одно или несколько из перечисленных ниже, но не ограничено ими: хранение с добавлением озона от 0,05 мг/л, использование УФ-ламп в петле циркуляции и/или емкости, снижение температуры воды до 5–7 °С, потребление в момент получения, а также другие доступные методы сдерживания роста микроорганизмов.

Выбор способа хранения и получения ВФН определяется тем, при какой температуре потребляется большая часть воды, если горячий, то горячее хранение, если холодной или захоложенной то холодное хранения или низкотемпературное хранение 5–7 °С.

При организации схем санитарной обработки блоков СВП следует руководствоваться таблицей № 2, в которой приведены способы санитарной обработки. Для Блока хранения и распределения ВДИ следует предусматривать не мене 2 способов проведения санитарной обработки, для остальных достаточно одного.

Таблица 2. Рекомендуемые способы санации блоков СВП

Table 2. Recommended methods of sanitation of SVP blocks

Блок СВП SVP block	**Пар (121 °С)** Steam (121 °С)	**Горячая вода (80 °С)** Hot water (80 °С)	**Дробная санация[1] дезинфектантом** Fractional sanitation[1] with disinfectant	**Однократная санация дезинфектантом** One-time sanitation with a disinfectant	**Обработка озоном 0,2 мг/л в воде** Ozone treatment 0.2 mg/l in water
Предварительная подготовка Pretreatment of water	–	–	+	+	+
Получение ВФН Production WFI	–	+	+	–	+
Хранение и распределение ВФН Storage and distribution of WFI	+	+	+	–	+

Примечание. [1] Дробная санация – это троекратно проведенная санация с интервалом в 12–24 часа.

Note. [1] Fractional sanitation is a sanitation performed three times with an interval of 12–24 hours.

[1] СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

[2] СанПиН 1.2.3685-21 СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания».

Предпочтительный режим работы СВП – непрерывный. В случае перерывов в потреблении воды следует закольцовывать блок получения ВФН или организовывать сброс объема, составляющего блок СВП, каждые 30 мин. Отсутствие одномоментных простоев СВП более 30 минут – критерий непрерывности работы СВП.

Температура штатной санации систем горячего хранения должна быть на 20 °С выше значения температуры верхнего предела хранения, но не более 95 °С. Санация перегретой водой и паром при штатной работе блоков (п.4.2.2, 4.2.3) не рекомендуется, поскольку в таком случае плохой гигиенический дизайн или другие недостатки системы маскируются постоянными санациями, а также ускоряется износ оборудования.

Температура санации систем холодного хранения должна быть выполнена горячей водой с температурой 80 +/– 1 °С в самой отдаленной точке системы.

Санация перегретой водой 121 °С должна быть обоснована, например, после длительного простоя, обнаружения термофильных микроорганизмов в системе, загрязнения системы питательными растворами, первичном запуске системы или в случае, когда штатная санация горячей водой показала свою неэффективность.

Санация системы хранения и распределения паром (121 °С) не рекомендуется.

Спецификация качества воды фармацевтического назначения с учетом способа получения ВФН должна быть не хуже рекомендуемых значений по показателям: электропроводности и значения ООУ, приведенным в таблице 3.

Способы организации хранения, в качестве примеров и не ограничено ими, приведены на рисунках 5–6.

На рисунке 5 приведена схема получения ВДИ из ВО на ультрафильтрационном керамическом элементе, выдерживающем обработку горячей водой со степенью отсечки не хуже 15 кДа. Полученная ВДИ направляется в точки потребления, не востребованный поток возвращается в емкость ВО. Система может функционировать при комнатной температуре, с периодическими санациями горячей водой или все время в горячем состоянии с температурой 60 °С. Также возможен вариант хранения в присутствии озона.

На рисунке 6 приведена схема, аналогичная рисунку 5, при этом контур ВДИ выделен в отдельную субпетлю, что позволяет одновременно потреблять ВО и ВДИ. Представленная схема подразумевает хранение под озоном и периодическую тепловую санацию, однако снабдив контур охлаждающим или греющим теплообменником, возможны варианты холодного (менее 5 °С) и горячего хранения (60 °С).

На рисунке 7 приведена схема хранения и распределения ВДИ/ВО (в зависимости от того какая вода подается на наполнение емкости) под озоном. В системе также предусмотрена периодическая тепловая санация. Хранение и потребление происходит при комнатной температуре. Для разрушения остаточного озона используется мощная УФ-лампа.

На рисунке 8 приведена схема хранения и распределения ВДИ/ВО (в зависимости от того какая вода подается на наполнение емкости) с субконтуром холодного хранения. Хранение и потребление в основной петле происходит в горячем (60 °С) виде. В субконтуре вода ВФН охлаждается и циркулирует в холодном состоянии (<25 °С), пополнение субконтура происходит из основного контура по мере просадки давления. Периодически охлаждение субконтура отключается, и проводят тепловую санацию отдельным теплообменником.

Таблица 3. Рекомендуемые значения по показателям: электропроводности и значения ООУ в различных точках СВП

Table 3. Recommended values for indicators: electrical conductivity and TOC values at various points of the SVP

Способ получения How to obtain	**Электропроводность** Electrical conductivity	**Общий органический углерод, мкг/л** Total organic carbon, μg/l	**Примечание** Note
После установки обратного осмоса второго блока After reverse osmosis	<2 мкСм/см, при 25 °С <2 μS/cm at 25 °C	<500	
После финишного обессоливания второго блока After final desalination of the second block	>10 МОм/см, при 25 °С >10 MΩ/cm, at 25 °C	<200	В случае если в схеме есть электродеионизация If the circuit has electrodeionization
В начале петли хранения At the beginning of the storage loop	Согласно спецификации ВФН According to the VFN specification	<200	Может быть достигнуто за счет обработки УФ-излучением на длине волны 185 нм или обработки озоном Can be achieved by 185 nm UV treatment or ozone treatment

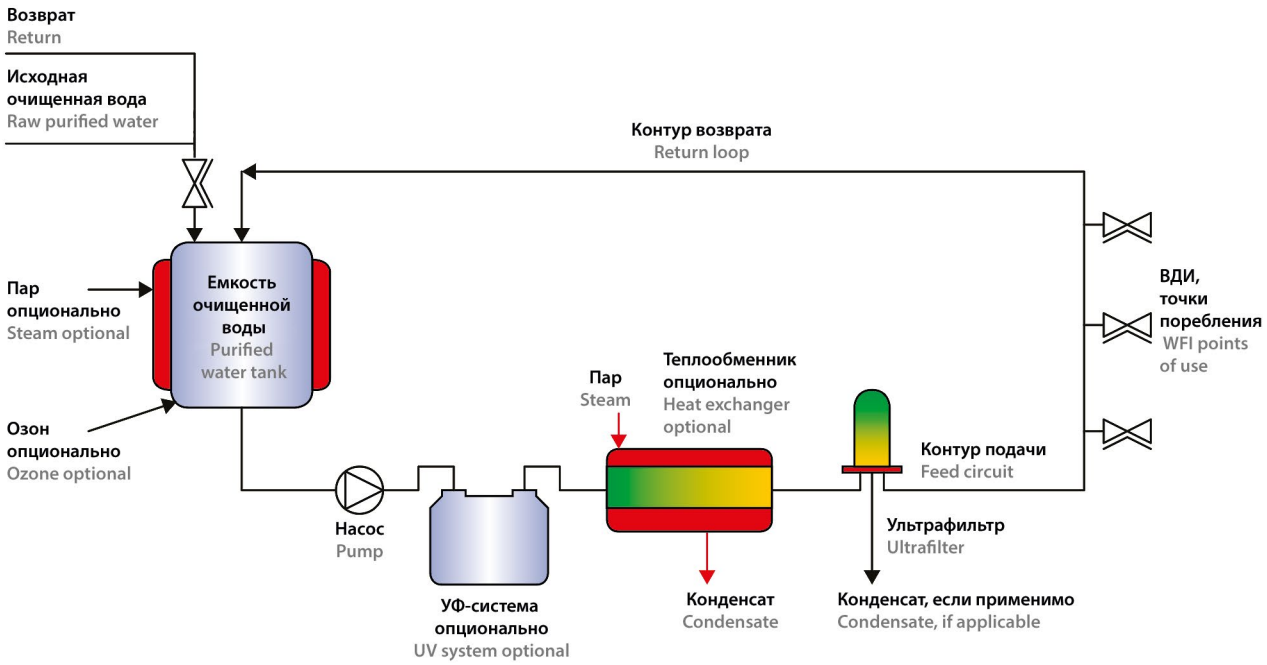


Рисунок 5. **Система получения ВДИ и хранения ВО**

Figure 5. **System for obtaining VDI and storing VO**

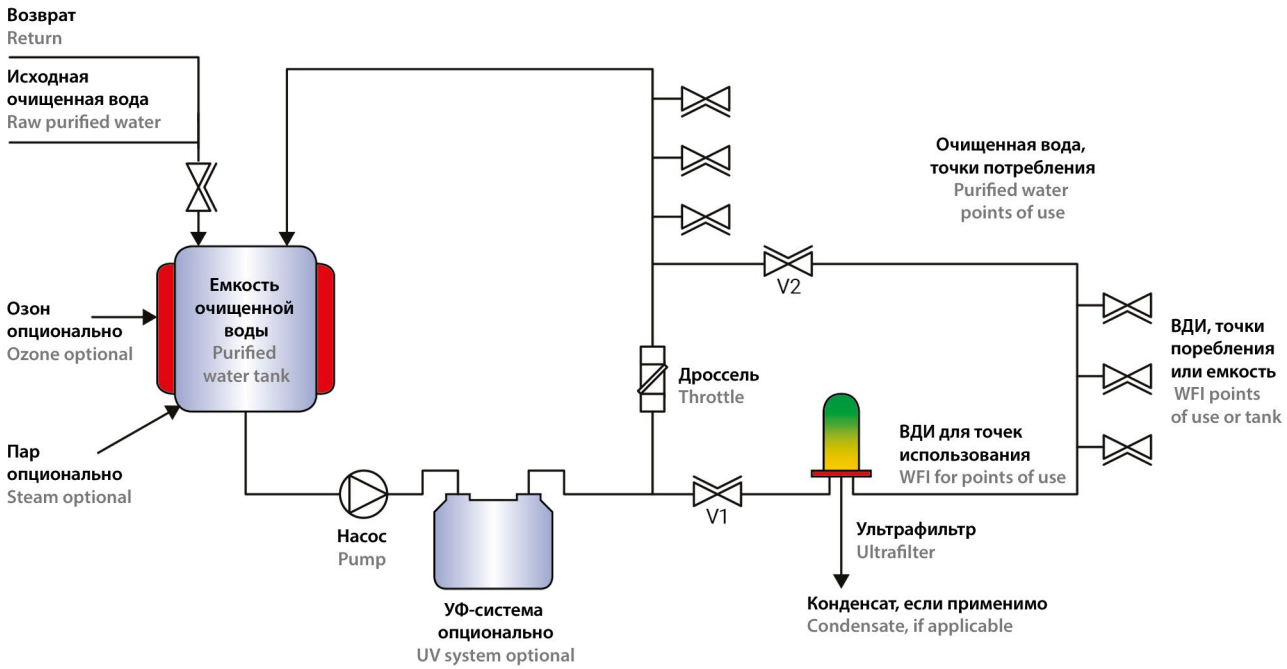


Рисунок 6. **Система получения и распределения ВДИ, распределения и хранения ВО**

Figure 6. **System for obtaining and distributing VDI and distributing and storing VO**

Все схемы хранения и распределения, содержащие ультрафильтр (15 кДа), предполагают что таковой отсутствует в системе получения ВДИ, если он отсутствует на схеме получения, то предполагается, что он встроен в систему хранения и распределения ВДИ.

В статье представлены основные положения проекта стандарта ГОСТ Р «Получение, хранение и распределение воды фармацевтического назначения. Вода очищенная и вода для инъекций», ключевой идеей стандарта является разграничение блоков системы предварительной подготовки частично

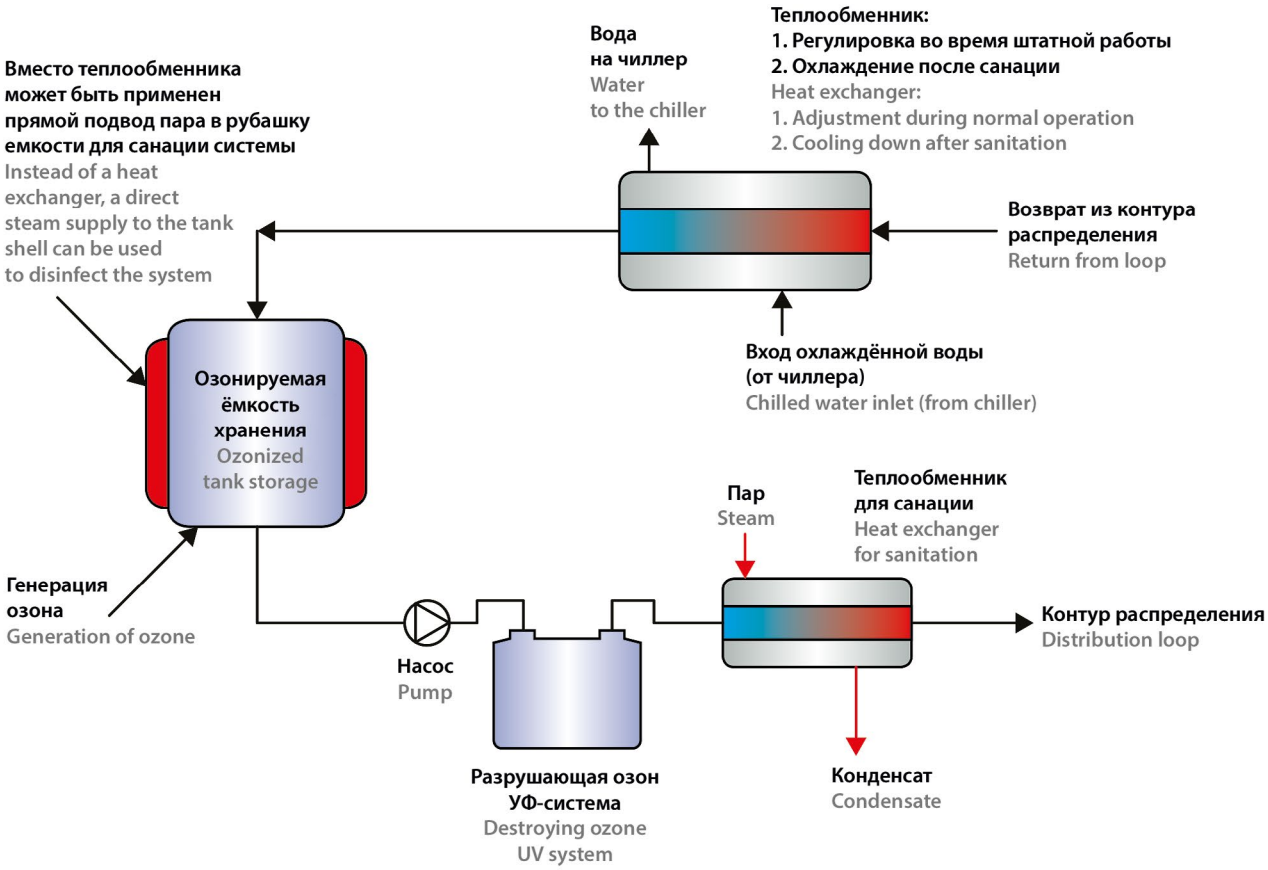


Рисунок 7. **Система хранения и распределения ВДИ/ВО под озоном**

Figure 7. **WFI/BO storage and distribution system under ozone**

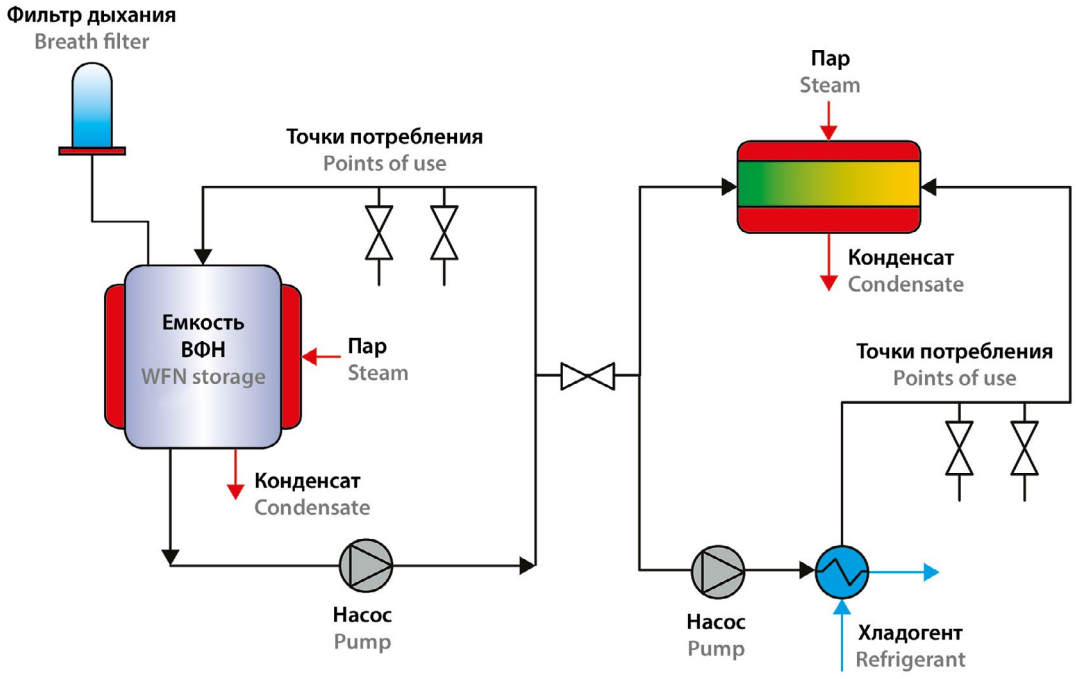


Рисунок 8. **Система хранения и распределения ВДИ, работающая в горячем режиме с охлаждаемым субконтуром ВДИ (охлаждение в моменты потребления)**

Figure 8. **WFI storage and distribution system operating in hot mode with a cooled WFI subloop (cooling at points of consumption)**

обессоленной воды (питьевая вода с корректированным составом), блока непосредственного получения ВФН, блока системы хранения и распределения ВФН. К каждому блоку предъявляются свои требования, сообразно их назначению. Блок предварительной подготовки (блок 1) проектируется согласно принципам получения питьевой воды и должен контролироваться санитарным законодательством. Для обеспечения надлежащей эксплуатации этой части СВП он должен быть поддержан планом производственного контроля, также должны быть соблюдены требования строительных норм и правил[1, 2, 3]. Таким образом, в качестве исходной воды для получения ВФН предлагается использовать питьевую воду с корректированным составом. Что повышает надежность работы самой системы получения ВФН, а также снимает избыточные требования к организации системы предварительной подготовки, такие как термическая санация, материалы исполнения. Требования гигиенического дизайна[4, 5] начинают действовать там, где это действительно необходимо, непосредственно в системе получения ВФН и системе хранения и распределения ВФН. Также стандартом идентифицируются важнейшие принципы сдерживания микробиологического роста, это проточность системы и максимальная чистота воды. В результате реализации стандарта стоимость систем получения ВФН уменьшается за счет реализации гигиенического дизайна там, где это нужно, надежность работы СВП увеличивается за счет достижения более высокого качества воды на каждом этапе.

[1] СП 347.1325800.2017 Свод правил. Внутренние системы отопления, горячего и холодного водоснабжения. Правила эксплуатации.

[2] СП 30.13330.2016 Свод правил. Внутренний водопровод и канализация зданий.

[3] СП 31.13330.2021 Свод правил. Водоснабжение. Наружные сети и сооружения.

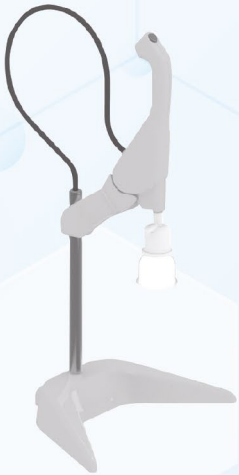
[4] ASME BPE-2019. Bioprocessing Equipment.

[5] ISO 22519:2019 Membrane-based generation of water for injection (WFI) (Ch. 8.a, b).

МЕДИАНА ФИЛЬТР
25 лет

ВОДОПОДГОТОВКА И ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ ОТ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

- Вода очищенная
- Вода для инъекций
  - Многоколонные дистилляторы
  - Мембранные установки
- Чистый пар
- Раздача чистых сред
- Технологические трубопроводы
- Услуги по проектированию и валидации (DQ, IQ/OQ, PQ)



Аквалаб – вода для лабораторий

специальное решение по замене импортных систем очистки воды

- Получение сверхчистой воды 18,18 МОм*см из водопроводной
- Широкий модельный ряд для получения воды требуемого класса чистоты
- Энерго- и ресурсоэффективность
- Компактность
- Простота обслуживания и эксплуатации

АО «НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ МЕДИАНА-ФИЛЬТР»
105318, г. Москва, ул. Ткацкая, д. 1
+7 (495) 660-07-71
info@mediana-filter.ru

GMP Certified Producer
ISPE

Информационная статья / Informational 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 в конгресс-центре Сеченовского Университета. Тематика мероприятия традиционно охватывает все жизненные этапы лекарственного средства, начиная от разработки и заканчивая пострегистрационными исследованиями ЛС.

Congress "Chemical-pharmaceutical and Biological Preparations: Pharmaceutical and Clinical Development in Accordance with the Rules of the EAEU"

The Congress "Chemical and Biological Drugs: Pharmaceutical and Clinical Development in Accordance with the EAEU rules" will be held in Moscow on September 22 at the Sechenov University Congress Center. The theme of the event traditionally covers all life stages of a medicinal product, from development to post-registration studies of drugs.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Приглашаем Вас на традиционное мероприятие, организованное научно-производственным журналом «Разработка и регистрация ЛС» и Центром Фармацевтической Аналитики. Конгресс «Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС» пройдет в Москве 22 сентября в очном формате.

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.

Когда: 22 сентября 2023 года

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

Подробности и регистрация на сайте Конгресса:

В рамках предстоящего конгресса мы поговорим про разработку лекарственных средств, в том числе про поиск новых природных соединений для фармацевтической разработки, а также клиническую разработку биосимиляров. С коллегами из Минздрава РФ мы обсудим вопросы современного состояния регуляторной практики – от разработки до регистрации.

Так в своем докладе ректор Пермской государственной фармацевтической академии МЗ РФ **Лужанин Владимир Геннадьевич** затронет тему методологии поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ природного происхождения, методов оценки фармакологической активности малых количеств действующих веществ, анализа структура-активность.

В секции, посвященной исследованиям лекарственных средств, мы рассмотрим алгоритмы исследования фармакокинетических параметров в ДКИ в рамках реализации стратегии Фарма-2020, новые подходы к процедуре биовейвер и многие другие не менее актуальные темы.

Будут также представлены секции, посвященные вопросам химико-аналитических исследований, технологии лекарственных средств, надлежащим практикам и регуляторным вопросам.

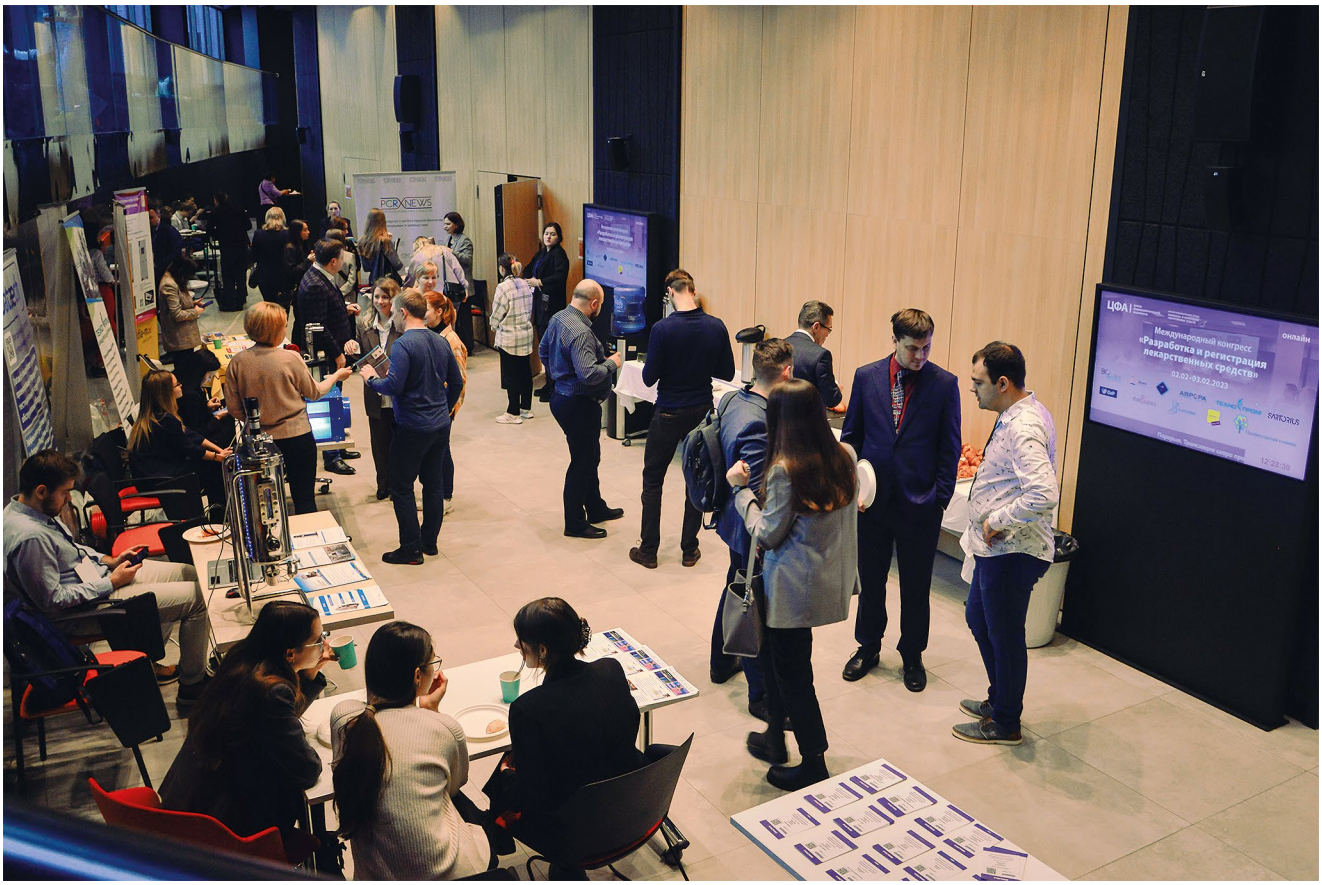
До встречи на мероприятии!

Программа мероприятия доступна по ссылке:

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.

В конгрессе принимают участие представители Минздрава РФ, ЕЭК, Сеченовского университета, Пермской государственной фармацевтической академии МЗ РФ, Статэндокс, Нанолек, Герофарм и другие не менее уважаемые спикеры.



https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-29-40
УДК 615.322:547.567.2

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Способ получения тимохинона из жирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.)

А. К. Уэйли[3], Е. В. Бурцева[1, 2], Е. В. Кулдыркаева[1], А. С. Новосад[1], Н. Л. Бабак[1], Е. В. Жохова[3], А. О. Уэйли[3], М. Ю. Гончаров[3], И. И. Тернинко[3]✉, Г. П. Яковлев[3]

[1] Акционерное Общество «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод», 298500, Россия, Республика Крым, г. Алушта, ул. 15-го Апреля, д. 37
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (КФУ им. В. И. Вернадского), 295007, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, просп. Академика Вернадского, д. 4
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ **Контактное лицо:** Тернинко Инна Ивановна. **E-mail:** inna.terninko@pharminnotech.com

ORCID: А. К. Уэйли – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924; Е. В. Бурцева – https://orcid.org/0000-0002-5418-7849;
Е. В. Кулдыркаева – https://orcid.org/0000-0003-0864-476X; А. С. Новосад – https://orcid.org/0000-0001-7167-4609;
Н. Л. Бабак – https://orcid.org/0000-0002-2127-2457; Е. В. Жохова – https://orcid.org/0000-0002-9763-096X;
А. О. Уэйли – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; М. Ю. Гончаров – https://orcid.org/0000-0002-9706-9850;
И. И. Тернинко – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015; Г. П. Яковлев – https://orcid.org/0009-0009-4570-2739.

Статья поступила: 04.04.2023 **Статья принята в печать:** 11.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон) – кристаллическое вещество растительного происхождения, которое образуется в результате процесса окисления тимогидрохинона. Тимохинон – компонент эфирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.), для которого установлен значительный спектр фармакологической активности. Учитывая липофильность данного соединения и его способность накапливаться в маслах, целесообразно предложить способ выделения тимохинона из жирного масла семян тмина для оценки его избирательного накопления и возможности применения масла в качестве источника получения.

Цель. Разработать способ выделения индивидуального соединения – тимохинона – из масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.), доказать его структуру и определить степень чистоты полученного вещества.

Материалы и методы. Для подтверждения подлинности сырья проводили изучение морфолого-анатомических диагностических признаков. Количественную оценку содержания тимохинона в семенах тмина и изучение оптимальности процесса выделения проводили методом ВЭЖХ. Пробоподготовку проводили метанолом путем: 1) трехкратной экстракции на кипящей водяной бане; 2) сонификации; 3) настаивания. Структуру выделенного соединения подтверждали по спектральным характеристикам методом ИК-спектроскопии путем сравнения полученного ИК-спектра с данными базы NIST и одномерной ЯМР-спектроскопии.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного морфолого-анатомического анализа была подтверждена подлинность семян *N. sativa*. Методом ВЭЖХ проанализированы полученные различными способами пробоподготовки извлечения из семян тмина черного. Отмечено, что способ получения извлечения не оказывает значительного влияния на выход тимохинона, содержание которого в семенах тмина черного составляет 0,25 ± 0,02 %, что достаточно для целей выделения. Результаты оценки различных способов выделения тимохинона из семян тмина черного – экстракция спиртом и *н*-гексаном из измельченных семян, жидкость-жидкостная экстракция из жирного масла, перегонка масла с водяным паром – показали, что оптимальным способом получения тимохинона является перегонка масла семян тмина черного с водяным паром [соотношение масло : вода (1 : 1)] на песчаной бане в течение 3 часов. Выход тимохинона из масла N. sativa при этом составляет 398 мг из 150 мл масла (0,26 %). Идентичность тимохинона доказана по спектральным характеристикам в сравнении с базой данных NIST.

Заключение. Показана возможность выделения тимохинона из жирного масла семян *Nigella sativa* L. с хроматографической чистотой (метод ВЭЖХ) более 97 % и сопоставимостью спектральных характеристик, которые подтверждают идентичность полученного соединения. Предложенный экспрессный и экономичный способ выделения тимохинона методом перегонки с водяным паром обеспечивает выход целевого компонента 0,26 %. Данный способ может быть применен на производственных площадках предприятий по заготовке и переработке семян тмина черного для получения природного тимохинона.

Ключевые слова: *Nigella sativa* L., тимохинон, выделение индивидуального соединения, перегонка с водяным паром, спектральные методы анализа, жирное масло

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

Вклад авторов. А. К. Уэйли отвечал за дизайн эксперимента, обработку и интерпретацию полученных данных. А. О. Уэйли и М. Ю. Гончаров осуществили выделение тимохинона из масла семян тмина черного и проведение спектральных испытаний для установления структуры полученного соединения. Е. В. Жохова и Г. П. Яковлев осуществили проведение микроскопического исследования семян тмина и обработку полученного материала. И. И. Тернинко провела литературный поиск методики количественной оценки тимохинона в семенах тмина черного. Е. В. Кулдыркаева, А. С. Новосад и Н. Л. Бабак осуществили получение объектов исследования, подготовку проекта рукописи, литературный поиск по научному направлению и редакторские правки. Е. В. Бурцевой принадлежит научная идея и окончательная корректура статьи.

© Уэйли А. К., Бурцева Е. В., Кулдыркаева Е. В., Новосад А. С., Бабак Н. Л., Жохова Е. В., Уэйли А. О., Гончаров М. Ю., Тернинко И. И., Яковлев Г. П., 2023
© Whaley A. K., Burtseva Y. V., Kuldyrkaeva E. V., Novosad A. S., Babak N. L., Zhokhova E. V., Whaley A. O., Goncharov M. Yu., Terninko I. I., Yakovlev G. P., 2023

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

Для цитирования: Уэйли А. К., Бурцева Е. В., Кулдыркаева Е. В., Новосад А. С., Бабак Н. Л., Жохова Е. В., Уэйли А. О., Гончаров М. Ю., Тернинко И. И., Яковлев Г. П. Способ получения тимохинона из жирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):29–40. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-29-40

A Method for the Isolation of Thymoquinone from Black Caraway Seed Oil (*Nigella sativa* L.)

Andrey K. Whaley[3], Yelena V. Burtseva[1, 2], Ekaterina V. Kuldyrkaeva[1], Alexander S. Novosad[1], Nikolay L. Babak[1], Elena V. Zhokhova[3], Anastasiya O. Whaley[3], Mikhail Yu. Goncharov[3], Inna I. Terninko[3] ✉, Gennadiy P. Yakovlev[3]

[1] JSC "Alushta essential oil state farm-plant", 37, April 15th str., Alushta, Republic of Crimea, 298500, Russia
[2] V. I. Vernadsky Crimean Federal University, 4, Academician Vernadsky avenue, Simferopol, Republic of Crimea, 295007, Russia
[3] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Inna I. Terninko. **E-mail:** inna.terninko@pharminnotech.com

ORCID: Andrey K. Whaley – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924; Yelena V. Burtseva – https://orcid.org/0000-0002-5418-7849; Ekaterina V. Kuldyrkaeva – https://orcid.org/0000-0003-0864-476X; Alexander S. Novosad – https://orcid.org/0000-0001-7167-4609; Nikolay L. Babak – https://orcid.org/0000-0002-2127-2457; Elena V. Zhokhova – https://orcid.org/0000-0002-9763-096X; Anastasiya O. Whaley – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; Mikhail Yu. Goncharov – https://orcid.org/0000-0002-9706-9850; Inna I. Terninko – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015; Gennadiy P. Yakovlev – https://orcid.org/0009-0009-4570-2739.

Received: 04.04.2023 **Revised:** 11.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone) is an organic compound of plant origin, which is formed as a result of the oxidation of thymohydroquinone. Thymoquinone is a component of the essential oil of black caraway seeds (*Nigella sativa* L.) and is known to possess a significant spectrum of pharmacological activity. Due to the lipophilicity of thymoquinone and its ability to accumulate in oils, we proposed a method to isolate thymoquinone from the fatty oil of caraway seeds in order to assess its selective accumulation and the possibility of using the oil as a source for the compounds production.

Aim. Method development for the isolation of thymoquinone as an individual compounds from black caraway (*Nigella sativa* L.) seed oil, to confirm its structure and determine the degree of purity of the obtained substance.

Materials and methods. To confirm the authenticity of the raw materials, analysis of key morphological and anatomical diagnostic features was performed. Quantitative assessment of thymoquinone content in black caraway seeds and control of the isolation process were performed though HPLC analysis. Sample preparation was carried out with methanol by: 1) triple extraction on a boiling water bath; 2) sonification; 3) maceration.
The structure of the isolated compound was confirmed through the analysis spectral characteristics using IR spectroscopy by comparing the obtained IR spectrum with the data from the NIST database and one-dimensional NMR spectroscopy.

Results and discussion. As a result of the morphological and anatomical analysis, the authenticity of *N. sativa* seeds was confirmed. Extracts from black caraway seeds obtained by various sample preparation methods were analyzed with HPLC. As a result, it was noted that the method of obtaining the extract does not significantly affect the yield of thymoquinone, the content of which in black caraway seeds is 0.25 ± 0.02 %, which is sufficient for isolation purposes. Through the evaluation of various isolation methods for thymoquinone from black caraway seeds – maceration with alcohol and n-hexane from crushed seeds, liquid-liquid extraction from fatty oil, steam distillation of oil – showed that the best way to obtain thymoquinone is through the distillation of black caraway seed oil with water steam [oil : water ratio (1 : 1)] in a sand bath for 3 hours. The yield of thymoquinone from *N. sativa* oil is 398 mg from 150 ml of oil (0.26 %). The structure of thymoquinone was confirmed by spectral characteristics in comparison with the NIST database and literature data.

Conclusion. The possibility of isolating thymoquinone from *Nigella sativa* L. seed fatty oil with a chromatographic purity (HPLC) of more than 97 % along with the comparison of the isolated compounds spectral characteristics with literature data, which confirm the identity of the obtained compound, was shown. The proposed express and efficient method for the isolation of thymoquinone through steam distillation provides a yield of the target component of 0.26 %. This method can be applied at roduction sites that harvestand process of black caraway seeds to obtain natural thymoquinone.

Keywords: *Nigella sativa* L., thymoquinone, individual compound isolation, steam distillation, spectral methods of analysis, fatty oil

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 K. Whaley was responsible for the design of the experiment, processing and interpretation of the data obtained. Anastasiya O. Whaley and Mikhail Yu. Goncharov carried out the isolation of thymoquinone from black caraway seed oil and spectral tests to establish the structure of the resulting compound. Elena V. Zhokhova and Gennadiy P. Yakovlev carried out microscopic examination of caraway seeds and processed the material obtained. Inna I. Terninko conducted a literature search for the technique a quantitative assessment of thymoquinone in black caraway seeds. Ekaterina V. Kuldyrkaeva, Alexander S. Novosad and Nikolay L. Babak carried out the acquisition of plant material, the preparation of the draft manuscript, search of scientific literature, and editorial corrections. Yelena V. Burtseva generated the research idea and performed the final proofreading of the article.

Funding. The results of the work were obtained using equipment the Core Shared Research Facilities "Analytical Center" of the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-685; dated 26 July 2021 on the provision of the Federal budget grants).

For citation: Whaley A. K., Burtseva Y. V., Kuldyrkaeva E. V., Novosad A. S., Babak N. L., Zhokhova E. V., Whaley A. O., Goncharov M. Yu., Terninko I. I., Yakovlev G. P. A method for the isolation of thymoquinone from black caraway seed oil (*Nigella sativa* L.). *Drug development & registration*. 2023;12(3):29–40. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-29-40

ВВЕДЕНИЕ

Выделение биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья как с целью его маркирования и последующей персонифицированной стандартизации, так и для получения фармацевтических субстанций растительного происхождения (ФСРП) на сегодняшний момент приобретает все большее значение [1–2] ввиду, с одной стороны, ориентира потребителей на растительные субстанции и, с другой – необходимости подтверждения соответствия качества растительного объекта по индивидуальному соединению.

Тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон) – кристаллическое вещество с молекулярной формулой $C_{10}H_{12}O_2$, молекулярной массой 164,201 г/моль и с температурой плавления 45–46 °C, которое представляет собой природное соединение растительного происхождения, относящееся к классу монотерпеноидов (производное 1,4-бензохинона). Биосинтетически тимохинон образуется в результате процесса окисления молекулы-предшественника тимогидрохинона, который синтезируется из тимола или карвакрола. Описано содержание тимохинона (как компонента эфирного масла) в растениях *Monarda didyma* L., *Monarda media* Wild., *Monarda menthifolia*, *Satureja hortensis* L., *Satureja montana* L., *Thymus pulegioides* L., *Thymus serpyllum* L., *Thymus vulgaris* L. и *Nigella sativa* L. [3].

Тимохинон – компонент эфирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.), которые традиционно используются в странах Ближнего Востока и Юго-Восточной Азии в качестве пищевой культуры и, по данным P. M. Paarakh с соавт. [4], является мажорным соединением данного растения, тем самым обусловливая его выбор в качестве источника получения. Для тимохинона установлен значительный спектр фармакологической активности, включая противовоспалительную [5], антиоксидантную [6], антигистаминную [7], противоопухолевую [8], обезболивающую [9], гепатопротекторную [10], нейропротекторную [11], антибактериальную [12], инсектицидную [13], антиишемическую [14], лейшманицидную [15] и радиозащитную [16]. Есть данные о положительном влиянии тимохинона на течение болезни Альцгеймера [17]. Ряд исследователей [18–20] выявили молекулярные пути клеточных механизмов терапевтического действия тимохинона при лечении различных типов злокачественных опухолей. Тимохинон воздействует на множество молекулярных мишеней различными путями, а также проявляет свое действие через многие клеточные механизмы, такие как ингибирование пролиферации, индукция апоптоза, продукция активных форм кислорода (АФК), предотвращение ангиогенеза и клеточного метастазирования.

Существует ряд исследований [12, 18], посвященных вопросам выделения тимохинона из растительных объектов. Однако, учитывая липофильность данного соединения и его способность накапливаться в маслах, целесообразно было предложить способ выделения тимохинона из жирного масла семян тмина для оценки его избирательного накопления и возможности применения масла в качестве источника получения.

Цель работы: разработать способ выделения индивидуального соединения – тимохинона – из масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.), доказать его структуру и определить степень чистоты полученного вещества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена тмина черного заготавливали в период полной зрелости (август 2022 года) от культивированных на опытных участках-полях АО «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод (АЭС3)» (Россия) растений. Жирное масло получали способом холодного прессования на производственной площадке АО «АЭС3».

Для подтверждения подлинности сырья проводили изучение морфолого-анатомических диагностических признаков. Внешние признаки семян изучали на сухом материале, рассматривая их невооруженным глазом, а также с помощью лупы 10× и стереомикроскопа (8×, 16×, 32×) в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) РФ, ОФС.1.5.1.0008.15 «Семена». Изучение анатомо-диагностических признаков проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [21]. Препараты рассматривали при увеличении 80×, 200× и 800× на микроскопе цифровом тринокулярном Levenhuk D740T (Levenhuk, США). Микрофотографии препаратов были получены с помощью цифровой камеры Levenhuk 800M PLUS (максимальное разрешение 3264 × 2448 пикс., число мегапикселей – 8) и программного обеспечения LevengukLite (версия: ×64, 4.11.18709.20210403).

Количественную оценку содержания тимохинона в семенах тмина проводили методом ВЭЖХ с использованием оборудования LC-20 (Shimadzu, Япония). Пробоподготовку проводили 3 способами.

1. Около 1,0 г (точная навеска) измельченных (2–7 мм) семян тмина подвергали трехкратной экстракции метанолом на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Полученный раствор объединяли в мерной колбе объемом 50 мл, доводили до метки метанолом, фильтровали через фильтр «синяя лента». 1,0 мл раствора помещали в мерную колбу на 10 мл и доводили до метки растворителем (вода/ацетонитрил 50/50).
2. К 0,5 г (точная навеска) измельченных (2–7 мм) семян тмина добавляли последовательно 10, 10, 5 мл метанола, каждый раз обрабатывали извлечение на УЗ-бане (ООО «Сапфир», Россия) в течение 20 мин. Извлечение фильтровали через

фильтр «синяя лента», объединяли в мерной колбе объемом 25 мл, разбавляли в 10 раз растворителем (вода/ацетонитрил 50/50).

3. К 0,5 г (точная навеска) измельченных (2–7 мм) семян тмина добавляли 10 мл метанола, перемешивали 10 мин, раствор фильтровали через фильтр «синяя лента», доводили до метки в мерной колбе объемом 25 мл и затем разбавляли в 10 раз растворителем (вода/ацетонитрил 50/50).

Для количественной оценки тимохинона использовали метод внешнего стандарта (тимохинон, аналитический стандарт, Supelco, кат № 031416, без указания срока годности) с концентрацией стандартного раствора 10 мкг/мл. Анализ проводили в следующих хроматографических условиях:

Колонка	InterSil C18 (250×4.6, 5 µ) (Intersil Corporation, США)
Подвижная фаза (ПФ)	Вода/ацетонитрил 50/50 (ацетонитрил, HPLC grade, Fisher Chemical (США), п. 2170053, срок годности не установлен)
Режим	Изократический
Скорость потока	1 мл/мин
Объем пробы	20 мкл
Детектор	Диодная матрица, 254 нм

Изучение оптимальности процесса выделения проводили методом ВЭЖХ в следующих хроматографических условиях:

ПФ	B – ацетонитрил, с 0,1 % по объему трифторуксусной кислоты (PanReac, Испания) A – вода очищенная, с 0,1 % по объему трифторуксусной кислоты
Режим	Градиентный: 0–5 мин 5 % B, 5–45,75 мин от 5 до 100 % B, 45,75–50 100 % B, 50–60 мин от 100 до 5 % B, 60–65 мин 5 % B
Объем пробы	10 мкл

Структуру выделенного соединения подтверждали по спектральным характеристикам методом ИК-спектроскопии (ИК-фурье-спектрометр Spectrum 3 с НПВО-приставкой (PerkinElmer, США) путем сравнения полученного ИК-спектра с данными базы NIST и одномерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Макро- и микроскопический анализ семян *N. sativa*. Форма семени яйцевидная, трех- или четырехгранная, длина семян 2,8–3 мм, ширина 1,6–1,8 мм, характер поверхности шероховатый. При рассмотрении в стереомикроскоп видно, что поверхность семян сетчато-ячеистая, продольно-морщинистая, ребра граней прямые или неровные, одна из граней обычно выпуклая, иногда семена могут иметь «смятую» форму. Также следует отметить, что для некоторых трехгранных семян могут быть характерны слабо выступающие ребра на двух широких гранях, формируя неясно пятигранную структуру (что более отчетливо заметно на поперечных срезах при проведении микроскопического исследования) (рисунок 1). Семенная кожура плотная, твердая, рубчик не выражен, семена с эндоспермом в качестве питательной ткани, зародыш занимает центральное положение и имеет на поперечном срезе овальную форму, наиболее отчетливо в его структуре заметны две листовидные семядоли. Цвет семян черный, запах своеобразный, вкус водного извлечения горький.

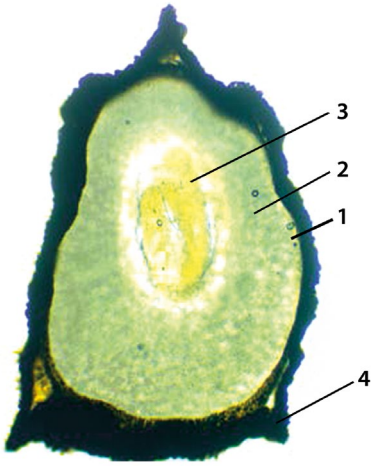


Рисунок 1. Поперечный срез семени тмина черного (80×):
1 – семенная кожура; 2 – эндосперм; 3 – зародыш; 4 – ребро семени

Figure 1. Cross section of the seed of Nigella sativa (80×):
1 – seed testa; 2 – endosperm; 3 – embryo; 4 – seed rib

При рассмотрении поперечного среза семени видны: кожура в виде коричнево-черной полосы, эндосперм и зародыш (см. рисунок 1). При большом увеличении различаются слои семенной кожуры. Первый слой – однослойный эпидермис, состоящий из крупных, плотно сомкнутых клеток с равномерно утолщенными стенками (рисунок 2). Часть клеток радиально вытянута и имеет сосочковидную форму (в местах расположения морщинок), часть – прямоугольную. Под эпидермисом располагается паренхимный слой, состоящий по граням семени из одного слоя клеток, а по ребрам – из деформированных сжатых элементов, утративших свой клеточный характер и формирующих бесструктурный слой. Третий слой семенной кожуры – пигментный, состоящий из тангентально вытянутых клеток, имеющих неравномерные утолщения клеточной стенки и содержащих коричневый пигмент. Клетки эндосперма многоугольные, тонкостенные, содержат алейроновые зерна и капли жирного и эфирного масла (рису-

нок 3). Реакция с раствором судан III положительная, с раствором Люголя – отрицательная. Ткань семядолей отличается более мелкими клетками. При рассмотрении семенной кожуры с поверхности к анатомо-диагностическим признакам можно отнести особенности строения эпидермиса и пигментного слоя семенной кожуры (рисунки 4–7).

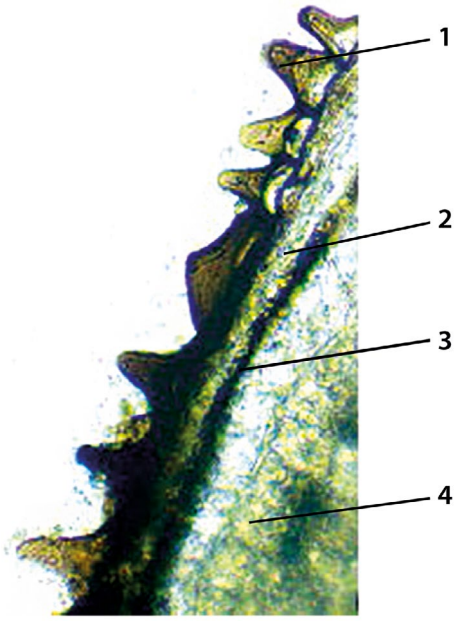


Рисунок 2. Поперечный срез семени тмина черного (200×):

1 – эпидермис; 2 – паренхимный слой; 3 – пигментный слой; 4 – эндосперм

Figure 2. Cross section of *Nigella sativa* seed (200×):

1 – epidermis; 2 – parenchymal layer; 3 – pigment layer; 4 – endosperm

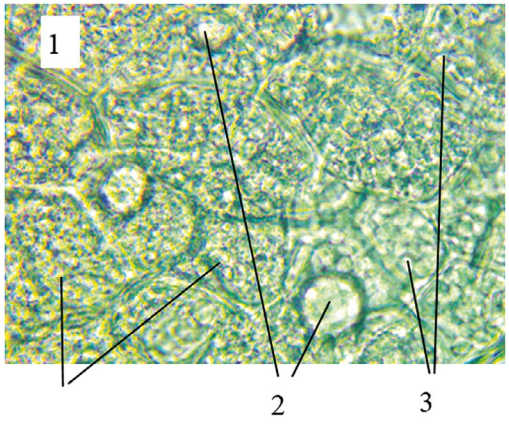


Рисунок 3. Поперечный срез семени тмина черного (800×):

1 – клетки эндосперма; 2 – капли жирного и эфирного масла; 3 – алейроновые зерна

Figure 3. Cross section of Nigella sativa seed (800×):

1 – endosperm cells; 2 – drops of fatty and essential oils; 3 – aleurone grains

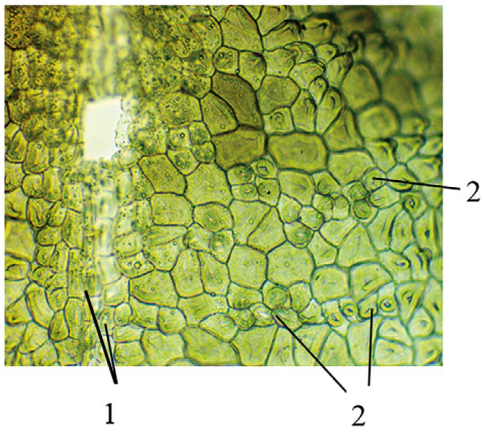


Рисунок 4. Препарат семенной кожуры с поверхности (200×):

1 – сосочковидный эпидермис ребра семени; 2 – сосочковидный эпидермис, формирующий продольные морщинки

Figure 4. Seed testa surface (200×):

1 – "papillary" epidermis of the seed rib; 2 – "papillary" epidermis forming longitudinal wrinkles

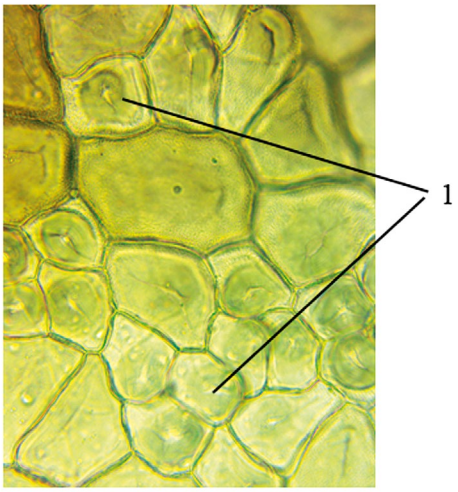


Рисунок 5. Препарат семенной кожуры с поверхности (800×):

1 – сосочковидный эпидермис (вид сверху)

Figure 5. Seed testa (800×):

1 – "papillary" epidermis (top view)

В результате проведенного морфолого-анатомического анализа была подтверждена подлинность семян *N. sativa,* а результаты микроскопии дают возможность заключить, что эфирное и жирное масла локализованы в эндосперме семени, благодаря чему процесс отжима масла сопровождается одновременной эффективной сопутствующей экстракцией компонентов эфирного масла в жирное масло.

Количественная оценка содержания тимохинона в семенах тмина. Методом ВЭЖХ проанализированы полученные различными способами про-

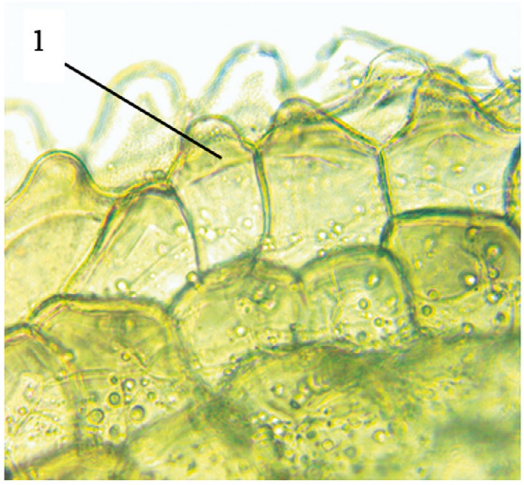


Рисунок 6. Препарат семенной кожуры с поверхности (800×):
1 – сосочковидный эпидермис (вид сбоку)

Figure 6. Seed testa (800×):
1 – "papillary" epidermis (side view)

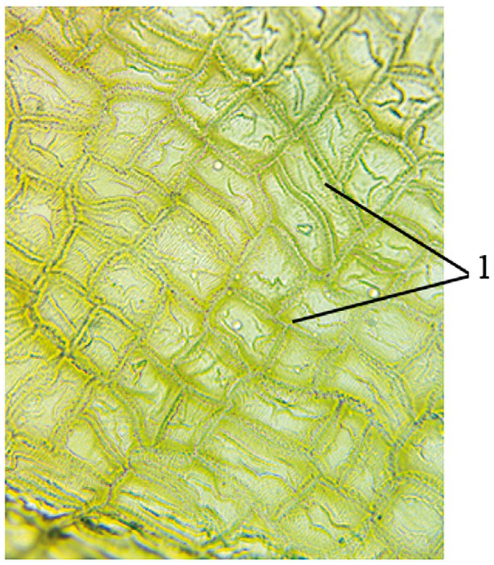


Рисунок 7. Препарат семенной кожуры с поверхности (800×):
1 – пигментный слой

Figure 7. Seed testa (800×):
1 – pigment layer

боподготовки извлечения из семян тмина черного. Хроматограммы стандартного раствора тимохинона и испытуемого раствора приведены на рисунках 8 и 9 соответственно.

Совпадение времен удерживания и спектров пиков (рисунок 10) дает основания заключить, что пик на хроматограмме испытуемого раствора является тимохиноном.

Результаты количественного определения тимохинона в семенах тмина черного при различных способах пробоподготовки представлены в таблице 1.

Из полученных результатов можно заключить, что способ получения извлечения не оказывает значительного влияния на выход тимохинона, содержание которого в семенах тмина черного составляет 0,25 ± 0,02 %, что достаточно для целей выделения.

Выделение тимохинона из *N. sativa*. Для выделения тимохинона из семян *N. sativa* методом мацерации в качестве экстрагентов использовали 96%-й этанол (АО «Гатчинский спиртовый завод», срок год-

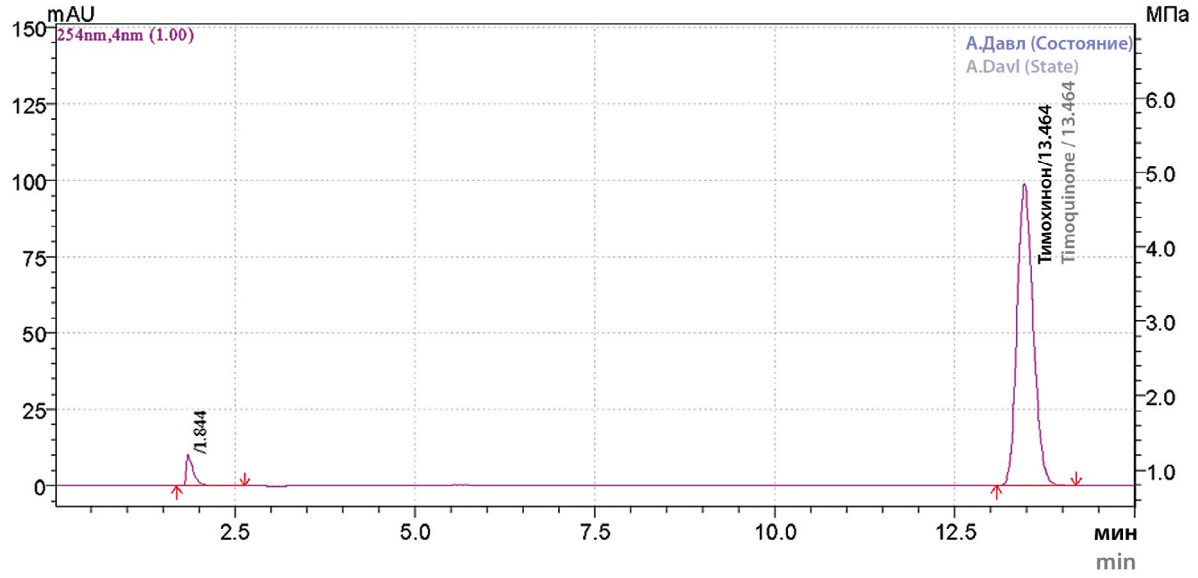


Рисунок 8. Типичная хроматограмма стандартного раствора тимохинона с концентрацией 10 мкг/мл

Figure 8. Chromatogram of a 10 μg/mL thymoquinone standard solution

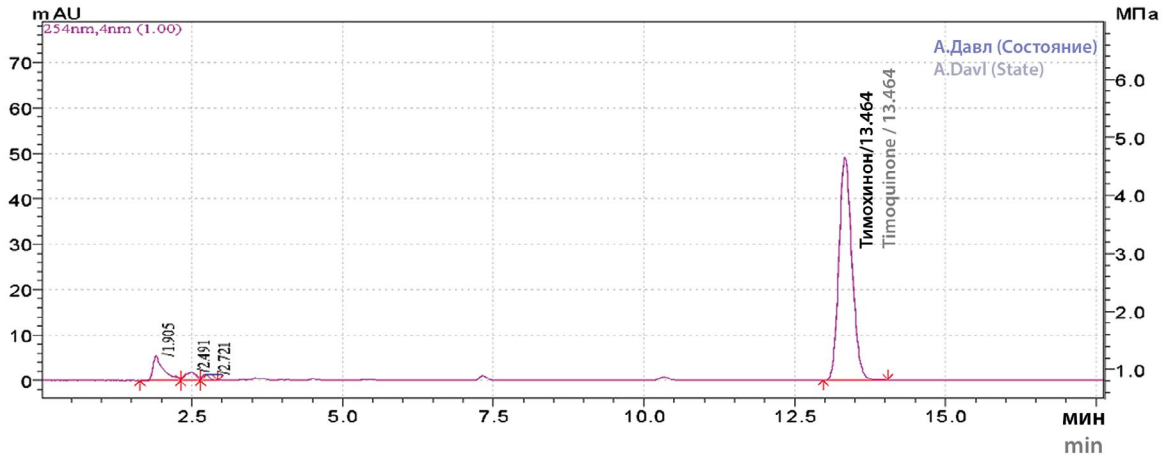


Рисунок 9. **Типичная хроматограмма испытуемого раствора**

Figure 9. **Test solution chromatogram**

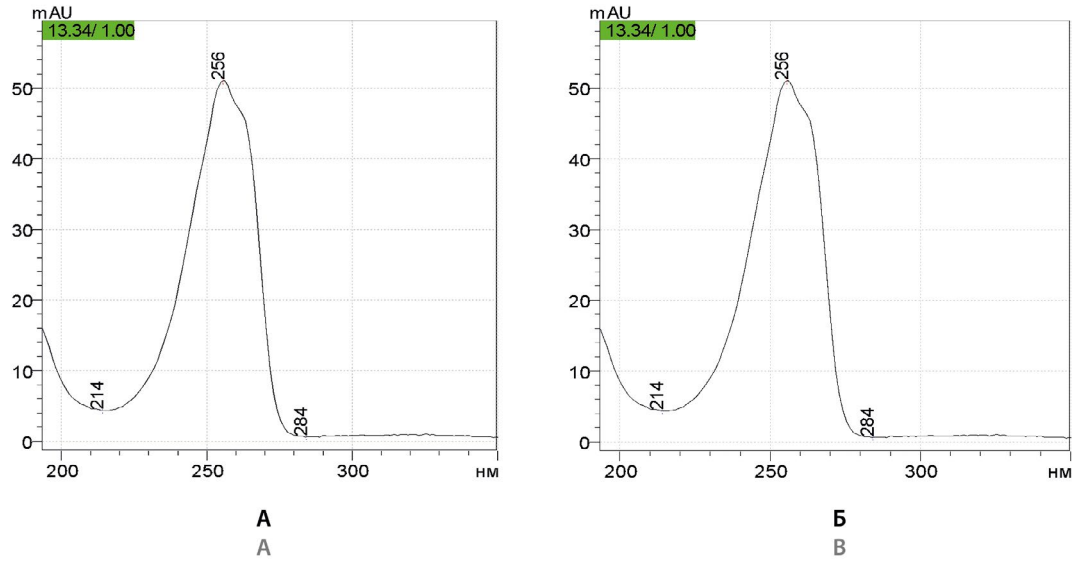


Рисунок 10. **Спектры пиков основных веществ на хроматограмме стандартного раствора (А) и испытуемого раствора (Б)**

Figure 10. **Peak spectra of the main substances in the chromatogram of the standard solution (A) and the test solution (B)**

ности не обозначен) и *н*-гексан (х.ч., АО «Вектон», годен до 09.2023). Экстракцию проводили методом мацерации при комнатной температуре с последующим анализом методом ВЭЖХ. На хроматограмме этанольного извлечения семян *N. sativa* тимохинон был мажорным пиком, но наряду с ним в экстракте присутствовало множество сопутствующих полярных соединений (рисунок 11).

Необходимо отметить, что гексановое извлечение было окрашено в зеленый цвет из-за присутствия хлорофиллов, наличие которых подтверждали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе БУВ (*н*-бутанол : уксусная кислота ледяная : вода) в соотношении 4 : 1 : 2 по характерной красной флуоресценции пятен.

Таблица 1. **Результаты количественного определения тимохинона в семенах тмина черного, полученного различными способами экстракции**

Table 1. **Results of quantitative determination of thymoquinone in black cumin seeds obtained by various extraction methods**

Способ экстракции Extraction method	**Результат, %** (*n* = 3) Results, % (*n* = 3)
Трехкратная экстракция метанолом на кипящей водяной бане Threefold extraction with methanol on a boiling water bath	0,26 ± 0,01
Экстракция с использованием сонификации (УЗ-баня) Extraction using sonification (ultrasonic bath)	0,25 ± 0,02
Однократное перемешивание с метанолом Single extraction with methanol	0,24 ± 0,02

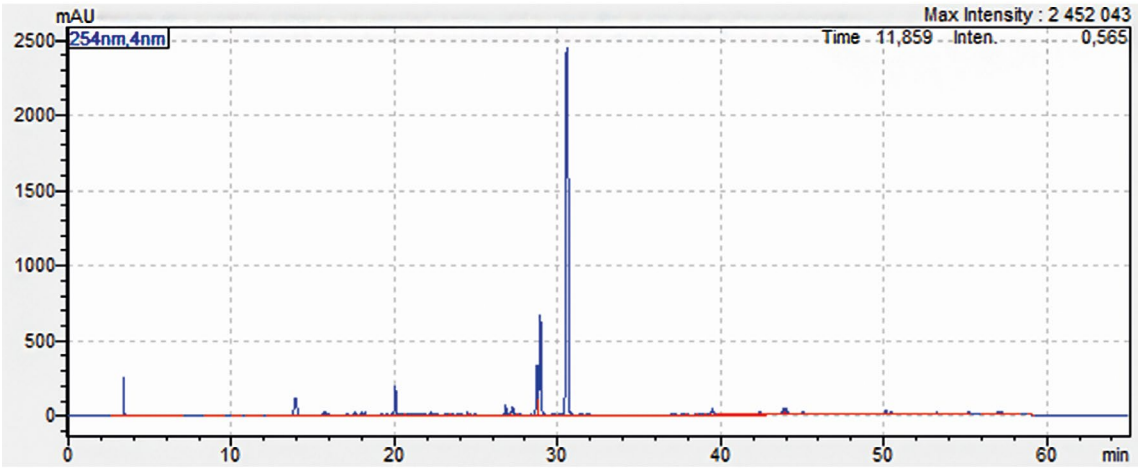


Рисунок 11. **Хроматограмма этанольного извлечения семян N. sativa**

Figure 11. **Chromatogram of N. sativa seed ethanol extract**

Хроматографическая чистота тимохинона, рассчитанная методом внутренней нормализации, составила 54,9 %.

На хроматограмме *н*-гексанового извлечения семян *N. sativa* тимохинон был почти единственным пиком с хроматографической чистотой 91,0 % (рисунок 12).

Для удаления хлорофиллов из растительных экстрактов используются различные приемы (хроматография, экстракция, сорбция), которые в той или иной степени приводят к уменьшению выхода целевых веществ. Наиболее простой метод – это адсорбция хлорофиллов активированным углем. К отфильтрованному экстракту добавляли 10,0 активированного угля (ООО «Фармстандарт-Лекресдства», годен до 04.2025). Спустя 24 часа после добавления активированного угля экстракт фильтровали. Полное удаление хлорофиллов сопровождалось уменьшением содержания тимохинона в 2,2 раза вследствие процесса его частичной сорбции на активированном угле. Хроматографическая чистота получаемого тимохинона после процесса сорбции составила 92,7 %.

Дальнейшие способы повышения чистоты тимохинона, получаемого из плодов, сопровождались значительными потерями целевого компонента и по выходу и чистоте уступали разработанной технологии выделения тимохонона из жирного масла *N. sativa*.

Учитывая, что тимохинон является липофильным соединением и локализуется в жирном масле эндоспермия семян, мы предположили, что его содержание в масле *N. sativa* на порядок больше чем в *н*-гексановом извлечении.

Принимая во внимание, что тимохинон растворяется в спирте, в то время как жирные масла не смешиваются с 96%-м этанолом, была проведена жидкость-жидкостная экстракция равных объемов жирного масла *N. sativa* с 96%-м этанолом. Полученный спиртовой раствор анализировали методом ВЭЖХ. На полученной хроматограмме идентифицировали мажорный пик тимохинона наряду с присутст-

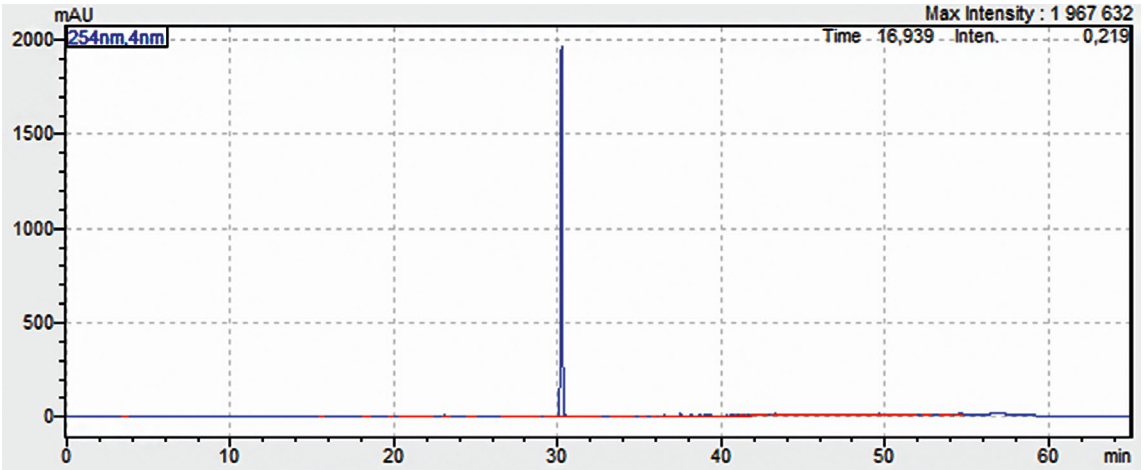


Рисунок 12. **Хроматограмма *н*-гексанового извлечения семян *N. sativa***

Figure 12. **Chromatogram of *n*-hexane extract of *N. sativa* seeds**

вующими на хроматограмме пиками неполярных компонентов из масла, вероятнее всего представленных высшими жирными кислотами и их производными (рисунок 13).

Учитывая, что тимохинон является летучим термостабильным соединением, использовали способ перегонки с водяным паром для его выделения.

К маслу прибавлялся равный объем воды очищенной и при перемешивании проводили отгонку на песчаной бане. В течение перегонки (2–3 часа) с водяным паром были обнаружены две фракции. Первая фракция представляла собой маслянистую жидкость с плотностью меньше единицы. ВЭЖХ-анализ данной фракции показал присутствие мажорного пика тимохинона наряду с пиками других неполярных соединений, вероятнее всего представленных свободными ненасыщенными высшими жирными кислотами и другими компонентами эфирного и жирного масла, способными перегоняться с водяным паром (рисунок 14).

Вторая фракция представляла собой тимохинон с хроматографической чистотой 97,4 % (рисунок 15), который самопроизвольно кристаллизовался в желто-оранжевые кристаллы характерной формы.

Таким образом, показано, что оптимальным способом получения тимохинона является перегонка масла семян тмина черного с водяным паром (соотношение масло : вода 1 : 1) на песчаной бане в течение 3 часов. Выход тимохинона из масла *N. sativa* при этом составляет 398 мг из 150 мл масла (0,26 %).

Анализ структуры тимохинона, выделенного из *N. sativa*. Выделенный из масла *N. sativa* тимохинон представляет собой оранжевое кристаллическое вещество с температурой плавления 45–47 °C, нерастворимое в воде, растворимое в спиртах (метанол, 96%-й этанол) и органических растворителях (ацетон, дихлорметан, *н*-гексан).

В ^{1}H-ЯМР-спектре тимохинона наблюдаются характерные сигналы олефиновых протонов H-3 (δH 6,72 (1H, d, J = 1,5 Hz)) и H-6 (δH 6,58 (1H, d, J = 1,0 Hz)), алифатических протонов метильной группы

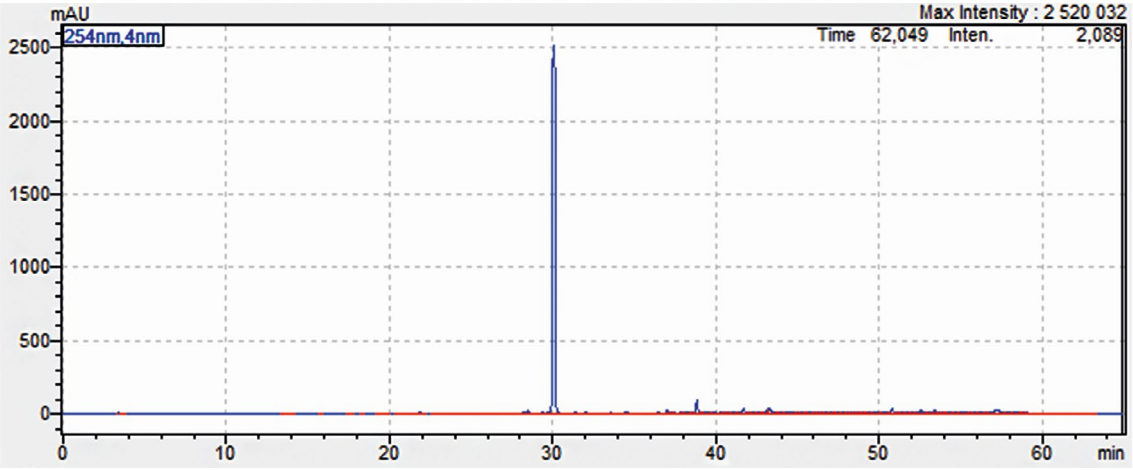


Рисунок 13. **Хроматограмма этанольной фракции, полученной путем жидкость-жидкостной экстракции из масла *N. sativa***

Figure 13. **Chromatogram of the ethanol fraction obtained by liquid-liquid extraction from *N. sativa* oil**

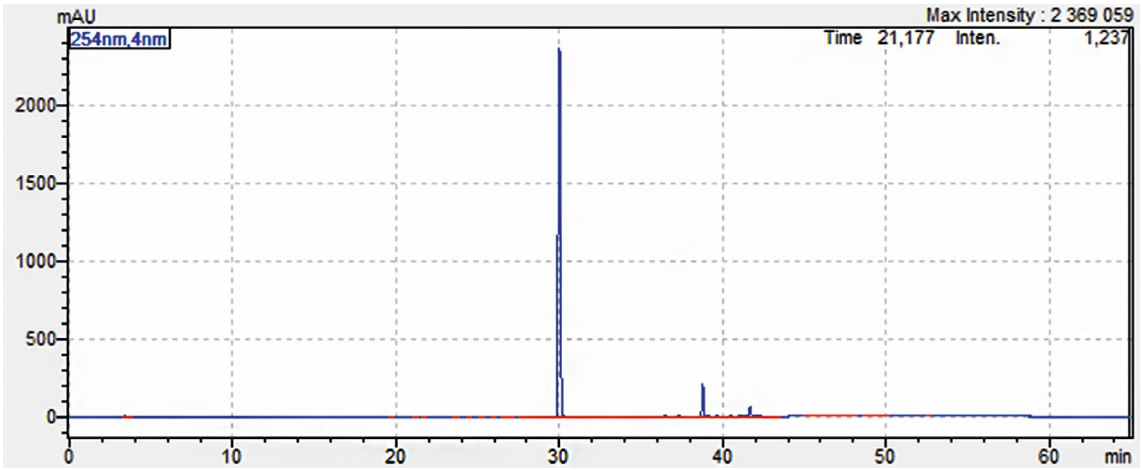


Рисунок 14. **Хроматограмма первой фракции, полученной путем перегонки с водяным паром масла *N. sativa***

Figure 14. **Chromatogram of the first fraction obtained by steam distillation of *N. sativa* oil**

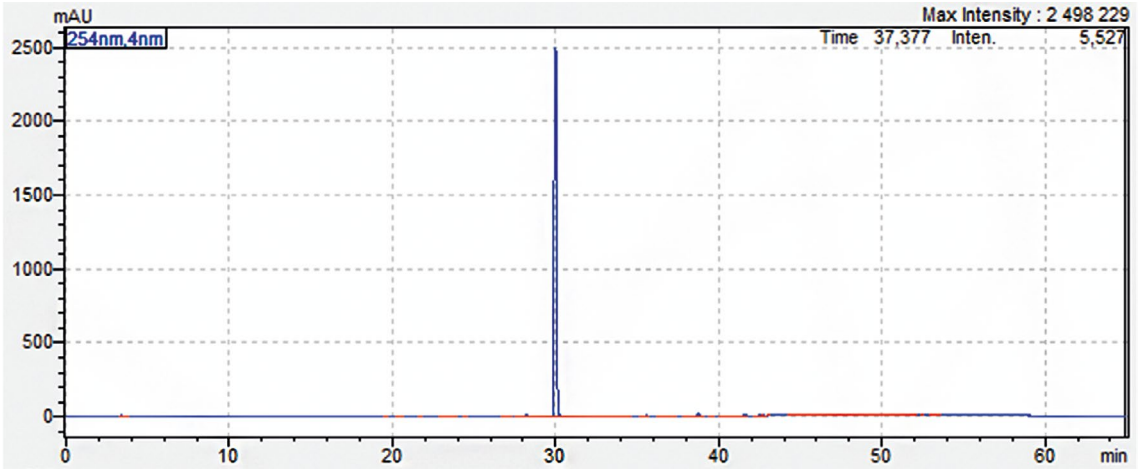


Рисунок 15. **Хроматограмма второй фракции, полученной путем перегонки с водяным паром масла *N. sativa***

Figure 15. **Chromatogram of the second fraction obtained by steam distillation of *N. sativa* oil**

H-7 (δH 1,95 (3H, d, *J* = 1,5 Hz)) и алифатических протонов изопропильной группы H-8 (δH 2,90 (1H, hd, *J* = 6,8, 1,0 Hz)), H-9 (H-10) (δH 1,08 (6H, d, *J* = 6,8 Hz)). Анализ ^{1}H-ЯМР-спектра показал, что тимохинон, выделенный из масла *N. sativa*, по своим спектральным характеристикам полностью совпадает с данными о тимохиноне из литературных источников [22]. На ЯМР-спектре также наблюдаются незначительные пики примесей, которые могут относиться к продуктам распада/превращения тимохинона и сопутствующим компонентам, получаемым при выделении вещества из масла *N. sativa*.

ИК-спектр выделенного тимохинона (рисунок 16) совпадает с ИК-спектром тимохинона, приведенным в базе данных NIST (рисунок 17).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показана возможность выделения тимохинона из жирного масла семян *Nigella sativa* L. с хроматографической чистотой (метод ВЭЖХ) более

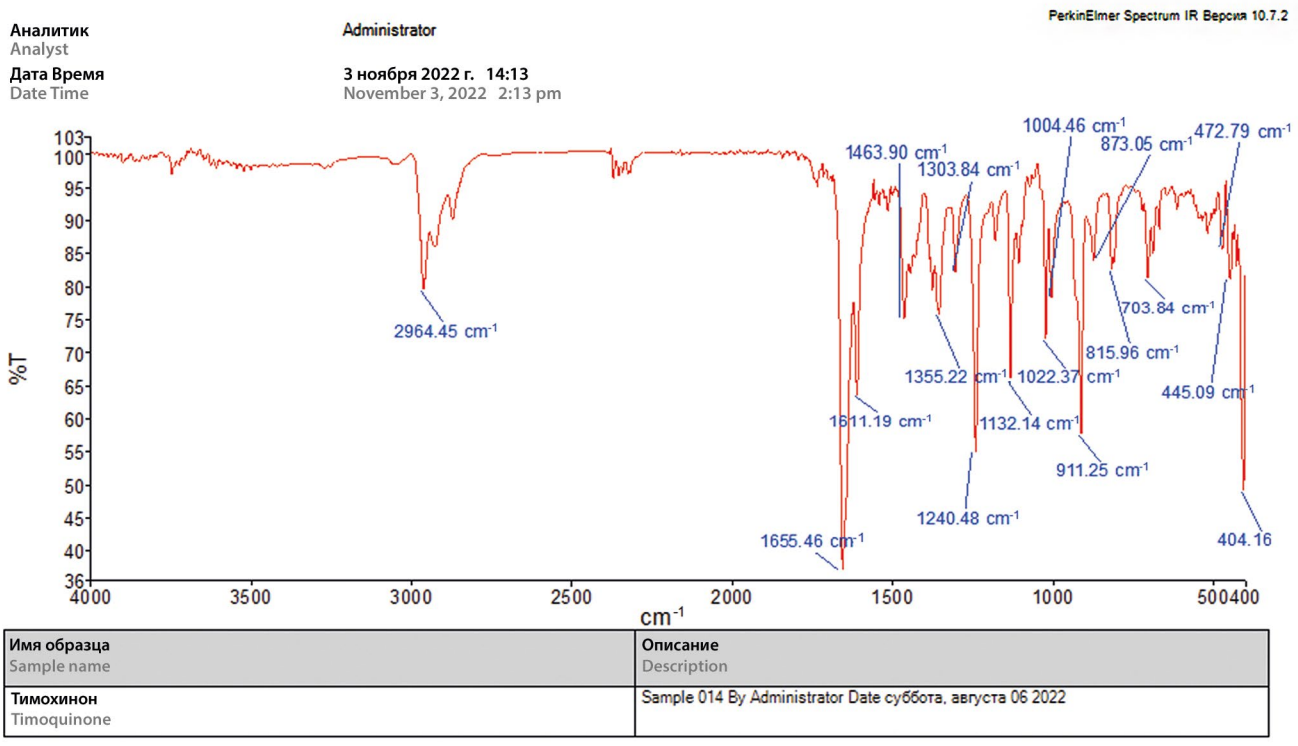


Рисунок 16. **ИК-спектр выделенного тимохинона**

Figure 16. **IR spectrum of the isolated thymoquinone**

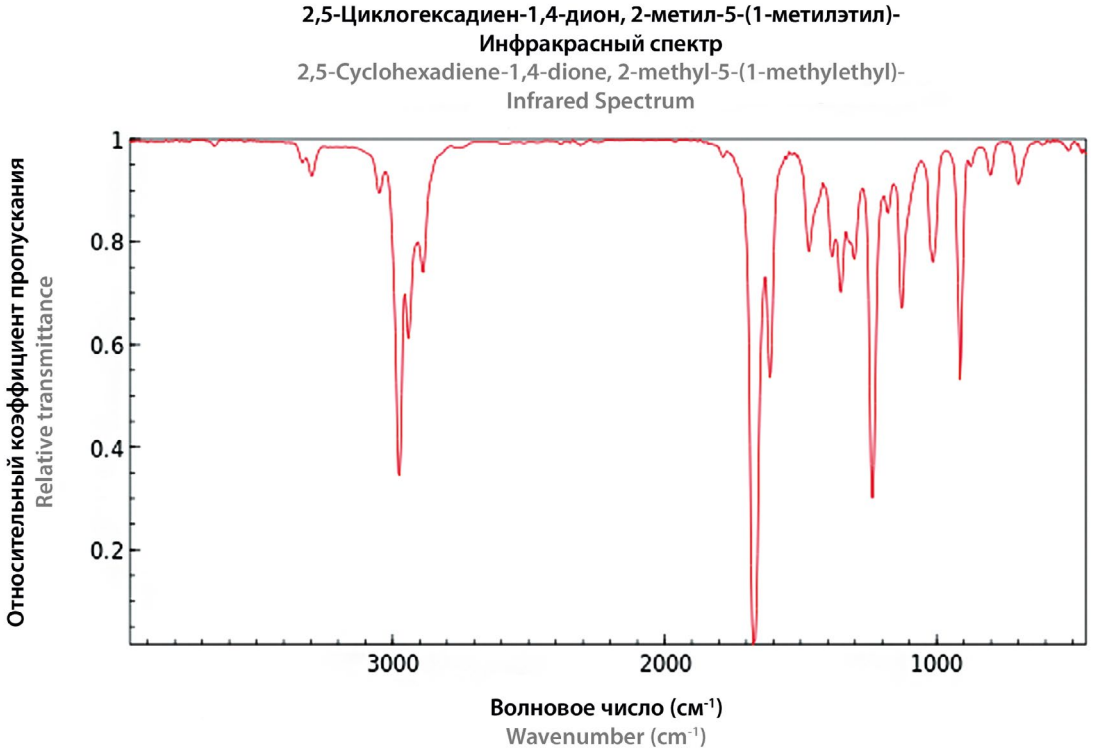


Рисунок 17. **ИК-спектр тимохонона из базы данных NIST**

Figure 17. **IR spectrum of timochonone from the NIST database**

97 % и сопоставимостью спектральных характеристик, которые подтверждают идентичность полученного соединения.

Обоснована нецелесообразность использования семян тмина для прямого выделения тимохинона, и показано, что извлечения из семян содержат значительное число сопутствующих компонентов, что снижает чистоту полученного продукта. Применение способа очистки углем приводит к значительным потерям выхода целевого компонента.

Предложенный экспрессный и экономичный способ выделения тимохинона методом перегонки с водяным паром обеспечивает выход целевого компонента 0,26 %.

Предложенный способ может быть применен на производственных площадках предприятий по заготовке и переработке семян тмина черного для получения природного тимохинона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum L. Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
2. Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Гришукова Е. А., Сулоев И. С., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (Ononis arvensis L.) и золотарника канадского (Solidago canadensis L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
3. Taborsky J., Kunt M., Kloucek P., Lachman J., Zeleny V., Kokoska L. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in *Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae,* and *Ranunculaceae* families. *Open Chemistry.* 2012;10(6):1899–1906. DOI: 10.2478/s11532-012-0114-2.
4. Paarakh P. M. Nigella sativa Linn.– A comprehensive review. Indian *Journal of Natural Products and Resources*. 2010;1:409–429.
5. Taka E., Mendonca P., Mazzio E. A., Reed S. D., Reams R., Soliman K. F. Molecular targets underlying the anti-inflammatory effects of thymoquinone in LPS activated BV-2 Cells. *FASEB J.* 2018;32(1S):40–42. DOI: 10.1096/fasebj.2018.32.1.
6. Armutcu F., Akyol S., Akyol O. The interaction of glutathione and thymoquinone and their antioxidant properties. *Electronic Journal of General Medicine.* 2018;15(4):em59. DOI: 10.29333/ejgm/89493.
7. Kanter M., Coskun O., Uysal H. The antioxidative and antihistaminic effect of Nigella sativa and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Archives of Toxicology.* 2006;80(4):217–224. DOI: 10.1007/s00204-005-0037-1.
8. Majdalawieh A. F., Fayyad M. W., Nasrallah G. K. Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2017;57(18):3911–3928. DOI: 10.1080/10408398.2016.1277971.
9. Amin B., Hosseinzadeh H. Black cumin (Nigella sativa) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Medica.* 2015;82(01/02):8–16. DOI: 10.1055/s-0035-1557838.
10. Noorbakhsh M.-F., Hayati F., Samarghandian S., Shaterzadeh-Yazdi H., Farkhondeh T. An overview of hepatoprotective effects of thymoquinone. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture.* 2018;9(1):14–22. DOI: 10.2174/2212798410666180221105503.
11. Rasheed Z., Altorbag A. A., Al-Bossier A. S., Alnasser N. A., Alkharraz O. S., Altuwayjiri K. M., Alobaid A. S., Alsaif A. K., Alanazi Y. H., Alghidani B. A. Alduayji M. A., Bu Mozah A. A., Alsuhaibani S. A. Protective potential of thymoquinone against peroxynitrite induced modifications in histone H2A: *in vitro* studies. *Interna-*

tional Journal of Biological Macromolecules. 2018;112:169–174. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.157.
12. Habib N., Choudhry S. HPLC Quantification of Thymoquinone Extracted from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) Seeds and Antibacterial Activity of Its Extracts against Bacillus Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021:6645680. DOI: 10.1155/2021/6645680.
13. Scott M. L., Adams M. F., Karchesy J. J., McAllister J. C. Insecticidal Activity of Thymoquinone and Related Compounds Against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) *Journal of Medical Entomology*. 2017;54(3):785–787. DOI: 10.1093/jme/tjw181.
14. Bouhlel A., Mosbah I. B., Abdallah N. H., Ribault C., Viel R., Mannaï S., Corlu A., Abdennebi H. B. Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:964–973. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.018.
15. Mahmoudvand H., Tavakoli R., Sharififar F., Minaie K., Ezatpour B., Jahanbakhsh S., Sharifi I. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(7):1052–1057. DOI: 10.3109/13880209.2014.957784.
16. Akyuz M., Taysi S., Baysal E., Demir E., Alkis H., Akan M., Binici H., Karatas Z. A. Radioprotective effect of thymoquinone on salivary gland of rats exposed to total cranial irradiation. *Head & Neck*. 2017;39(10):2027–2035. DOI: 10.1002/hed.24861.
17. Cascella M., Bimonte S., Barbieri A., Del Vecchio V., Muzio M. R., Vitale A., Benincasa G., Ferriello A. B., Azzariti A., Arra C., Cuomo A. Dissecting the potential roles of Nigella sativa and its constituent thymoquinone on the prevention and on the progression of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018;10. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00016.
18. Butt A. S., Nisar N., Ghani N., Altaf I., Aziz Mughal T. Isolation of Thymoquinone from *Nigella sativa* L. and *Thymus vulgaris* L., and Its Anti-Proliferative Effect on HeLa Cancer Cell Lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2019;18(1):37. DOI: 10.4314/tjpr.v18i1.6.
19. Singh S. K., Mishra M. K., Lillard J. W., Singh R. Thymoquinone enhanced the tumoricidal activity of NK Cells against Lung Cancer. *The Journal of Immunology*. 2018;200(1):124.5. DOI: 10.4049/jimmunol.200.Supp.124.5.
20. Barkat M. A., Harshita, Ahmad J., Khan M. A., Beg S., Ahmad F. J. Insights into the targeting potential of thymoquinone for therapeutic intervention against triple-negative breast cancer. *Current Drug Targets*. 2018;19(1):70–80. DOI: 10.2174/1389450118666170612095959.
21. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. В 4 томах. Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018.
22. Ahmad A., Mishra R. K., Vyawahare A., Kumar A., Rehman M. U., Qamar W., Khan A. Q., Khan R. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(8):1113–1126. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.09.008.

REFERENCES

1. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Drug development & registration*. 2021;10(2):80–86. (In Russ.) DOI:10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
2. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B. Isolation of individual compounds from the terrestrial parts of Ononis arvensis L. and Solidago canadensis L. *Drug development & registration*. 2021; 10(1):83–89. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
3. Taborsky J., Kunt M., Kloucek P., Lachman J., Zeleny V., Kokoska L. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in *Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae*, and *Ranunculaceae* families. *Open Chemistry*. 2012;10(6):1899–1906. DOI: 10.2478/s11532-012-0114-2.
4. Paarakh P. M. Nigella sativa Linn.– A comprehensive review. Indian *Journal of Natural Products and Resources*. 2010;1:409–429.
5. Taka E., Mendonca P., Mazzio E. A., Reed S. D., Reams R., Soliman K. F. Molecular targets underlying the anti-inflammatory effects of thymoquinone in LPS activated BV-2 Cells. *FASEB J*. 2018;32(1S):40–42. DOI: 10.1096/fasebj.2018.32.1.
6. Armutcu F., Akyol S., Akyol O. The interaction of glutathione and thymoquinone and their antioxidant properties. *Electronic Journal of General Medicine*. 2018;15(4):em59. DOI: 10.29333/ejgm/89493.
7. Kanter M., Coskun O., Uysal H. The antioxidative and antihistaminic effect of Nigella sativa and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Archives of Toxicology*. 2006;80(4):217–224. DOI: 10.1007/s00204-005-0037-1.
8. Majdalawieh A. F., Fayyad M. W., Nasrallah G. K. Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(18):3911–3928. DOI: 10.1080/10408398.2016.1277971.
9. Amin B., Hosseinzadeh H. Black cumin (Nigella sativa) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Medica*. 2015;82(01/02):8–16. DOI: 10.1055/s-0035-1557838.
10. Noorbakhsh M.-F., Hayati F., Samarghandian S., Shaterzadeh-Yazdi H., Farkhondeh T. An overview of hepatoprotective effects of thymoquinone. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 2018;9(1):14–22. DOI: 10.2174/2212798410666180221105503.
11. Rasheed Z., Altorbag A. A., Al-Bossier A. S., Alnasser N. A., Alkharraz O. S., Altuwayjiri K. M., Alobaid A. S., Alsaif A. K., Alanazi Y. H., Alghidani B. A. Alduayji M. A., Bu Mozah A. A., Alsuhaibani S. A. Protective potential of thymoquinone against peroxynitrite induced modifications in histone H2A: *in vitro* studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;112:169–174. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.157.
12. Habib N., Choudhry S. HPLC Quantification of Thymoquinone Extracted from *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) Seeds and Antibacterial Activity of Its Extracts against Bacillus Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021:6645680. DOI: 10.1155/2021/6645680.
13. Scott M. L., Adams M. F., Karchesy J. J., McAllister J. C. Insecticidal Activity of Thymoquinone and Related Compounds Against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) *Journal of Medical Entomology*. 2017;54(3):785–787. DOI: 10.1093/jme/tjw181.
14. Bouhlel A., Mosbah I. B., Abdallah N. H., Ribault C., Viel R., Mannaï S., Corlu A., Abdennebi H. B. Thymoquinone prevents endoplasmic reticulum stress and mitochondria-induced apoptosis in a rat model of partial hepatic warm ischemia reperfusion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:964–973. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.018.
15. Mahmoudvand H., Tavakoli R., Sharififar F., Minaie K., Ezatpour B., Jahanbakhsh S., Sharifi I. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(7):1052–1057. DOI: 10.3109/13880209.2014.957784.
16. Akyuz M., Taysi S., Baysal E., Demir E., Alkis H., Akan M., Binici H., Karatas Z. A. Radioprotective effect of thymoquinone on salivary gland of rats exposed to total cranial irradiation. *Head & Neck*. 2017;39(10):2027–2035. DOI: 10.1002/hed.24861.
17. Cascella M., Bimonte S., Barbieri A., Del Vecchio V., Muzio M. R., Vitale A., Benincasa G., Ferriello A. B., Azzariti A., Arra C., Cuomo A. Dissecting the potential roles of Nigella sativa and its constituent thymoquinone on the prevention and on the progression of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018;10. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00016.
18. Butt A. S., Nisar N., Ghani N., Altaf I., Aziz Mughal T. Isolation of Thymoquinone from *Nigella sativa* L. and *Thymus vulgaris* L., and Its Anti-Proliferative Effect on HeLa Cancer Cell Lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2019;18(1):37. DOI: 10.4314/tjpr.v18i1.6.
19. Singh S. K., Mishra M. K., Lillard J. W., Singh R. Thymoquinone enhanced the tumoricidal activity of NK Cells against Lung Cancer. *The Journal of Immunology*. 2018;200(1):124.5. DOI: 10.4049/jimmunol.200.Supp.124.5.
20. Barkat M. A., Harshita, Ahmad J., Khan M. A., Beg S., Ahmad F. J. Insights into the targeting potential of thymoquinone for therapeutic intervention against triple-negative breast cancer. *Current Drug Targets*. 2018;19(1):70–80. DOI: 10.2174/1389450118666170612095959.
21. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. In 4 volumes. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.)
22. Ahmad A., Mishra R. K., Vyawahare A., Kumar A., Rehman M. U., Qamar W., Khan A. Q., Khan R. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(8):1113–1126. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.09.008.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-41-48
УДК 615.12

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение биофармацевтических свойств новой мукоадгезивной лекарственной формы для терапии дегенеративных заболеваний глаз

М. Н. Анурова✉, Е. О. Бахрушина, И. В. Лапик, А. Р. Тураева, Н. Б. Демина, Б. Б. Сысуев, И. И. Краснюк

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Анурова Мария Николаевна. **E-mail:** amn25@yandex.ru

ORCID: М. Н. Анурова – https://orcid.org/0000-0002-7649-9616; Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; И. В. Лапик – https://orcid.org/0000-0002-1590-7268; А. Р. Тураева – https://orcid.org/0000-0003-0707-4574; Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Б. Б. Сысуев – https://orcid.org/0000-0002-9933-1808; И. И. Краснюк – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Статья поступила: 05.07.2022 **Статья принята в печать:** 05.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Дегенеративные заболевания сетчатки, в том числе глаукома, являются основной причиной потери зрения у взрослого населения. Разработка и усовершенствование медикаментозного лечения данной группы заболеваний представляет собой актуальную проблему.

Цель. Изучение новой лекарственной формы метилэтилпиридинола в виде офтальмологического геля.

Материалы и методы. Объекты исследования – образцы глазных гелей, содержащих метилэтилпиридинол, для которых изучали мукоадгезию комбинацией методов *in vitro* / *ex vivo*. Биодеградацию и кинетику высвобождения действующего вещества из лекарственной формы изучали на тестере растворения в среде искусственной слезной жидкости. Срок годности лекарственной формы устанавливали в соответствии с программой изучения стабильности. Определение местнораздражающего действия проводили методом конъюнктивальной пробы у 10 кроликов породы шиншилла массой 3,6–4,1 кг.

Результаты и обсуждение. В работе представлены результаты изучения биофармацевтических характеристик ранее разработанного офтальмологического геля метилэтилпиридинола на основе неионного полимера – гидроксиэтилцеллюлозы марки Natrosol™ 250 HHX. Проведено сравнительное изучение мукоадгезии методом потока *in vitro* / *ex vivo* образцов офтальмологического геля в диапазоне концентрации гидроксиэтилцеллюлозы в геле 1–1,5 %. Лучшими адгезивными характеристиками обладал образец с содержанием полимера 1,5 %, который имел минимальную скорость потока: *in vitro* $2{,}7 \cdot 10^6$ м/с и *ex vivo* $2{,}3 \cdot 10^6$ м/с. Изучены кинетика растворения и визуальная биодеградация образца после теста «Растворение», которая говорит о пролонгированном высвобождении метилэтилпиридинола из геля. Показана стабильность разработанной лекарственной формы в долгосрочных и стрессовых условиях. Выполнена оценка местнораздражающего действия методом конъюнктивальной пробы.

Заключение. Были определены основные биофармацевтические характеристики разработанного офтальмологического геля метилэтилпиридинола и показано, что он может быть использован как система доставки для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки, так как обладает выраженными биоадгезивными свойствами, пролонгированным высвобождением. По результатам определения срока годности готовой лекарственной формы сделан вывод, что он составляет 2 года. Проведены стрессовые исследования геля метилэтилпиридинола. Разработанный офтальмологический гель не обладает местнораздражающим действием.

Ключевые слова: метилэтилпиридинол, эмоксипин, дегенеративные заболевания сетчатки, глазные гели, мукоадгезия, местнораздражающее действие

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

Вклад авторов. М. Н. Анурова – руководство исследованием. М. Н. Анурова, Е. О. Бахрушина – разработка дизайна исследования, оценка результатов исследования, редактирование текста статьи. И. В. Лапик и А. Р. Тураева – выполнение экспериментальной части исследования, валидация. Н. Б. Демина, Б. Б. Сысуев, И. И. Краснюк – редакционные замечания, утверждение текста статьи к публикации. В написании статьи участвовали все соавторы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (договор № 02.G25.31.0001) в рамках реализации Постановления Правительства РФ от 09.04.2010 г. № 218.

Для цитирования: Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Лапик И. В., Тураева А. Р., Демина Н. Б., Сысуев Б. Б., Краснюк И. И. Изучение биофармацевтических свойств новой мукоадгезивной лекарственной формы для терапии дегенеративных заболеваний глаз. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):41–48. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-41-48

Biopharmaceutical Properties of New Mucoadhesive Dosage Form for Eye Degenerative Diseases Treatment

Maria N. Anurova✉, Elena O. Bakhrushina, Ivan V. Lapik, Anastasia R. Turaeva, Natalia B. Demina, Boris B. Sysuev, Ivan I. Krasnyuk

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:** Maria N. Anurova. **E-mail:** amn25@yandex.ru

© Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Лапик И. В., Тураева А. Р., Демина Н. Б., Сысуев Б. Б., Краснюк И. И., 2023
© Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Lapik I. V., Turaeva A. R., Demina N. B., Sysuev B. B., Krasnyuk I. I., 2023

ORCID: Maria N. Anurova – https://orcid.org/0000-0002-7649-9616; Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; Ivan V. Lapik – https://orcid.org/0000-0002-1590-7268; Anastasia R. Turaeva – https://orcid.org/0000-0003-0707-4574; Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Boris B. Sysuev – https://orcid.org/0000-0002-9933-1808; Ivan I. Krasnyuk – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Received: 05.07.2022 **Revised:** 05.07.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Degenerative retinal diseases, including glaucoma, are the main cause of vision loss in the adult population. The development and improvement of drug treatment of this group of diseases is an urgent problem.

Aim. Study of a new dosage form of methylethylpyridinol in the form of an ophthalmic gel.

Materials and methods. The objects of the study were samples of eye gels containing methylethylpyridinol, for which mucoadhesion was studied by a combination of *in vitro* / *ex vivo* methods. Biodegradation and release kinetics of the active substance from the dosage form were studied using a dissolution tester in an artificial tear fluid medium. The shelf life of the dosage form was established in accordance with the stability study program. Determination of the local irritative action was carried out by conjunctival test in 10 rabbits of chinchilla breed weighing 3,6–4,1 kg.

Results and discussion. The article presents the results of the study of biopharmaceutical characteristics of the previously developed ophthalmic gel of methylpyridinol based on a nonionic polymer – hydroxyethylcellulose brand Natrosol™ 250 HHX. A comparative study of mucoadhesion by *in vitro* / *ex vivo* flow of ophthalmic gel samples in the range of hydroxyethylcellulose concentration in the gel of 1–1.5 % was performed. The sample with 1.5 % polymer content had the best adhesive characteristics because it had a minimum flow rate: *in vitro* $2.7 \cdot 10^6$ m/s and *ex vivo* $2.3 \cdot 10^6$ m/s. Dissolution kinetics and visual biodegradation of the sample after "Dissolution" test were studied, which indicates prolonged release of methyl ethyl pyridinol from the gel. The stability of the developed dosage form under long-term and stress conditions was shown. The local irritating effect was estimated by the conjunctival test.

Conclusion. The main biopharmaceutical characteristics of the developed ophthalmic gel methylpyridinol were determined and it was shown that it can be used as a delivery system for the treatment of degenerative retinal diseases because it possesses marked bioadhesive properties and prolonged release. The shelf life of the dosage form was determined, which was 2 years. Stress studies of methylethylpyridinol gel were carried out. The developed ophthalmic gel has no local irritating effect.

Keywords: methylethylpyridinol, emoxipine, degenerative retinal diseases, eye gels, mucoadhesion, local irritant effect

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

Contribution of the authors. Maria N. Anurova – management of the study. Maria N. Anurova, Elena O. Bakhrushina – development of the study design, evaluation of the study results, editing the article text. Ivan V. Lapik and Anastasia R. Turaeva – performance of the experimental part of the study, validation. Natalia B. Demina, Boris B. Sysoev, Ivan I. Krasnyuk – editorial comments, approval of the article text for publication. All co-authors participated in writing the article.

Funding. The work was supported financially by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (contract no. 02.G25.31.0001) as part of the implementation of Decree of the Government of the Russian Federation No. 218 dated April 9, 2010.

For citation: Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Lapik I. V., Turaeva A. R., Demina N. B., Sysuev B. B., Krasnyuk I. I. Biopharmaceutical properties of new mucoadhesive dosage form for eye degenerative diseases treatment. *Drug development & registration*. 2023;12(3):41–48. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-41-48

ВВЕДЕНИЕ

Дегенеративные заболевания сетчатки, в том числе глаукома, представляют собой значимую проблему в сфере современного здравоохранения, так как являются основной причиной потери зрения у взрослого населения [1–3]. По данным Всемирной организации здравоохранения, более 105 млн человек по всему миру страдают глаукомой, более 5 млн человек необратимо потеряли зрение вследствие этого заболевания [4]. Количество новых выявленных случаев дегенеративных патологий глаз в Российской Федерации составляет 3–4 % ежегодно, что коррелирует с показателями других развитых стран [5].

Важнейшими патогенетическими звеньями глаукомы являются увеличение внутриглазного давления и оптическая нейропатия [6]. Широкий ассортимент гипотензивных препаратов позволяет надежно справляться с контролем уровня внутриглазного давления, однако эффективных препаратов, обладающих выраженными нейропротекционными свойствами, недостаточно.

Метилэтилпиридинол является вторичным нейропротекторным препаратом отечественного производства, обладающим антиоксидантным, ангиопротектроным, антиагрегационным и антигипоксическим действием. Препарат быстро проникает в ткани глаза, где происходят его депонирование и метаболизм [7]. Еще в конце 70-х годов XX века в эксперименте на дрозофилах была выявлена выраженная антиоксидантная активность лекарственного вещества [8], а в настоящее время накоплен большой опыт морфологических и фармакокинетических исследований [7, 9]. Метилэтилпиридинол широко используется в комплексной терапии глаукомы, входит в схемы лечения, рекомендованные практическими руководствами для врачей [6, 10], что подтверждается рядом

клинических исследований, проводившихся в 1990–2000-е годы на базе ведущих лечебных учреждений: НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, кафедр глазных болезней Киевской медицинской академии им. П. Л. Шупика и Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова, Одесского НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. акад. В. П. Филатова [11–13], и более современными исследованиями на базе офтальмологической клиники Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова (г. Санкт-Петербург) [14].

Препараты метилэтилпиридинола показаны не только при глаукоме, но и при других дегенеративных заболеваниях, таких как диабетическая ретинопатия и хориоретинальная дистрофия. Кроме того, метилэтилпиридинол защищает ткани глаза, в том числе сетчатку, от травмирующего действия света высокой интенсивности, что делает его актуальным как профилактическое средство для людей, интенсивно работающих за компьютером. С каждым годом растет количество людей, использующих контактные линзы, а основными их недостатками являются механическое воздействие на роговицу и хроническая гипоксия [15, 16]. Препараты метилэтилпиридинола защищают роговицу при ношении контактных линз.

На российском фармацевтическом рынке препараты метилэтилпиридинола представлены двумя лекарственными формами: глазными каплями и раствором для парентерального введения.

Отмечается, что для повышения приверженности пациентов с дегенеративными заболеваниями сетчатки терапии необходимо разрабатывать лекарственные формы, обеспечивающие пролонгированное действие и снижающие кратность введения лекарственного препарата, чтобы повысилась эффективность проводимой терапии. Статистически достоверное количество ошибок при инстилляции пациентами традиционной жидкой лекарственной формы в виде глазных капель смещает фокус современных исследований в сторону вязко-пластичных и твердых систем доставки лекарственных средств [17–19].

Таким образом, **целью работы** являлось изучение новой лекарственной формы метилэтилпиридинола для местного применения в офтальмологии, обладающей улучшенными биофармацевтическими характеристиками, способной повысить комплаентность пациентов лечению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являются экспериментальные образцы глазных гелей, содержащих активную фармацевтическую субстанцию метилэтилпиридинола (ООО «Кемикал Лайн», Россия) в концентрации 1,0 % на основе полимера гидроксиэтилцеллюлозы марки Natrosol™ 250 HHX (Ashland, США) в диапазоне концентраций от 1 до 1,5 %. Для повышения стабильности в состав лекарственной формы вводили натрия сульфит в количестве 0,1 г, натрия гидрофосфат в количестве 0,5 г, натрия бензоат в количестве 0,5 г, 0,2 М раствор хлористоводородной кислоты 22 мл на 100 г геля, как консервант использовали бензалкония хлорид в количестве 0,02 г.

В предварительно проведенной работе [20] был обоснован выбор гелеобразователя. Рассматривали возможность использования одобренных для офтальмологического применения полимеров: Carbopol® 974P (Lubrizol, Бельгия); метилцеллюлозы (МЦ) марки Metolose® SM100 (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Япония); гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ) марки Natrosol™ 250 HHX (Ashland, США); гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ) марки Benecel™ K100M (Ashland, Бельгия). Выбор полимера осуществляли на основе результатов изучения агрегативной стабильности, реологических, осмотических свойств и стабильности в краткосрочных экспериментах лабораторных образцов гелей. Наиболее перспективными для дальнейших исследований посчитали составы на основе гидроксиэтилцеллюлозы марки Natrosol™ 250 HHX.

В рамках данной работы получали экспериментальные образцы гелей по следующей технологии: получали раствор эмоксипина и вспомогательных веществ с pH 7,0 ± 0,1 и затем вносили полимер при постоянном перемешивании при температуре 25 ± 2 °C с использованием верхнеприводной лопастной мешалки Eurostar 20 digital (IKA, Германия).

Полученные образцы представляли собой текучие растворы полимеров и вспомогательных веществ, не имеющие запаха, бесцветные и прозрачные. Осмотическая активность и реологические характеристики полученных экспериментальных образцов [20, 21] лежат в диапазоне оптимума для офтальмологических вязко-пластичных лекарственных форм [22].

У полученных экспериментальных образцов изучали мукоадгезивные свойства, биодеградацию, высвобождение метилэтилпиридинола, стабильность в долгосрочных испытаниях, устойчивость показателей в стресс-тестах и отсутствие местнораздражающего действия.

Для изучения мукоадгезии использовали комбинацию методов *in vitro* / *ex vivo* [23, 24] – метода потока на наклонной плоскости с использованием разработанной модели слизистой [25] и метода потока окрашенного геля на глазном яблоке кролика, замороженном после резекции. На стеклянную пластину размером 70 × 150 мм, покрытую нетканным материалом спанбонд (ООО «Спанлаб», Россия), равномерно наносили 4%-й раствор муцина (Mucin from porcine stomach, type II, Sigma-Aldrich, USA). Толщину слоя муцина, которая составляла 0,1 мм, контролировали с помощью микрометра МКЦ 25 (GRIFF, Россия). Эксперимент проводили в климатической камере

MKF 115 (BINDER GmbH, Германия) при температуре 37 ± 0,5 °C. На линию старта наносили по 0,2 мл образца, пластину неподвижно закрепляли вертикально под углом 90°, чтобы капля геля стекала по муцину, имитирующему слизистую оболочку глаза. Замеряли время, за которое образец преодолевал определенное расстояние.

Для проведения эксперимента по изучению мукоадгезии образцов и однородности их распределения по глазному яблоку кролика после резекции гели предварительно окрашивали метиленовым оранжевым. Глазное яблоко кролика закрепляли в штативе неподвижно, с помощью капельного дозатора в область зрачка наносили каплю образца и замеряли время и расстояние, на которое стекла капля образца геля. Делали вывод о мукоадгезивных свойствах по времени стекания и площади распределения геля.

Изучение биодеградации и кинетики высвобождения действующего вещества из лекарственной формы проводили на тестере растворения DT 820 (ERWEKA GmbH, Германия), в качестве среды растворения использовали искусственную слезную жидкость (натрия хлорид 0,2 %, натрия гидрокарбонат 0,67 %, кальция хлорид дигидрат 0,008 %, вода очищенная, 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты до pH 7,4) [26]. В эксперименте использовался аппарат 5 (USP 5, «Лопасть над диском»), рекомендуемый для определения высвобождения из мягких лекарственных форм. Объем среды растворения – 100,0 мл, скорость вращения лопасти – 50 об/мин, температура среды – 37 ± 0,5 °C. Перед началом теста среду растворения деаэрировали. Диализную пленку OrDial D14b с диаметром пор 12–14 кДа (Orange Scientific, Бельгия) промывали водой очищенной, закрепляли на металлическом диске поверх нанесенной навески образца офтальмологического геля. Пробы отбирали каждые 30 минут. Продолжительность теста «Растворение» составила 180 минут. Объем отбираемой аликвоты – 5 мл. Аликвоты анализировали без предварительной пробоподготовки, измеряя оптическую плотность растворов. Количественное определение метилэтилпиридинола в пробах теста «Растворение» проводили с помощью метода УФ-спектрофотометрии при длине волны 325 ± 2 нм на приборе UV-3600 (Shimadzu Corporation, Япония), программное обеспечение UVProbe 2.42. Раствор сравнения – искусственная слезная жидкость. Методика количественного определения была предварительно валидирована в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методик» по показателям специфичности, линейности, прецизионности. Валидационные характеристики метода подтверждены. Скорость высвобождения лекарственного вещества рассчитывали по уравнению диффузии [27].

Статистическую обработку результатов определения мукоадгезии и высвобождения лекарственного вещества из лекарственной формы (по шести измерениям) проводили по критерию Стьюдента (доверительная вероятность 0,95).

Биодеградацию образцов гелей фиксировали визуально при осмотре диализного диска аппарата 5 (USP) в процессе проведения теста «Растворение» и по его завершении.

Стабильность лекарственной формы оценивали на трех лабораторных сериях в долгосрочных испытаниях с целью установления срока годности в соответствии с ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» при температуре 25 ± 2 °C и относительной влажности 60 ± 5 % в климатической камере KBF-S 115 (BINDER GmbH, Германия). Стрессоустойчивость лекарственной формы определяли также для трех лабораторных серий по воздействию температуры 50 ± 1 °C (плюс 10 °C к температуре в краткосрочных испытаниях [25]), pH в диапазоне от 6 до 8 и фотостабильность.

Определение местнораздражающего действия проводили методом конъюнктивальной пробы. В качестве экспериментальных животных использовали 10 кроликов породы шиншилла массой 3,5–4,0 кг. Исследования проводили на основании «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Содержание животных и уход за ними осуществляли в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Инстилляцию геля (0,1 мл) осуществляли три раза в сутки в течение 1 недели. Один глаз служил для нанесения средства, другой являлся контролем, в него вводили 0,1 мл воды очищенной соответственно. Отмечали выраженность гиперемии, отека конъюнктивы, инъекцию сосудов склеры, состояние роговицы и радужной оболочки, количество и качество выделений из глаза в течение 14 дней, которые оценивали в баллах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования изучали мукоадгезивные свойства образцов гелей метилэтилпиридинола. По результатам исследования мукоадгезии *методами in vitro* и *ex vivo* (рисунок 1) наилучшими адгезивными характеристиками обладал образец с содержанием полимера Natrosol™ 250 HHX 1,5 %, который имел минимальную скорость потока: *in vitro* – $2{,}7 \cdot 10^6$ м/с, что более чем в 70 раз меньше, чем образец с концентрацией 1,25 %; *ex vivo* – $2{,}3 \cdot 10^6$ м/с, что также ниже почти в полтора раза по сравнению с образцом с концентрацией 1,25 % и в 5,5 раз по сравнению с образцом с концентрацией 1,0 %. Оба использовавшихся метода давали коррели-

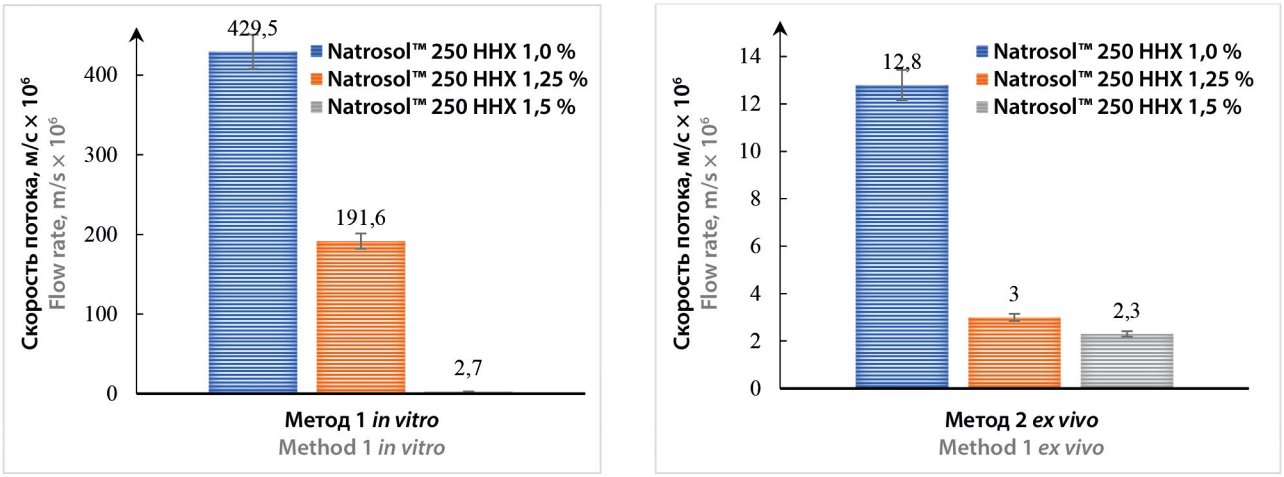


Рисунок 1. **Результаты определения мукоадгезии по скорости потока на моделях *in vitro* (А) и *ex vivo* (Б)**

Figure 1. **Results of mucoadhesion determination by flow velocity in *in vitro* (A) and *ex vivo* models (B)**

рующие результаты. Мукоадгезивные свойства определяют длительность экспозиции системы доставки и, как следствие, эффективность терапии и приверженность ей пациентов.

На следующем этапе изучали высвобождение метилэтилпиридинола из экспериментальных образцов гелей с различным содержанием гелеобразователя. На рисунке 2 изображен график изменения скорости высвобождения метилэтилпиридинола из образцов на основе Natrosol™ 250 HHX 1,0 %, 1,25 % и 1,5 %. Наиболее пролонгированное высвобождение лекарственного вещества из геля продемонстрировал образец с содержанием гидроксиэтилцеллюлозы 1,5 %: к 30-й минуте теста скорость высвобождения была более чем в 2,1 раза ниже, чем из образца на основе 1,0 % Natrosol™ 250 HHX, и в 1,58 раз ниже, чем из образца на основе 1,25 % Natrosol™ 250 HHX. Наивысшую скорость высвобождения образцы демонстрируют на 35–40-й минуте теста «Растворение», после чего скорость постепенно снижается и к третьему

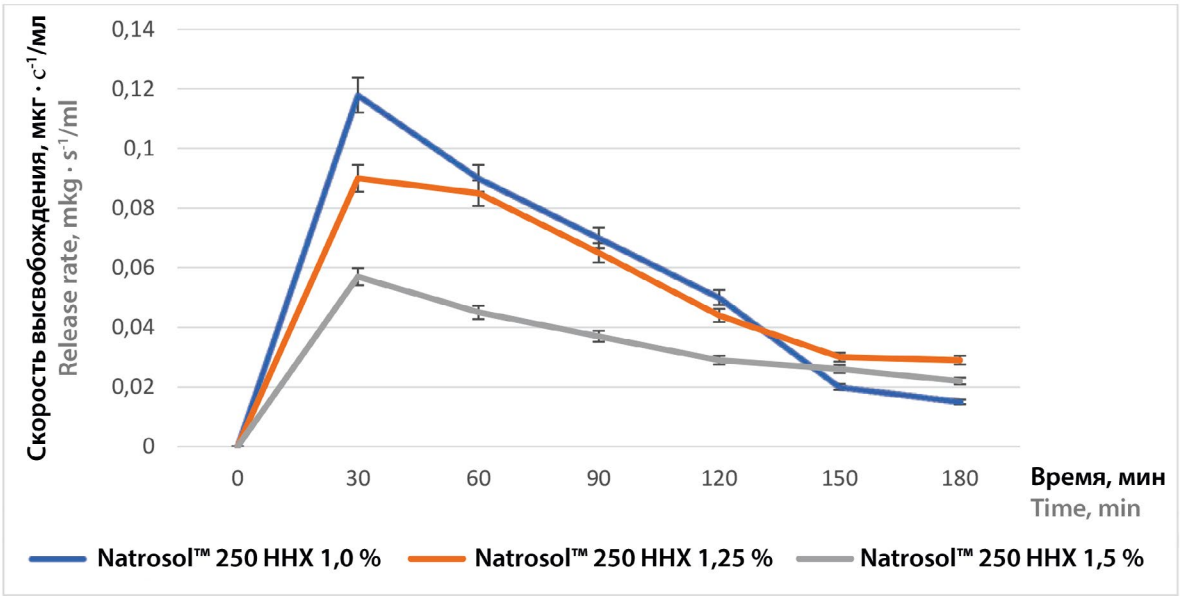


Рисунок 2. **Профиль изменения скорости высвобождения метилэтилпиридинола из образцов офтальмологических гелей в среду искусственной слезной жидкости**

Figure 2. **Methyl ethylpyridinol release rate profile from ophthalmic gel samples in artificial tear fluid medium**

часу выходит на плато. Биодеградация образцов наступает менее чем за 30 минут теста «Растворение». Лучшими биоадгезивными свойствами обладал образец на основе Natrosol™ 250 HHX 1,5 %, также он показал наиболее медленное высвобождение метилэтилпиридинола, поэтому этот образец использовали для дальнейших исследований.

Одним из определяющих параметров лекарственной формы наряду с эффективностью является стабильность. В долгосрочных испытаниях разработанной лекарственной формы показатели качества геля метилэтилпиридинола соответствовали критериям приемлемости в отношении внешнего вида и функциональных характеристик (цветности, прозрачности, стерильности, pH, однородности массы и дозы) в течение 24 месяцев. Таким образом, при соотнесении полученных данных с данными по краткосрочным испытаниям [20] срок годности разработанного геля составляет 2 года.

Во время проведения стрессовых испытаний при температурном воздействии показатели качества лекарственной формы соответствовали спецификации в течение 5 месяцев, затем показатели цветности и pH вышли за пределы приемлемости. Фотостабильность лекарственная форма демонстрировала в течение 1 года. В течение 2 лет она была стабильна в интервале pH 6,5–7,5. При pH 6,0 ± 0,1 параметры геля не выходили за нормы спецификации в течение 6 месяцев, а при pH 8,0 ± 0,1 – в течение 1 месяца.

Затем изучали местнораздражающее действие геля метилэтилпиридинола, результаты представлены в таблице 1.

В проведенном исследовании геля по определению и оценке местнораздражающего действия на глаза лабораторных животных степень местнораздражающего действия соответствует «слабому или отсутствует» (0–1 балл).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были определены основные биофармацевтические характеристики разработанного офтальмологического геля метилэтилпиридинола и показано, что он может быть использован как система доставки для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки, так как обладает выраженными биоадгезивными свойствами, пролонгированным высвобождением. Срок годности готовой лекарственной формы составил 2 года. Проведены стрессовые исследования геля метилэтилпиридинола. Разработанный офтальмологический гель не обладает местнораздражающим действием. Дальнейшей разработкой темы станут доклинические и клинические исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. He S., Stankowska D. L., Ellis D. Z., Krishnamoorthy R. R., Yorio T. Targets of Neuroprotection in Glaucoma. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2018;34(1–2):85–106. DOI: 10.1089/jop.2017.0041.

Таблица 1. Результаты изучения местнораздражающего действия геля метилэтилпиридинола на глаза с 1-го по 14-й день

Table 1. Results of the study of the local irritant effect of methylpyridinol gel on the eyes from day 1 to day 14

Кролик № / **Баллы** / Rabbit № / Points — **Признаки местнораздражающего действия** / Signs of local irritant effect	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**Среднее** / Average
Покраснение века и бульбарная конъюнктива, не затрагивающая роговицу и радужную оболочку / Eyelid redness and bulbar conjunctiva not affecting the cornea and iris	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0,4
Отек век / Eyelid edema	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0,2
Выделения / Emissions from the eye	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
Помутнение роговицы – степень плотности, участок наибольшей плотности / Corneal opacity – degree of density, area of greatest density	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Площадь поражения роговицы / Corneal lesion area	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2. Jeon S., Oh I. H. Regeneration of the retina: toward stem cell therapy for degenerative retinal diseases. *BMB Reports*. 2015;48(4): 193–199. DOI: 10.5483/bmbrep.2015.48.4.276.
3. Zhang N., Wang J., Li Y., Jiang B. Prevalence of primary open angle glaucoma in the last 20 years: a meta-analysis and systematic review. *Scientific Report*. 2021;11(1):13762. DOI: 10.1038/s41598-021-92971-w.
4. Kisa A., Kisa S., Renzaho A. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*. 2021;9(2):e144–e160. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7.
5. Нероев В. В., Зайцева О. В., Михайлова Л. А. Заболеваемость диабетической ретинопатией в Российской Федерации по данным Федеральной статистики. *Российский офтальмологический журнал*. 2018;11(2):5–9. DOI: 10.21516/2072-0076-2018-11-2-5-9.
6. Паштаев Н. П., Иванова Т. Г., Горбунова Н. Ю., Артемьева Т. Ф., Маркова А. А., ред. Комплексное лечение пациентов глаукомной оптической нейропатией: практическое руководство для врачей. Чебоксары: ГОУ «Институт усовершенствования врачей»; 2008. 24 с.
7. Егоров Е. А., Гветадзе А. А. Новые возможности применения метилэтилпиридинола в офтальмологической практике. *РМЖ «Клиническая офтальмология»*. 2018;19(4):190–192. DOI: 10.21689/2311-7729-2018-18-4-190-192.
8. Obukhova L. K., Nakaidze N. Sh., Serebryany A. M., Smirnov L. D., Akifiev A. P. Experimental analysis of the mechanisms of ageing in Drosophila melanogaster. *Experimental gerontology*. 1979;14(6):335–341. DOI: 10.1016/0531-5565(79)90046-9.
9. Даутова З. А., Митрофанова Н. В. Применение препарата Эмоксипин в комплексном лечении глаукомы. *Практическая медицина*. 2016;2:150–156.
10. Ченцова Е. В., Алексеева И. Б. Куликов А. Н. Диагностика и лечение первичной открытоугольной глаукомы. Федеральные клинические рекомендации. М.: ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России; 2012. 32 с.
11. Stavitskaya T. V., Egorov E. A.,Voitova S. P. Study of Separate and Combination application Timoptic XL. *Ophthalmic research*. 1999;1(31):45.
12. Ставицкая Т. В. Изучение фармакокинетики прямых нейропротекторов, применяемых у больных глаукомой. *Клиническая офтальмология*. 2003;2(4):61–63.
13. Ставицкая Т. В. Нейропротекторное действие некоторых гипотензивных препаратов. *Глаз*. 2004;3(37):31–37.
14. Kim Y. H., Lin M. C., Radke C. J. Central-to-peripheral corneal edema during wear of embedded-component contact lenses. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2022;45(1):101443. DOI: 10.1016/j.clae.2021.101443.
15. Liu Y. M., Xie P. The Safety of Orthokeratology-A Systematic Review. *Eye contact lens*. 2016;42(1):35–42. DOI: 10.1097/ICL.0000000000000219.
16. Cassano R., Di Gioia M. L., Trombino S. Gel-Based Materials for Ophthalmic Drug Delivery. *Gels*. 2021;7(3):130. DOI: 10.3390/gels7030130.
17. Jeon S., OhI. H. Regeneration of the Retina: Toward Stem Cell Therapy for Degenerative Retinal Diseases. *BMB Reports*. 2015;48(4):193–199. DOI: 10.5483/bmbrep.2015.48.4.276.
18. Sakamoto K., Mori A., Ishii K., Nakahara T. Selective Neuronal Cell Death in Retinal Degenerative Diseases Nihon Yakurigaku. *Zasshi*. 2018;152(2):58–63. DOI: 10.1254/fpj.152.58.
19. Salinger C. L., Gaynes B. I., Rajpal R. K. Innovations in Topical Ocular Corticosteroid Therapy for the Management of Postoperative Ocular Inflammation and Pain. *The American journal of managed care*. 2019;25(12 Suppl):S215–S226.
20. Анурова М. Н., Лапик И. В., Бахрушина Е. О., Кречетов С. П., Краснюк И. И. Технологические аспекты фармацевтической разработки офтальмологического геля эмоксипина. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2017;4:117–123.
21. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Лапик И. В., Шитова А. С., Краснюк И. И. Определение осмотической активности офтальмологических гелей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3(24):36–40.
22. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Лапик И. В., Кречетов С. П. Современные аспекты создания глазных лекарственных форм: Определение реологических оптимумов офтальмологических гелей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4(21):46–52.
23. Tripathi R., Balne P. K., Sinha N. R., Martin L. M., Kamil S., Landreneau J. R., Gupta S., Rodier J. T., Sinha P. R., Hesemann N. P., Hofmann A. C., Fink M. K., Chaurasia S. S., Mohan R. R. A Novel Topical Ophthalmic Formulation to Mitigate Acute Mustard Gas Keratopathy In Vivo: A Pilot Study. *Translational vision science & technology*. 2020;9(12):6. DOI: 10.1167/tvst.9.12.6.
24. Glickman R. D., Onorato M., Campos M. M., O'Boyle M. P., Singh R. K., Zarembinski T. I., Binette F., Nasonkin I. O. Intraocular Injection of HyStem Hydrogel Is Tolerated Well in the Rabbit Eye. *Journal ocular pharmacology & theraupetics*. 2021;37(1):60–71. DOI: 10.1089/jop.2020.0042.
25. Bakhrushina E., Anurova M., Demina N., Kashperko A., Rastopchina O., Bardakov A., Krasnyuk I. Comparative Study of the Mucoadhesive Properties of Polymers for Pharmaceutical Use. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2020;8(A):639–645. DOI: 10.3889/oamjms.2020.4930.
26. Bao Q., Newman B., Wang Y., Choi S., Burgess D. J. In vitro and ex vivo correlation of drug release from ophthalmic ointments. *Journal of Controlled Release*. 2018;276:93–101. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.03.003.
27. Краснюк И. И., Демина Н. Б., Анурова М. Н., Соловьева Н. Л. Биофармация или основы фармацевтической разработки, производства и обоснования дизайна лекарственных форм. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019. 184 с.

REFERENCES

1. He S., Stankowska D. L., Ellis D. Z., Krishnamoorthy R. R., Yorio T. Targets of Neuroprotection in Glaucoma. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2018;34(1–2):85–106. DOI: 10.1089/jop.2017.0041.
2. Jeon S., Oh I. H. Regeneration of the retina: toward stem cell therapy for degenerative retinal diseases. *BMB Reports*. 2015;48(4): 193–199. DOI: 10.5483/bmbrep.2015.48.4.276.
3. Zhang N., Wang J., Li Y., Jiang B. Prevalence of primary open angle glaucoma in the last 20 years: a meta-analysis and systematic review. *Scientific Report*. 2021;11(1):13762. DOI: 10.1038/s41598-021-92971-w.
4. Kisa A., Kisa S., Renzaho A. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*. 2021;9(2):e144–e160. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7.
5. Neroev V. V., Zaytseva O. V., Mikhailova L. A. Incidence of diabetic retinopathy in the russian federation according to federal statistics. *Russian Ophthalmological Journal*. 2018;11(2):5–9. (In Russ.) DOI: 10.21516/2072-0076-2018-11-2-5-9. (In Russ.)
6. Pashtaev N. P., Ivanona T. G., Gorbunova N. Yu., Artem'eva T. F., Markova A. A., editors. Comprehensive treatment of patients with glaucoma optic neuropathy: a practical guide for physicians. Cheboksary: GOU «Institute for the Improvement of Physicians»; 2008. 24 p. (In Russ.)
7. Egorov E. A., Gvetadze A. A. New possibilities of using methylaethylpiridinolum in ophthalmological practice. *RMJ "Clinical ophthalmology"*. 2018;4:190–192. (In Russ.)
8. Obukhova L. K., Nakaidze N. Sh., Serebryany A. M., Smirnov L. D., Akifiev A. P. Experimental analysis of the mechanisms of ageing in Drosophila melanogaster. *Experimental gerontology*. 1979;14(6):335–341. DOI: 10.1016/0531-5565(79)90046-9.
9. Dutova Z. A., Mitrofanova N. V. The use of Emoxipin in the complex treatment of glaucoma. *Practical medicine*. 2016;2:150–156. (In Russ.)

10. Chentsova E. V., Alexeeva I. B. Kulikov A. N. Diagnostics and treatment of primary open angle glaucoma. Federal clinical guidelines. Moscow: FGBU "MRI GB named after Helmholtz" of the Ministry of Health and Social Development of Russia; 2012. 32 c. (In Russ.)
11. Stavitskaya T. V., Egorov E. A.,Voitova S. P. Study of Separate and Combination application Timoptic XL. *Ophthalmic research*. 1999;1(31):45.
12. Stavitskaya T. V. Study of the pharmacokinetics of direct neuroprotectors used in patients with glaucoma. *Russian Journal of Clinical Ophthalmology*. 2003;2(4):61–63. (In Russ.)
13. Stavitskaya T. V. Neuroprotective effect of some antihypertensive drugs. *The Eye*. 2004;3(37):31–37. (In Russ.)
14. Kim Y. H., Lin M. C., Radke C. J. Central-to-peripheral corneal edema during wear of embedded-component contact lenses. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2022;45(1):101443. DOI: 10.1016/j.clae.2021.101443.
15. Liu Y. M., Xie P. The Safety of Orthokeratology-A Systematic Review. *Eye contact lens*. 2016;42(1):35–42. DOI: 10.1097/ICL.0000000000000219.
16. Cassano R., Di Gioia M. L., Trombino S. Gel-Based Materials for Ophthalmic Drug Delivery. *Gels*. 2021;7(3):130. DOI: 10.3390/gels7030130.
17. Jeon S., Ohl. H. Regeneration of the Retina: Toward Stem Cell Therapy for Degenerative Retinal Diseases. *BMB Reports*. 2015;48(4):193–199. DOI: 10.5483/bmbrep.2015.48.4.276.
18. Sakamoto K., Mori A., Ishii K., Nakahara T. Selective Neuronal Cell Death in Retinal Degenerative Diseases Nihon Yakurigaku. *Zasshi*. 2018;152(2):58–63. DOI: 10.1254/fpj.152.58.
19. Salinger C. L., Gaynes B. I., Rajpal R. K. Innovations in Topical Ocular Corticosteroid Therapy for the Management of Postoperative Ocular Inflammation and Pain. *The American journal of managed care*. 2019;25(12 Suppl):S215–S226.
20. Anurova M. N., Lapik I. V., Bakhrushina E. O., Krechetov S. P., Krasnyuk I. I. Technological aspects of emoxipine ophthalmic gel formulation development. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2017;4:117–123. (In Russ.)
21. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Lapik I. V., Shitova A. S., Krasnyuk I. I. The study of the osmotic activity of ophtalmic gels. *Drug development & registration*. 2018;(3):30–34. (In Russ.)
22. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Lapik I. V., Krechetov S. P. The determination of the rheological optimum of ophthalmic gels. Modern aspects of the ophthalmic dosage forms development. *Drug development & registration*. 2017;(4):64–70. (In Russ.)
23. Tripathi R., Balne P. K., Sinha N. R., Martin L. M., Kamil S., Landreneau J. R., Gupta S., Rodier J. T., Sinha P. R., Hesemann N. P., Hofmann A. C., Fink M. K., Chaurasia S. S., Mohan R. R. A Novel Topical Ophthalmic Formulation to Mitigate Acute Mustard Gas Keratopathy In Vivo: A Pilot Study. *Translational vision science & technology*. 2020;9(12):6. DOI: 10.1167/tvst.9.12.6.
24. Glickman R. D., Onorato M., Campos M. M., O'Boyle M. P., Singh R. K., Zarembinski T. I., Binette F., Nasonkin I. O. Intraocular Injection of HyStem Hydrogel Is Tolerated Well in the Rabbit Eye. *Journal ocular pharmacology & theraupetics*. 2021;37(1):60–71. DOI: 10.1089/jop.2020.0042.
25. Bakhrushina E., Anurova M., Demina N., Kashperko A., Rastopchina O., Bardakov A., Krasnyuk I. Comparative Study of the Mucoadhesive Properties of Polymers for Pharmaceutical Use. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2020;8(A):639–645. DOI: 10.3889/oamjms.2020.4930.
26. Bao Q., Newman B., Wang Y., Choi S., Burgess D. J. In vitro and ex vivo correlation of drug release from ophthalmic ointments. *Journal of Controlled Release*. 2018;276:93–101. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.03.003.
27. Krasnyuk I. I., Demina N. B., Anurova M. N, Solovyova N. L. Biopharmacy or the basics of pharmaceutical development, production and justification of the design of dosage forms. Moscow: GEOTAR-Media; 2019. 184 p. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-49-57
УДК 615.014.2

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и изучение антибактериальных покрытий *in situ* для обработки имплантатов

Е. О. Бахрушина[1]✉, А. А. Попова[1], М. В. Помыткина[1], М. Н. Анурова[1, 2], Н. Б. Демина[1], И. И. Краснюк[1]

[1] Институт фармации им. А. П. Нелюбина Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета), 119571, Россия, г. Москва, просп. Вернадского, д. 96, корп. 1
[2] Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора), 125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

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

ORCID: Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; А. А. Попова – https://orcid.org/0000-0002-3874-8626; М. В. Помыткина – https://orcid.org/0000-0002-6380-1302; М. Н. Анурова – https://orcid.org/0000-0002-7649-9616; Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; И. И. Краснюк – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Статья поступила: 18.07.2022 **Статья принята в печать:** 29.06.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Перипротезные инфекции являются серьезной проблемой ортопедической хирургии. Наиболее оптимальный способ воздействия на бактериальную пленку заключается в подавлении ранних стадий ее образования. Использование гидрогелевых покрытий для профилактики перипротезных инфекций является эффективной мерой, при этом процесс нанесения покрытия на имплантат можно упростить благодаря применению технологии создания *in situ* систем.

Цель. Целью исследования является разработка и изучение антибактериальных in situ покрытий для предоперационной обработки имплантатов.

Материалы и методы. В эксперименте использовали полоксамеры Kolliphor® P 407 и Kolliphor® P 188 (BASF, Германия), гиалуроновую кислоту высокомолекулярную PrincipHYAL® (1400–1800 кДа), низкомолекулярную PrincipHYAL® (400–600 кДа), смесь из высоко-, средне- и низкомолекулярных кислот PrincipHYAL® Cube3 (ROELMI HPC Srl, Италия). В качестве скрининговых методов для выявления оптимальной композиции использовали измерение температуры гелеобразования, изучение pH, реологические исследования, микробиологические тесты.

Результаты и обсуждение. В ходе эксперимента была установлена оптимальная концентрация гиалуроновой кислоты 1400–1800 кДа – 0,5 %, при которой полученный состав при температуре 4,5 ± 0,5 °C представлял собой гомогенную жидкость, а при нагревании осуществлял золь-гель переход. Было выявлено, что гиалуроновая кислота не оказывает значительного влияния на температуру гелеобразования, в связи с чем добавили полоксамер 188. Было установлено влияние молекулярной массы гиалуроновой кислоты на характеристики систем *in situ*. Высокомолекулярная гиалуроновая кислота стабилизировала показатели вязкости и улучшила адгезивные свойства системы, образцы с низкомолекулярной гиалуроновой кислотой, а также смесью из высоко-, средне- и низкомолекулярных кислот продемонстрировали меньшие показатели динамической вязкости по окончании фазового золь-гель перехода. Было проведено исследование адгезии оптимального состава, содержащего 18,0 % полоксамера 407, 2 % полоксамера 188 и 0,5 % гиалуроновой кислоты (1400–1800 кДа), к титановой пластине. При воздействии лопастной мешалки (скорость вращения 20 об/мин) в течение 15 минут и при хранении в термостате (37,0 ± 0,5 °C) в течение недели анализируемый состав продемонстрировал прочность адгезии, что обусловливает возможность использования его для создания покрытия.

Заключение. Путем многостадийного скрининга был отобран образец для введения модельного антибактериального компонента, представляющего собой коктейль бактериофагов *Klebsiella pneumonia, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*. Микробиологические исследования показали хорошую совместимость иммунобиологической субстанции со вспомогательными веществами, что обозначило перспективность проведения дальнейших доклинических исследований.

Ключевые слова: *in situ* гелеобразование, покрытие имплантатов, перипротезные инфекции, гиалуроновая кислота, полоксамер, бактериофаги

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

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина, А. А. Попова придумали и разработали эксперимент. Е. О. Бахрушина, А. А. Попова, М. В. Помыткина, М. Н. Анурова проводили различные экспериментальные работы. Е. О. Бахрушина и А. А. Попова участвовали в обработке данных. М. В. Помыткина проводил теоретические расчеты. Е. О. Бахрушина и А. А. Попова участвовали в написании текста статьи. Н. Б. Демина и И. И. Краснюк участвовали в рецензировании и одобрении статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании InVita за предоставление образцов гиалуроновой кислоты, московскому офису компании BASF за предоставление образцов полоксамеров. Авторы благодарят сотрудников лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, а также руководителя лаборатории Андрея Владимировича Алешкина за помощь в проведении экспериментов и интерпретации результатов.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Попова А. А., Помыткина М. В., Анурова М. Н., Демина Н. Б., Краснюк И. И. Разработка и изучение антибактериальных покрытий *in situ* для обработки имплантатов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):49–57. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-49-57

© Бахрушина Е. О., Попова А. А., Помыткина М. В., Анурова М. Н., Демина Н. Б., Краснюк И. И., 2023
© Bakhrushina E. O., Popova A. A., Pomytkina M. V., Anurova M. N., Demina N. B., Krasnyuk I. I., 2023

Development and Study of Antibacterial *In situ* Coatings for Processing Implants

Elena O. Bakhrushina[1]✉, Anna A. Popova[1], Maria V. Pomytkina[1], Maria N. Anurova[1, 2], Natalia B. Demina[1], Ivan I. Krasnyuk[1]

[1] A. P. Nelyubin Institute of Pharmacy. I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University, 96/1, Vernadsky Avenue, Moscow, 119571, Russia
[2] G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare (FBIS MRIEM named after G. N. Gabrichevsky Rospotrebnadzor), 10, Admirala Makarova str., Moscow, 125212, Russia

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

ORCID: Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; Anna A. Popova – https://orcid.org/0000-0002-3874-8626; Maria V. Pomytkina – https://orcid.org/0000-0002-6380-1302; Maria N. Anurova – https://orcid.org/0000-0002-7649-9616; Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Ivan I. Krasnyuk – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Received: 18.07.2022 **Revised:** 29.06.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Periprosthetic infections are a major problem in orthopedic surgery. The most optimal way to influence the bacterial film is to suppress the early stages of its formation. The use of hydrogel coatings for the prevention of periprosthetic infections is an effective measure, while the process of coating the implant can be simplified due to the use of *in situ* systems.

Aim. The purpose of the research is to develop and study antibacterial *in situ* coatings for preoperative treatment of implants.

Materials and methods. In the experiment we used poloxamers Kolliphor® P 407 and Kolliphor® P 188 (BASF, Germany), hyaluronic acid high-molecular PrincipHYAL® (1400–1800 kDa), low-molecular PrincipHYAL® (400–600 kDa), mixture of high, medium and low-molecular acids PrincipHYAL® Cube3 (ROELMI HPC Srl, Italy). As screening methods for identifying the optimal composition, we used gelation temperature measurements, pH measurements, studies of rheological properties, and microbiological tests.

Results and discussion. During the experiment, we found the optimal concentration of hyaluronic acid 1400–1800 kDa – 0.5 %, at which the studied composition at a temperature of 4.5 ± 0.5 °C was a homogeneous liquid, and it made a sol-gel transition when heated. It was revealed that hyaluronic acid had no significant effect on the gelling temperature, so we added poloxamer 188. We also established the influence of the hyaluronic acid molecular weight on the in situ systems characteristics. High molecular weight hyaluronic acid stabilized the viscosity values and improved the adhesive properties of the system, samples with medium and low molecular weight hyaluronic acid showed lower dynamic viscosity values at the phase gel-sol transition end. We tested the optimal composition (containing 18.0 % poloxamer 407, 2 % poloxamer 188, and 0.5 % hyaluronic acid (1400–1800 kDa) adhesion to the titanium plate. When exposed to the paddle stirrer (rotation speed 20 rpm) for 15 minutes and stored in the thermostat (37,0 ± 0,5 °C) for a week, the analyzed composition showed adhesion strength, which makes it possible to use it for coating.

Conclusion. By multistage screening a sample was selected for introduction of a model antibacterial component representing a cocktail of bacteriophages *Klebsiella pneumonia, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*. Microbiological studies showed good compatibility of the immunobiological substance with excipients, which indicated the prospects for further preclinical studies.

Keywords: *in situ* gelling, implant coating, periprosthetic infections, hyaluronic acid, poloxamer, bacteriophages

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

Contribution of the authors. Elena O. Bakhrushina, Anna A. Popova designed and developed an experiment. Elena O. Bakhrushina, Anna A.Popova, Maria V. Pomytkina, Maria N. Anurova carried out various experiments. Elena O. Bakhrushina and Anna A. Popova participated in data processing. Maria V. Pomytkina carried out theoretical calculations. Elena O. Bakhrushina and Anna A. Popova participated in writing the text of the article. Natalia B. Demina and Ivan I. Krasnyuk participated in the review and approval of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to InVita for providing hyaluronic acid samples, and to the Moscow office of BASF for providing poloxamer samples. The authors thank the staff of the Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages of the Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G. N. Gabrichevsky, as well as the head of the laboratory, Andrey V. Aleshkin for their help in conducting experiments and interpreting the results.

For citation: Bakhrushina E. O., Popova A. A., Pomytkina M. V., Anurova M. N., Demina N. B., Krasnyuk I. I. Development and study of antibacterial *in situ* coatings for processing implants. *Drug development & registration*. 2023;12(3):49–57. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-49-57

ВВЕДЕНИЕ

Перипротезные инфекции являются одной из наиболее серьезных проблем современной ортопедической хирургии. Они могут возникать периоперационно в результате прямой микробной контаминации во время операции или постоперационно путем гематогенного распространения микроорганизмов из отдаленного источника хронической инфекции. Удаление инфицированных имплантатов с последующим иссечением поврежденных тканей и костей и длительной антимикробной терапией в настоящее время является единственной возможностью излечить эти инфекции [1]. К 2050 году прогнозируется рост числа первичных артропластических операций и еще более быстрое увеличение количества повторных вмешательств, что создаст значительную нагрузку для системы здравоохранения [2].

В последние годы использование ортопедических устройств значительно возросло, что привело к увеличению случаев возникновения перипротезных инфекций [1].

Имплантаты представляют собой идеальные поверхности для бактериальной адгезии, поскольку они обычно изготовлены из кобальт-хрома, титана, керамики и полиэтилена. Тем не менее существуют стратегии преобразования протезов посредством обработки или покрытия антимикробными веществами, которые позволяют избежать формирования бактериальной пленки.

В настоящее время с этой целью используется гидрогель Defensive Antibacterial Coating (DAC®) (Novagenit, Италия), разработанный для предотвращения адгезии бактерий к протезному суставу и высвобождающий антибактериальные вещества. Гидрогель состоит из двух биодеградируемых поликислот: природного (гиалуроновой) и синтетического (полимолочной) происхождения. DAC® выпускается в форме стерильного порошка для приготовления гидрогеля путем разведения его водой для инъекций или раствором антибактериального активного фармацевтического ингредиента (АФИ). Производителем предлагается наносить полученный перед применением гидрогель на имплантат с помощью специальных инструментов.

Исследуются различные способы предотвращения адгезии бактерий к костным и суставным протезам с использованием покрытия антибиотиками. Однако за последнее десятилетие скорость развития устойчивости к антибиотикам растет угрожающими темпами. Наблюдается значительное снижение разработки новых антибактериальных препаратов фармацевтическими компаниями для преодоления резистентности бактерий. Эта тенденция привела к изучению альтернативных антимикробных стратегий [3].

Проводится множество исследований использования антисептических веществ, а также бактериофагов. Фаготерапия вновь стала потенциальной альтернативой антибиотикам для лечения сложных инфекций, включая инфекции костей и суставов. Фаги демонстрируют активность *in vitro* в отношении клинически значимых бактерий, включая устойчивые к антибиотикам штаммы [4]. Применение фагов может быть особенно эффективно в условиях, когда терапия антибиотиками нерезультативна [5]. Действительно, воздействовать на предварительно сформированную или зрелую бактериальную пленку сложно, и наиболее оптимальный способ борьбы с инфекциями заключается в подавлении ранних стадий ее образования [6].

В исследовании [7] в гидрогель DAC® добавили бактериофаги, обладающие выраженной активностью в отношении бактериальных пленок. Были отмечены синергетические эффекты при сочетании бактериофагов с антибиотиками, используемыми в самых низких концентрациях.

Таким образом, использование гидрогелевых покрытий для профилактики перипротезных инфекций является эффективной мерой, при этом процесс нанесения покрытия на имплантат можно упростить благодаря применению технологии создания *in situ* систем.

Гелеобразующие системы доставки лекарств *in situ* привлекли огромное внимание за последнее десятилетие. Перед введением они находятся в жидком состоянии и способны образовывать гели в ответ на различные эндогенные стимулы, такие как повышение температуры, изменение pH и присутствие ионов [8]. Такие системы можно вводить различными путями для обеспечения таргетной или системной доставки АФИ [9,10]. *In situ* гели для обработки поверхности имплантатов имеют значительные преимущества перед имеющимися на фармацевтическом рынке гидрогелями: их нанесение и равномерное распределение не требует длительных манипуляций, и его возможно осуществлять как путем погружения имплантата в золь перед установкой, так и при помощи напыления жидкости с использованием спрея. Застывание системы в таком случае потенцируется термостимулом при имплантировании, что приводит к тому, что гидрогелевое покрытие равномерно распределяется по поверхности протеза и способствует пролонгированному высвобождению АФИ для профилактики и лечения перипротезных инфекций.

Цель работы: разработать оптимальное *in situ* покрытие для имплантатов на основе полоксамера 407 и гиалуроновой кислоты, изучить влияние гиалуроновой кислоты на термореверсивные, реологические и адгезивные характеристики системы в долгосрочной перспективе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для создания термореверсивных композиций в эксперименте использовали следующие материалы: полоксамер 407 Kolliphor® P 407, полоксамер 188 Kolliphor® P 188 (BASF, Германия), гиалуроновую кислоту высокомолекулярную PrincipHYAL® (1400–1800 кДа), низкомолекулярную гиалуроновую кислоту PrincipHYAL® (400–600 кДа), смесь из трех гиалуроновых кислот высоко-, средне- и низкой молекулярных масс PrincipHYAL® Cube3 (ROELMI HPC Srl, Италия).

Образцы на основе полоксамеров получали «холодным» методом. Диспергирование и смешивание компонентов проводилось в течение 30 минут на магнитной мешалке C-MAG HS 7 digital (IKA, Германия). Далее образцы отправляли на хранение в фармацевтический холодильник (АО «ПОЗиС», Россия) при температуре 4,5 ± 0,5 °C на 1 сутки (таблица 1).

Температуру гелеобразования у образцов, представляющих собой прозрачные текучие жидкости при извлечении из холодильника, измеряли при нагревании на водяной бане ODA-LQ40 (ODA, Россия) при постоянной температуре 50 ± 1 °C, используя погружной измерительный термозонд (PT 100.30, IKA, Германия), еженедельно на протяжении 12 месяцев. Перед

Таблица 1. Экспериментальные составы поликомпонентных *in situ* композиций

Table 1. Experimental compositions of polycomponent *in situ* composition

Вспомогательные вещества, % Excipients, %	1	2	3	4	5	6	7	8
Полоксамер 407 Poloxamer 407	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
Полоксамер 188 Poloxamer 188	–	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	2,0	2,0
Гиалуроновая кислота высокомолекулярная (1400–1800 кДа) Hyaluronic acid high molecular weight (1400–1800 kDa)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	–
Гиалуроновая кислота низкомолекулярная (400–600 кДа) Hyaluronic acid low molecular weight (400–600 kDa)	–	–	–	–	–	–	0,5	–
Гиалуроновая кислота Cube3 Hyaluronic acid Cube3	–	–	–	–	–	–	–	0,5
Вода очищенная Purified water	до 100,0 ad 100,0							

измерением образцы отстаивались в течение 30 минут при температуре 20 ± 1 °C. За показатель температуры и времени гелеобразования принимали значения, определяемые при увеличении динамической вязкости образца в процессе его перемешивания.

Для обработки полученных экспериментальных данных были использованы статистические методы расчета среднего значения температуры гелеобразования и среднеквадратичного отклонения выборки σ.

Для образцов с оптимальными показателями температуры гелеобразования изучали реологические характеристики, иллюстрирующие изменения структурно-механического поведения при температурном реверсе. Исследование проводили на коаксильном ротационном вискозиметре RM 220 (LAMY RHEOLOGY, Франция) в режиме вращения измерительной геометрии «цилиндр в цилиндре» при постоянной скорости 100 $с^{-1}$ в диапазоне температур от 15,0 до 45,0 ± 0,3 °C. Последовательные пятикратные измерения для одной и той же навески образца, включая в дизайн эксперимента получасовую релаксацию образца при температуре 23 ± 1 °C после снятия сдвигового напряжения, способствовали получению статистически достоверных значений. С помощью pH-метра модели Starter 2100 (OHAUS Corporation, США) измеряли pH оптимальных по анализируемым характеристикам экспериментальных образцов.

На следующем этапе скрининга отбирали образцы с наилучшими показателями стабильности, температуры гелеобразования и реологическими характеристиками для проведения исследования адгезии к титановому покрытию ортопедических пластин. Титановую пластину погружали в полимерную емкость с составом, далее нагревали до температуры гелеобразования. После этого пластину с полученным покрытием помещали в 200 мл фосфатного буферного раствора (pH 6,8), нагретого до температуры 37,0 ± 0,5 °C. В ходе эксперимента устанавливалась прочность удержания *in situ* покрытия на пластине в течение 15 минут при воздействии лопастной верхнеприводной мешалки EUROSTAR 40 digital (IKA, Германия) со скоростью 100 об/мин. Также визуально исследовали продолжительность адгезии покрытия при хранении титановой пластины с нанесенным составом в среде фосфатного буфера в термостате BD 115 (Binder GmbH, Германия) в течение 1 недели при температуре 37,0 ± 0,5 °C.

Заключительный этап разработки состоял в изучении совместимости оптимальной композиции с модельным коктейлем бактериофагов, полученным в ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, и изучении как влияния активной иммунобиологической субстанции на термоселективные свойства системы доставки, так и влияния состава на литическую активность коктейля бактериофагов по методу Грациа [11].

Метод Грациа основан на внесении различных разведений титруемого бактериофага в соответствующую культуру бактерий и посеве на плотную питательную среду с целью получения негативных (на которых отсутствует рост бактериальной культуры или происходит ее лизис в результате попадания частиц бактериофагов) колоний бактериофага. На фоне равномерного роста микроорганизмов отмечаются пятна, где рост отсутствует (полный лизис). При большом количестве бактериофагов наступает лизис микроорганизмов на всей поверхности питательной среды. Когда количество фаговых частиц невелико, то участков лизиса мало и возможно рассчитать количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в 1 мл препарата, допуская, что каждый участок лизиса образовывался в результате действия одной частицы фага [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования экспериментально было установлено содержание высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (ВГК) в составах, необхо-

димое для придания оптимальных характеристик *in situ* системам. В целях сокращения экспериментальных составов, а также времени проведения исследований было предложено считать высшую оптимальную концентрацию ВГК предельной для других видов гиалуроновых кислот, использующихся в работе.

Основными критериями скрининга были: агрегатное состояние образцов и среднее значение показателя температуры гелеобразования. При концентрациях гиалуроновой кислоты 0,75 % и 1 % составы при температуре 4,5 ± 0,5 °С представляли собой плотные, студенистые, гелеобразные массы, в связи с чем они не соответствовали требованиям, предъявляемым к *in situ* системам. Оптимальная концентрация гиалуроновой кислоты, при которой составы являются гомогенными прозрачными жидкостями, составила 0,5 %. Температура золь-гель перехода этих образцов была незначительно выше (27,94 ± 0,87 °С и 29,23 ± 1,43 °С соответственно), чем у чистого полоксамера 407 (>27 °С).

С целью увеличения температуры гелеобразования до значений, приближенных к физиологическим условиям, в которых предполагается применение разрабатываемых покрытий имплантатов, в качестве эксципиента в составы было решено добавить полоксамер 188 [12–15]. Благодаря своей молекулярной массе (средняя молекулярная масса 8400 кДа), меньшей, чем у полоксамера 407 (средняя молекулярная масса 12600 кДа), и большему содержанию полиэтиленоксидных звеньев (80 %) он способствовал повышению температуры фазового перехода *in situ* системы (>30 °С) [12, 13]. Процесс увеличения температуры гелеобразования поликомпонентных составов при добавлении полоксамера 188 обусловливается тем, что критическая концентрация мицеллообразования для полоксамера 188 достигается при более высокой температуре [14, 15].

В таблице 2 приведены результаты измерений температуры гелеобразования бинарных и тройных композиций в процессе долгосрочного хранения – на протяжении 12 месяцев.

Таблица 2. Результаты испытаний экспериментальных составов в процессе долгосрочного хранения

Table 2. Experimental compositions test results during long-term storage

Состав Composition	**Средняя температура гелеобразования, °С (*n* = 12)** Average gelation temperature, °С (*n* = 12)	**Среднеквадратическое отклонение, σ** Standard deviation, σ
1	27,94	1,54
2	29,23	2,53
3	32,53	3,62
4	38,00	2,98
5	39,63	3,29
6	41,31	2,48
7	37,89	1,54
8	41,11	2,52

На основании полученных данных было показано, что гиалуроновая кислота и полоксамер 188 не оказывают достоверного влияния на стабильность показателя температуры гелеобразования [15, 16].

Для изучения реологических характеристик были отобраны образцы 4, 7, 8, представляющие собой трехкомпонентные композиции полоксамеров с гиалуроновой кислотой, обладающие оптимальными значениями температуры гелеобразования (37–40 °С), а также, что немаловажно, большей стабильностью этого показателя, определенного путем расчета среднеквадратичного отклонения результатов при измерении в течение 12 месяцев. Образцы 3 и 5 характеризовались крайней нестабильностью температуры гелеобразования в долгосрочных исследованиях, в то время как образец 6 имел чрезмерно высокую температуру, которая была стабильна относительно прочих результатов в пуле составов (σ = 2,48). Значения pH выбранных образцов приведены в таблице 3. Все полученные композиции имели нейтральный pH, что делает возможным их использование в дальнейшей разработке и потенциальное введение иммунологической субстанции.

Таблица 3. Значения pH экспериментальных образцов (*n* = 10)

Table 3. pH measures of experimental samples (*n* = 10)

Состав Composition	**Значение pH** pH measures
4	7,12 ± 0,2
7	7,36 ± 0,2
8	7,02 ± 0,2

Выбранные образцы были проанализированы с использованием реологических методов для оценки влияния молекулярной массы гиалуроновой кислоты на структурно-механические показатели. На рисунке 1 представлены реограммы выбранных составов 4, 7, 8. Измерения проводились через 24 часа после изготовления и структурирования композиций. По данным приведенных ниже реограмм видно, что форма профилей анализируемых образцов была сопоставима.

При температуре 31,7 ± 0,2 °С у состава 4 наблюдается резкое изменение вязкости, что свидетельствует о начале фазового перехода. Затем происходит линейное увеличение вязкости и выход на плато при значении температуры 37,3 ± 0,2 °С с максимальным значением динамической вязкости в среднем 1,9645 ± 0,0340 Па · с.

Для состава 7 вязкость начинает линейно возрастать при значении температуры 33,5 ± 0,1 °С и выходит на плато при значении 38,7 ± 0,1 °С, максимальное значение динамической вязкости в среднем составляет 1,7899 ± 0,0087 Па · с. На реограмме состава 8 начало фазового перехода отмечается при 34,3 ± 0,2 °С с выходом на плато при температуре 39,8 ± 0,2 °С и достижением максимального значения ди-

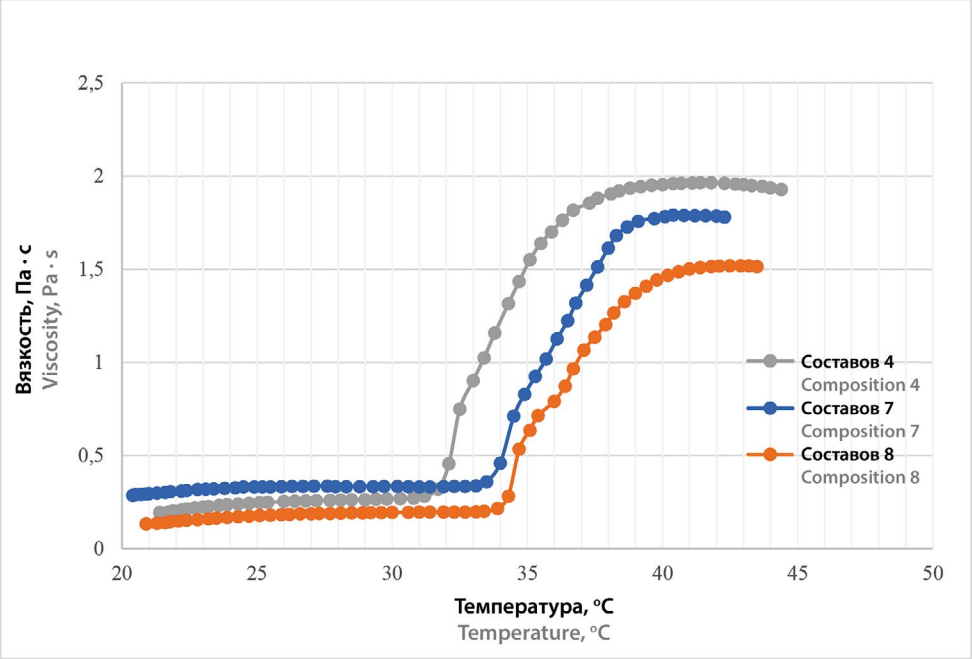


Рисунок 1. **Усредненные реограммы составов 4, 7 и 8, измеренные в диапазоне температур (*n* = 5)**

Figure 1. **Averaged rheograms of compositions 4, 7, and 8 measured over a range of temperatures (*n* = 5)**

намической вязкости, равного в среднем 1,5195 ± 0,0248 Па · с.

По результатам реологического исследования можно отметить, что наибольший показатель динамической вязкости (в среднем 1,9645 ± 0,0083 Па · с) был зафиксирован у образца 8 с высокомолекулярной гиалуроновой кислотой в составе. Образцы 4 и 7 с низкомолекулярной гиалуроновой кислотой и смесью из трех гиалуроновых кислот различной молекулярной массы продемонстрировали меньшие показатели вязкости. Также выход на плато у этих составов происходил при более высокой температуре (38,7 °С и 39,8 °С) [17]

Современные ротационные вискозиметры также находят применение в качестве доступного аналитического оборудования для изучения характера и качественной оценки показателя адгезии полимерной композиции [18]. Известны исследования, описывающие применение ротационной вискозиметрии для изучения мукоадгезии – для смесей полимеров и раствора муцина [18–20]. В настоящем исследовании выбранный на основе ряда тестов образец анализировали по характеру изменения величины напряжения сдвига при раскручивании коаксиальной геометрии от 0 до 5 $с^{-1}$. Этот тест призван проиллюстрировать возможности адгезии состава к материалу внутреннего цилиндра (нержавеющая сталь).

При реологическом исследовании адгезивных свойств состава 4 (рисунок 2) были получены следующие данные: напряжение сдвига при вращении измерительной геометрии на низких скоростях варьируется от 60 до 80 Па, изменяется в узком диапазоне без выраженных пиков, что свидетельствует о высокой степени адгезии состава к поверхности.

По результатам комплекса вышеописанных исследований был выбран состав 4, обладающий оптимальным значением показателя температуры гелеобразования, а также реологическими свойствами, для проведения эксперимента по изучению адгезивной способности к титановому покрытию пластины, использующейся в ортопедической практике.

При погружении пластины, предварительно обработанной составом 4 в качестве *in situ* покрытия, в буферный раствор pH 6,8, термостатируемый при температуре 37,0 ± 0,5 °С, под воздействием лопастной мешалки (скорость вращения 20 об/мин) в течение 15 минут исследуемое покрытие плотно удерживалось на титановой поверхности (рисунок 3).

При дальнейшем хранении пластины с нанесенным составом в термостате при температуре 37,0 ± 0,5 °С в течение 1 недели наблюдалась целостность исследуемого покрытия, отслаивающегося от титановой поверхности спустя 8 дней.

Далее в определенный в ходе проведенных экспериментов как оптимальный состав 4 после автоклавирования вводили иммунобиологическую субстанцию, представляющую собой коктейль бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* KPV 9024 в титре $5 \cdot 10^8$ БОЕ/мл, *Staphylococcus aureus* CH1 в титре $7 \cdot 10^7$ БОЕ/мл и *Escherichia coli* V18 в титре $5 \cdot 10^9$ БОЕ/мл в количестве 2 мл. Было отмечено, что введение модельного коктейля бактериофагов не влияет на структурно-механические показатели, а также условия протекания термореверса. Титр фагов сохранялся в течение 6 месяцев.

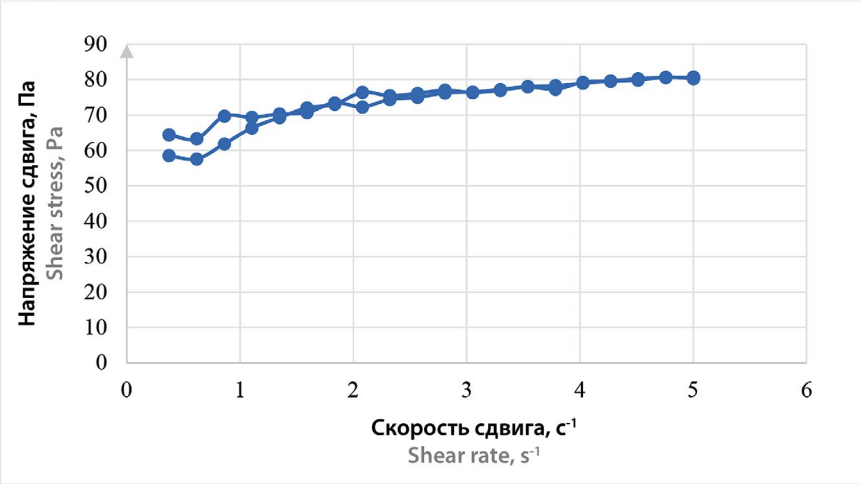
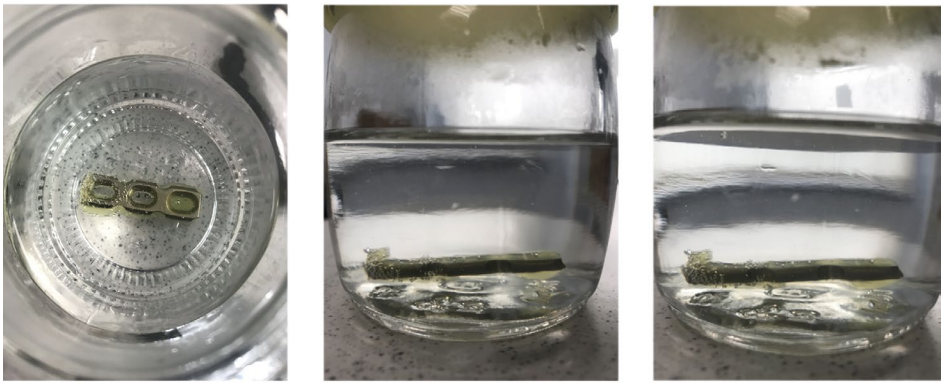


Рисунок 2. **Усредненная кривая течения состава 4 (*n* = 5)**

Figure 2. **Averaged fluidity curve of composition 4 (*n* = 5)**



А
A

Б
B

В
C

Рисунок 3. **Внешний вид титановой пластины с нанесенным покрытием состава полоксамер 407 18,0 %, полоксамер 188 2,0 %, гиалуроновая кислота в/м 0,5 %:**

А – титановая пластина с нанесенным покрытием в начале эксперимента (вид сверху); Б – состояние *in situ* покрытия на титановой пластине после 5 минут эксперимента (вид сбоку); В – состояние *in situ* покрытия на титановой пластине после 15 минут эксперимента (вид сбоку).

Figure 3. **The appearance of a coated titanium plate with poloxamer 407 18.0 %, poloxamer 188 2.0 %, hyaluronic acid h/m 0.5 %:**

A – coated titanium plate at the beginning of the experiment (top view); B – coated titanium plate with *in situ* composition after 5 min experiment (side view); C – coated titanium plate with *in situ* composition after 15 min experiment (side view).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных комплексов экспериментальных работ были предложены состав и технология получения термочувствительного антибактериального покрытия *in situ* для предотвращения перипротезного инфицирования. Путем многостадийного скрининга был отобран образец состава полоксамер 407 18,0 %, полоксамер 188 2,0 %, гиалуроновая кислота в/м 0,5 % для введения модельного антибактериального компонента, представляющего собой коктейль бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Микробиологические исследования показали хорошую совместимость иммунобиологической субстанции со вспомогательными веществами, что обозначило перспективность проведения дальнейших доклинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kucharíková S., Gerits E., De Brucker K., Braem A., Ceh K., Majdič G., Španič T., Pogorevc E., Verstraeten N., Tournu H., Delattin N., Impellizzeri F., Erdtmann M., Krona A., Lövenklev M., Knezevic M., Fröhlich M., Vleugels J., Fauvart M., de Silva W. J., Vandamme K., Garcia-Forgas J., Cammue B. P. A., Michiels J., Van Dijck P., Thevis-

sen K. Covalent immobilization of antimicrobial agents on titanium prevents *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* colonization and biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(4):936–945. DOI: 10.1093/jac/dkv437.
2. Klug A., Gramlich Y., Rudert M., Drees P., Hoffmann R., Weißenberger M., Kutzner K. P. The projected volume of primary and revision total knee arthroplasty will place an immense burden on future health care systems over the next 30 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2021;29(10):3287–3298. DOI: 10.1007/s00167-020-06154-7.
3. Филь А. С., Тараканов В. Н., Куляба Т. А., Корнилов Н. Н. Тренды в первичной артропластике коленного сустава в Национальном медицинском исследовательском центре травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена и их сравнительный анализ с данными международных национальных регистров: схож ли наш путь? *Гений Ортопедии*. 202;26(4):476–483. DOI: 10.18019/1028-4427-2020-26-4-476-483.
4. Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Алешкин А. В., Демина Н. Б., Краснюк И. И., Пятигорская Н. В., Береговых В. В. Некоторые аспекты применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2021;76(4):351–360. DOI: 10.15690/vramn1380.
5. Cano E. J., Caflisch K. M., Bollyky P. L., Van Belleghem J. D., Patel R., Fackler J., Brownstein M. J., Horne B., Biswas B., Henry M., Malagon F., Lewallen D. G., Suh G. A. Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee Klebsiella pneumoniae Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. *Clin Infect Dis*. 2021;73(1):144–151. DOI: 10.1093/cid/ciaa705.
6. Lamret F., Colin M., Mongaret C., Gangloff S. C., Reffuveille F. Antibiotic Tolerance of Staphylococcus aureus Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. *Antibiotics*. 2020;9(9):547. DOI: 10.3390/antibiotics9090547.
7. Ferry T., Batailler C., Petitjean C., Chateau J., Fevre C., Forestier E., Brosset S., Leboucher G., Kolenda C., Laurent F., Lustig S. The Potential Innovative Use of Bacteriophages Within the DAC® Hydrogel to Treat Patients With Knee Megaprosthesis Infection Requiring «Debridement Antibiotics and Implant Retention» and Soft Tissue Coverage as Salvage Therapy. *Frontiers in Medicine*. 2020;7:342. DOI: 10.3389/fmed.2020.00342.
8. Бахрушина Е. О., Демина Н. Б., Шумкова М. М., Родюк П. С., Шуликина Д. С., Краснюк И. И. Интраназальные системы доставки in situ: перспективы применения и основные фармацевтические аспекты разработки (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):54–63. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63.
9. Ijaz U., Sohail M., Usman Minhas M., Khan S., Hussain Z., Kazi M., Ahmed Shah S., Mahmood A., Maniruzzaman M. Biofunctional Hyaluronic Acid/κ-Carrageenan Injectable Hydrogels for Improved Drug Delivery and Wound Healing. *Polymers*. 2022;14(3):376. DOI: 10.3390/polym14030376.
10. Vigani B., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M. C., Caramella C. M., Ferrari F. Recent Advances in the Development of In Situ Gelling Drug Delivery Systems for Non-Parenteral Administration Routes. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):859. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090859.
11. Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Бочкарева С. С., Воробьев А. М., Щербина Ю. О., Пасивкина М. А., Крехтунова Л. О., Демина Н. Б., Алешкин А. В. Разработка и изучение ушных капель с бактериофагами для лечения инфекционных отитов, осложненных *P. aeruginosa*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):74–78. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-74-78.
12. Ruan X., Hu J., Lu L., Wang Y., Tang C., Liu F., Gao X., Zhang L., Wu H., Huang X., Wei Q. Poloxamer 407/188 Binary Thermosensitive Gel as a Moxidectin Delivery System: In Vitro Release and In Vivo Evaluation. *Molecules*. 2022;27(10):3063. DOI: 10.3390/molecules27103063.
13. Russo E., Villa C. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics*. 2019;11(12):671. DOI: 10.3390/pharmaceutics11120671.
14. Mariano K. C. F., Papini J. Z. B., de Faria N. C., Heluany D. N. C., Botega A. L. L., Cereda C. M. S., de Paula E., Tófoli G. R., de Araujo D. R. Ropivacaine-Loaded Poloxamer Binary Hydrogels for Prolonged Regional Anesthesia: Structural Aspects, Biocompatibility, and Pharmacological Evaluation. *BioMed Research International*. 2021;2021:7300098. DOI: 10.1155/2021/7300098.
15. Cui N., Dai C. Y., Mao X., Lv X., Gu Y., Lee E. S., Jiang H. B., Sun Y. Poloxamer-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Gels*. 202;8(6):360. DOI: 10.3390/gels8060360.
16. Alexandridis P., Holzwarth J. F., Hatton T. A. Micellization of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions-Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules*. 1994;27:2414–2425. DOI: 10.1021/MA00087A009.
17. Del Castillo-Santaella T., Yang Y., Martínez-González I., Gálvez-Ruiz M. J., Cabrerizo-Vílchez M. Á., Holgado-Terriza J. A., Selles-Galiana F., Maldonado-Valderrama J. Effect of Hyaluronic Acid and Pluronic-F68 on the Surface Properties of Foam as a Delivery System for Polidocanol in Sclerotherapy. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1039. DOI: 10.3390/pharmaceutics12111039.
18. Barbosa de Souza A., Vinícius Chaud M., Francine Alves T., Ferreira de Souza J., Andrade Santana M. H. Hyaluronic Acid in the Intestinal Tract: Influence of Structure, Rheology, and Mucoadhesion on the Intestinal Uptake in Rats. *Biomolecules*. 2020;10(10):1422. DOI: 10.3390/biom10101422.
19. Bassi da Silva J., de Souza Ferreira S. B., Reis A. V., Cook M. T., Bruschi M. L. Assessing Mucoadhesion in Polymer Gels: The Effect of Method Type and Instrument Variables. *Polymers*. 2018;10(3):254. DOI: 10.3390/polym10030254.
20. Mackie A. R., Goycoolea F. M., Menchicchi B., Caramella C. M., Saporito F., Lee S., Stephansen K., Chronakis I. S., Hiorth M., Adamczak M., Waldner M., Nielsen H. M., Marcelloni L. Innovative Methods and Applications in Mucoadhesion Research. *Macromolecular Bioscience*. 2017;17(8):1600534. DOI: 10.1002/mabi.201600534.

REFERENCES

1. Kucharíková S., Gerits E., De Brucker K., Braem A., Ceh K., Majdič G., Španič T., Pogorevc E., Verstraeten N., Tournu H., Delattin N., Impellizzeri F., Erdtmann M., Krona A., Lövenklev M., Knezevic M., Fröhlich M., Vleugels J., Fauvart M., de Silva W. J., Vandamme K., Garcia-Forgas J., Cammue B. P. A., Michiels J., Van Dijck P., Thevissen K. Covalent immobilization of antimicrobial agents on titanium prevents *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* colonization and biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(4):936–945. DOI: 10.1093/jac/dkv437.
2. Klug A., Gramlich Y., Rudert M., Drees P., Hoffmann R., Weißenberger M., Kutzner K. P. The projected volume of primary and revision total knee arthroplasty will place an immense burden on future health care systems over the next 30 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2021;29(10):3287–3298. DOI: 10.1007/s00167-020-06154-7.
3. Fil A. S., Tarakanov V. N., Kulyaba T. A., Kornilov N. N. Primary knee joint arthroplasty trends at the Vreden National Medical Research Centre for Traumatology and Orthopedics compared with other national joint replacement registries. Is our way similar? *Orthopaedic Genius*. 2020;26(4):476–483. (In Russ.) DOI: 10.18019/1028-4427-2020-26-4-476-483.
4. Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Aleshkin A. V., Demina N. B., Krasnyuk I. I., Pyatigorskaya N. V., Beregovykh V. V. Modern tendencies of the use and development of drugs of bacteriophages. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2021;76(4):351–360. (In Russ.) DOI: 10.15690/vramn1380.
5. Cano E. J., Caflisch K. M., Bollyky P. L., Van Belleghem J. D., Patel R., Fackler J., Brownstein M. J., Horne B., Biswas B., Henry M., Malagon F., Lewallen D. G., Suh G. A. Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee Klebsiella pneumoniae Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. *Clin Infect Dis*. 2021;73(1):144–151. DOI: 10.1093/cid/ciaa705.
6. Lamret F., Colin M., Mongaret C., Gangloff S. C., Reffuveille F. Antibiotic Tolerance of Staphylococcus aureus Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. *Antibiotics*. 2020;9(9):547. DOI: 10.3390/antibiotics9090547.

7. Ferry T., Batailler C., Petitjean C., Chateau J., Fevre C., Forestier E., Brosset S., Leboucher G., Kolenda C., Laurent F., Lustig S. The Potential Innovative Use of Bacteriophages Within the DAC® Hydrogel to Treat Patients With Knee Megaprosthesis Infection Requiring «Debridement Antibiotics and Implant Retention» and Soft Tissue Coverage as Salvage Therapy. *Frontiers in Medicine*. 2020;7:342. DOI: 10.3389/fmed.2020.00342.
8. Bakhrushina E. O., Demina N. B., Shumkova M. M., Rodyuk P. S., Shulikina D. S., Krasnyuk I. I. In situ Intranasal Delivery Systems: Application Prospects and Main Pharmaceutical Aspects of Development (Review). *Drug development & registration.* 2021;10(4): 54–63. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63.
9. Ijaz U., Sohail M., Usman Minhas M., Khan S., Hussain Z., Kazi M., Ahmed Shah S., Mahmood A., Maniruzzaman M. Biofunctional Hyaluronic Acid/κ-Carrageenan Injectable Hydrogels for Improved Drug Delivery and Wound Healing. *Polymers.* 2022;14(3):376. DOI: 10.3390/polym14030376.
10. Vigani B., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M. C., Caramella C. M., Ferrari F. Recent Advances in the Development of In Situ Gelling Drug Delivery Systems for Non-Parenteral Administration Routes. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):859. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090859.
11. Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Bochkareva S. S., Vorobev A. M., Shcherbina Yu. O., Pasivkina M. A., Krekhtunova L. O., Demina N. B., Aleshkin A. V. Development and Study of Bacteriophage-containing Dosage Form for the Treatment of the Outer Ear Infections. *Drug development & registration*. 2022;11(2):74–78. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-74-78.
12. Ruan X., Hu J., Lu L., Wang Y., Tang C., Liu F., Gao X., Zhang L., Wu H., Huang X., Wei Q. Poloxamer 407/188 Binary Thermosensitive Gel as a Moxidectin Delivery System: In Vitro Release and In Vivo Evaluation. *Molecules*. 2022;27(10):3063. DOI: 10.3390/molecules27103063.
13. Russo E., Villa C. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. *Pharmaceutics*. 2019;11(12):671. DOI: 10.3390/pharmaceutics11120671.
14. Mariano K. C. F., Papini J. Z. B., de Faria N. C., Heluany D. N. C., Botega A. L. L., Cereda C. M. S., de Paula E., Tófoli G. R., de Araujo D. R. Ropivacaine-Loaded Poloxamer Binary Hydrogels for Prolonged Regional Anesthesia: Structural Aspects, Biocompatibility, and Pharmacological Evaluation. *BioMed Research International*. 2021;2021:7300098. DOI: 10.1155/2021/7300098.
15. Cui N., Dai C. Y., Mao X., Lv X., Gu Y., Lee E. S., Jiang H. B., Sun Y. Poloxamer-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Gels*. 202;8(6):360. DOI: 10.3390/gels8060360.
16. Alexandridis P., Holzwarth J. F., Hatton T. A. Micellization of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions-Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules*. 1994;27:2414–2425. DOI: 10.1021/MA00087A009.
17. Del Castillo-Santaella T., Yang Y., Martínez-González I., Gálvez-Ruiz M. J., Cabrerizo-Vílchez M. Á., Holgado-Terriza J. A., Selles-Galiana F., Maldonado-Valderrama J. Effect of Hyaluronic Acid and Pluronic-F68 on the Surface Properties of Foam as a Delivery System for Polidocanol in Sclerotherapy. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1039. DOI: 10.3390/pharmaceutics12111039.
18. Barbosa de Souza A., Vinícius Chaud M., Francine Alves T., Ferreira de Souza J., Andrade Santana M. H. Hyaluronic Acid in the Intestinal Tract: Influence of Structure, Rheology, and Mucoadhesion on the Intestinal Uptake in Rats. *Biomolecules*. 2020;10(10):1422. DOI: 10.3390/biom10101422.
19. Bassi da Silva J., de Souza Ferreira S. B., Reis A. V., Cook M. T., Bruschi M. L. Assessing Mucoadhesion in Polymer Gels: The Effect of Method Type and Instrument Variables. *Polymers*. 2018;10(3):254. DOI: 10.3390/polym10030254.
20. Mackie A. R., Goycoolea F. M., Menchicchi B., Caramella C. M., Saporito F., Lee S., Stephansen K., Chronakis I. S., Hiorth M., Adamczak M., Waldner M., Nielsen H. M., Marcelloni L. Innovative Methods and Applications in Mucoadhesion Research. *Macromolecular Bioscience*. 2017;17(8):1600534. DOI: 10.1002/mabi.201600534.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-58-65
УДК 535.361; 615.074; 615.456.4; 615.013

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка инъекционной формы 4′-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида на основе человеческого сывороточного альбумина для химиотерапии рака молочной железы

Т. С. Ковшова[1], С. А. Бойко[1]✉, М. А. Меркулова[1], Н. С. Осипова[1], Н. И. Моисеева[2], Ю. А. Малиновская[1], С. Н. Мантров[1], С. Э. Гельперина[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева» (РХТУ им. Д. И. Менделеева), 125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

✉ **Контактное лицо:** Бойко Светлана Андреевна. **E-mail:** 718bsvetlana@gmail.com

ORCID: Т. С. Ковшова – https://orcid.org/0000-0002-0398-4645; С. А. Бойко – https://orcid.org/0000-0001-7793-2007; М. А. Меркулова – https://orcid.org/0000-0001-9649-1462; Н. С. Осипова – https://orcid.org/0000-0002-2814-9064; Н. И. Моисеева – https://orcid.org/0000-0001-6697-7154; Ю. А. Малиновская – https://orcid.org/0000-0002-9771-3992; С. Н. Мантров – https://orcid.org/0000-0002-0188-5125; С. Э. Гельперина – https://orcid.org/0000-0003-1113-6715.

Статья поступила: 03.08.2022 **Статья принята в печать:** 03.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Одним из эффективных подходов к получению инъекционных форм труднорастворимых лекарственных веществ является получение их наносуспензий, стабилизированных альбумином. Примером успешного применения этой технологии является препарат Abraxane® (nab™-паклитаксел, от *англ.* Nanoparticle albumin-bound, Celgene Corporation). В настоящем исследовании этот подход использован для получения инъекционной формы труднорастворимого пролекарства этопозида.

Цель. Получение инъекционной формы нового 4′-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида (ETP-cbz) на основе человеческого сывороточного альбумина и изучение ее цитотоксичности на клетках рака молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. Структуру ETP-cbz подтверждали методами ЯМР-спектроскопии и элементного анализа. Значения log P рассчитаны *in silico* с использованием Molinspiration Cheminformatics. Наночастицы ETP-cbz, стабилизированные альбумином (ETP-cbz-HSA), получены методом гомогенизации под давлением. Размер, распределение частиц по размерам и концентрацию дезинтеграции определяли методами динамического рассеивания света (ДРС) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Содержание ETP-cbz и альбумина в форме определяли методом ВЭЖХ. Конверсию ETP-cbz в этопозид изучали в модельной среде в присутствии эстеразы. Цитотоксичность ETP-cbz-HSA в сравнении с этопозидом и свободным ETP-cbz оценивали на клетках РМЖ (HBL-100 и MCF-7) при помощи колориметрического МТТ-теста.

Результаты и обсуждение. Синтезировано новое производное этопозида, обладающее более высокой по сравнению с этопозидом гидрофобностью (log P 2,42 и 0,7 соответственно). Благодаря лабильной карбонатной связи, которая легко расщепляется под действием эстеразы, ETP-cbz является пролекарством этопозида. Разработан метод получения наноформы ETP-cbz на основе альбумина. Содержание ETP-cbz в суспензии составило 1,75 мг/мл, размер частиц – 110 ± 9 нм (ДРС), концентрация дезинтеграции – 3,0 ± 0,1 мкг/мл. Цитотоксичность наноформы ETP-cbz в отношении клеток MCF-7 и HBL-100 *in vitro* сопоставима с активностью свободного этопозида и ETP-cbz.

Заключение. Полученная наноформа пролекарства этопозида на основе альбумина, пригодная для инъекционного введения, проявила высокую цитотоксичность в отношении клеток РМЖ *in vitro* и заслуживает дальнейшего изучения для оценки возможности ее применения в химиотерапии РМЖ.

Ключевые слова: пролекарство этопозида, человеческий сывороточный альбумин, наночастицы, цитотоксичность, рак молочной железы

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

Вклад авторов. Т. С. Ковшова, С. А. Бойко и Ю. А. Малиновская осуществляли получение и физико-химический анализ наночастиц. С. Н. Мантров разработал методику синтеза и очистки ETP-cbz и проводил анализ его структуры. Н. С. Осипова и М. А. Меркулова исследовали стабильность частиц *in vitro*. Н. И. Моисеева оценивала цитотоксическую активность лекарственных форм. С. Э. Гельперина осуществляла общее руководство проектом. Все авторы принимали участие в анализе данных и обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (проект FSSM-2022-0003).

Для цитирования: Ковшова Т. С., Бойко С. А., Меркулова М. А., Осипова Н. С., Моисеева Н. И., Малиновская Ю. А., Мантров С. Н., Гельперина С. Э. Разработка инъекционной формы 4′-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида на основе человеческого сывороточного альбумина для химиотерапии рака молочной железы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):58–65. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-58-65

© Ковшова Т. С., Бойко С. А., Меркулова М. А., Осипова Н. С., Моисеева Н. И., Малиновская Ю. А., Мантров С. Н., Гельперина С. Э., 2023
© Kovshova T. S., Boiko S. A., Merkulova M. A., Osipova N. S., Moiseeva N. I., Malinovskaya Ju. A., Mantrov S. N., Gelperina S. E., 2023

Development of Injectable Formulation of 4′-O-benzyloxycarbonyl-etoposide Derivative Based on Human Serum Albumin for the Chemotherapy of Breast Cancer

Tatyana S. Kovshova[1], Svetlana A. Boiko[1]✉, Maria A. Merkulova[1], Nadezhda S. Osipova[1], Natalia I. Moiseeva[2], Julia A. Malinovskaya[1], Sergey N. Mantrov[1], Svetlana E. Gelperina[1]

[1] Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya square, Moscow, 125047, Russia
[2] Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (N. N. Blokhin NMRCO), 23, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

✉ **Corresponding author:** Svetlana A. Boiko. **E-mail:** 718bsvetlana@gmail.com

ORCID: Tatyana S. Kovshova – https://orcid.org/0000-0002-0398-4645; Svetlana A. Boiko – https://orcid.org/0000-0001-7793-2007; Maria A. Merkulova – https://orcid.org/0000-0001-9649-1462; Nadezhda S. Osipova – https://orcid.org/0000-0002-2814-9064; Natalia I. Moiseeva – https://orcid.org/0000-0001-6697-7154; Julia A. Malinovskaya – https://orcid.org/0000-0002-9771-3992; Sergey N. Mantrov – https://orcid.org/0000-0002-0188-5125; Svetlana E. Gelperina – https://orcid.org/0000-0003-1113-6715.

Received: 03.08.2022 **Revised:** 03.07.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. One of the promising strategies for the development of injectable formulations of poorly water-soluble drugs is the preparation of their nanosuspensions stabilized with albumin. A well-known example of the successful implementation of this technology is Abraxane® (nanoparticle albumin-bound paclitaxel). In the present study, this approach is used for the development of the injectable formulation of a hydrophobic etoposide prodrug.

Aim. Development of the injectable formulation of a novel 4'-O-benzyloxycarbonyl derivative of etoposide (ETP-cbz) based on human serum albumin and evaluation of its cytotoxicity against breast carcinoma cells (BC).

Materials and methods. The structure of ETP-cbz was confirmed by NMR spectroscopy and elemental analysis; log P was calculated *in silico* using Molinspiration Cheminformatics. The ETP-cbz-HSA nanoparticles were prepared by high pressure homogenization. The particle size, size distribution, and disintegration concentration were evaluated by dynamic light scattering (DLS) and atomic force microscopy (AFM). The contents of ETP-cbz and albumin in the formulation were determined by HPLC. The conversion ETP-cbz-HSA to etoposide was studied in a model medium in the presence of esterase. The cytotoxicity of ETP-cbz-HSA compared to etoposide and free ETP-cbz was assessed on BC cells (HBL-100 and MCF-7) using a colorimetric MTT assay.

Results and discussion. ETP-cbz exhibited higher hydrophobicity as compared to the etoposide (log P 2.42 vs 0.7, respectively). Due to easy cleavage of the carbonate bond in the presence of esterase, ETP-cbz can be considered an etoposide prodrug. The ETP-cbz-containing HSA nanoparticles prepared by a high-pressure homogenization technique had the particle size of 110 ± 9 nm (DLS) and a low disintegration concentration of 3.0 ± 0.1 μg/mL. The drug content was 1.75 mg/mL. The nanoformulation demonstrated high cytotoxic activity *in vitro* against MCF-7 and HBL-100 cells that was comparable to the activity of substances etoposide and ETP-cbz.

Conclusion. The obtained nanoformulation of etoposide prodrug based on albumin, suitable for injection, showed high cytotoxicity against breast cancer cells *in vitro* and deserves further study to assess the possibility of its use in breast cancer chemotherapy.

Keywords: etoposide prodrug, human serum albumin, nanoparticles, cytotoxicity, breast cancer

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

Contribution of the authors. Tatyana S. Kovshova, Svetlana A. Boiko and Julia A. Malinovskaya carried out the preparation and physicochemical analysis of the nanoparticles. Sergey N. Mantrov developed the method of synthesis and purification of ETP-cbz and analyzed its structure. Nadezhda S. Osipova and Maria A. Merkulova studied the stability of nanoparticles *in vitro*. Natalia I. Moiseeva evaluated the cytotoxic activity of drug formulations *in vitro*. Svetlana E. Gelperina was the scientific supervisor of this study. All authors participated in data analysis and discussion of the results.

Funding. The research was carried out within the study assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project FSSM-2022-0003).

For citation: Kovshova T. S., Boiko S. A., Merkulova M. A., Osipova N. S., Moiseeva N. I., Malinovskaya Ju. A., Mantrov S. N., Gelperina S. E. Development of injectable formulation of 4′-O-benzyloxycarbonyl-etoposide derivative based on human serum albumin for the chemotherapy of breast cancer. *Drug development & registration*. 2023;12(3):58–65. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-58-65

ВВЕДЕНИЕ

Разработка инъекционных форм труднорастворимых в воде лекарственных веществ (ЛВ) является сложной задачей, для решения которой обычно применяют такие вспомогательные вещества, как масла, поверхностно-активные вещества и органические растворители. Однако введение этих вспомогательных веществ часто приводит к побочным эффектам. Альтернативным подходом к получению инъекционных форм труднорастворимых веществ является получение их наносуспензий, стабилизированных

альбумином. Примером успешного применения этого подхода, позволяющего избежать применения токсичных эксципиентов, является препарат Abraxane® (nab™-paclitaxel, от *англ*. Nanoparticle albumin-bound, Celgene Corporation), одобренный FDA в 2006 г. для лечения метастатического рака молочной железы (РМЖ) [1, 2]. Наносуспензии, получаемые по nab™-технологии, представляют собой суспензии наночастиц (НЧ) гидрофобного ЛВ, стабилизированных альбумином. После внутривенного введения частицы диссоциируют с образованием растворимых комплексов «ЛВ – альбумин». Известно, что опухоли молочной железы часто отличаются повышенной экспрессией белка SPARC (кислый секретируемый белок, богатый цистеином), который может способствовать накоплению в опухоли ЛВ, связанных с альбумином [1].

Наличие в молекуле сывороточного альбумина нескольких сайтов связывания ЛВ различной природы [2] свидетельствует о возможности применения этой технологии для получения инъекционных форм других противоопухолевых агентов. Этопозид – полусинтетическое производное подофиллотоксина, ингибитор топоизомеразы II, который применяется в комбинированной химиотерапии РМЖ, а также рака яичников, немелкоклеточного рака легких, саркомы Капоши, лимфомы Ходжкина и опухолей головного мозга [3]. Этопозид обладает низкой растворимостью в воде (<0,1 мг/мл при +37 °C) [4], поэтому для получения его инъекционной формы используют высокие концентрации солюбилизаторов и сорастворителей (полисорбат-80, макрогол-300, бензиловый и этиловый спирты), способные вызвать реакции гиперчувствительности. Помимо известных примеров модификации молекулы этопозида (Etopophos®, фосфат этопозида), могут быть использованы другие стратегии повышения растворимости, в частности получение наносуспензий [5, 6]. Этопозид обладает высокой степенью связывания с белками плазмы (97 %) и способен взаимодействовать с сайтом Садлоу III человеческого сывороточного альбумина [7]. Вместе с тем повышение гидрофобности молекулы этопозида может способствовать ее связыванию с альбумином в процессе эмульгирования и гомогенизации за счет повышения растворимости в органической фазе и в конечном итоге получению стабильной наносуспензии.

Таким образом, **целью настоящего исследования** было получение гидрофобного 4′-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида и разработка его инъекционной формы на основе человеческого сывороточного альбумина с использованием принципов nab™-технологии, а также изучение цитотоксической активности наноформы *in vitro* на линиях клеток карциномы молочной железы MCF-7 и HBL-100.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали: этопозид (100 %, Qilu Antibiotics Pharmaceutical Co., Ltd., Китай); раствор человеческого сывороточного альбумина (20 %, Плазбумин®-20, Grifols Therapeutics Inc., США); этанол 96 % (EtOH), хлороформ, диметилсульфоксид (ДМСО) и тетрогидрофуран (ТГФ) (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия); лиофилизированная эстераза печени лошади, хлорид натрия (NaCl, 99 %), бензилхлорформиат, триэтиламин (Et_3N), муравьиная кислота, диизопропилэтиламин (DIEA) и полисорбат-80 (Tween® 80) (Sigma-Aldrich Corporation, США); дигидрат двухосновного фосфата натрия, дигидрофосфат калия и гидрофосфат калия (PanReac, Испания); среда для культивирования клеток DMEM (Thermo Fisher Scientific, США); ацетонитрил (ACN) 99,9 % и метанол (MeOH) 99,8 % марки «для ВЭЖХ» (PanReac AppliChem, ITW Reagents).

Получение 4′-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида

Гидрофобное 4′-О-бензилоксикарбонильное производное этопозида, ранее описанное в качестве промежуточного продукта при синтезе производных этопозида по методу Куна [8], было получено посредством взаимодействия этопозида с бензилхлорформиатом в ТГФ с высоким выходом реакции (93,4 %) (рисунок 1). Продукт очищали препаративной хроматографией с использованием Shimadzu LCMS-2020 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенного диодно-матричным детектором, разделение проводили на колонке YMC Pack ODS-A (250 × 20 мм, 10 мкм) в градиентном режиме элюирования: фаза А (99,9 % воды : 0,1 % муравьиной кислоты), фаза В (99,9 % ацетонитрила : 0,1 % муравьиной кислоты); 70 % А (0–2 мин), 70 → 0 % А (2–20 мин), 0 % А (20–23 мин), 0 → 70 % А (23-25 мин); скорость потока – 15 мл/мин. Время удерживания этопозида – 20 мин, время удерживания ETP-cbz – 24 мин.

Анализ структуры и растворимости ETP-cbz

Структуру ETP-cbz подтверждали данными элементного анализа с использованием CNS-2000-I (LECO Corporation, США) – %: C 61,57; H 5,42; H 0,10 ($C_{36}H_{43}O_{13}$). Спектр ^{1}H-ЯМР получали с использованием Bruker 600 MHz Avance III (Bruker, США) – (CDCl3, 600 МГц) d 1,38 (д, J = 5,1 Гц, 3H), 3,30–3,36 (м, 2H), 3,44 (т, J = 8,1 Гц, 1H), 3,58–3,61 (м, 3H), 3,66–3,70 (м, 1H), 3,69 (с, 3H), 3,86 (с, 3H), 4,20 (дд, J = 4,4, 10,3 Гц, 1H), 4,30–4,34 (м, 2H), 4,50 (д, J = 7,3 Гц, 1H), 4,74 (к, J = 5,1 Гц, 1H), 4,95 (с, 1H), 5,30 (с, 2H), 5,53 (д, J = 8,1 Гц, 1H), 5,95 (с, 2H), 6,35 (с, 1H), 6,70 (с, 1H), 7,25 (с, 2H), 7,35–7,43 (м, 5H). Коэффициент распре-

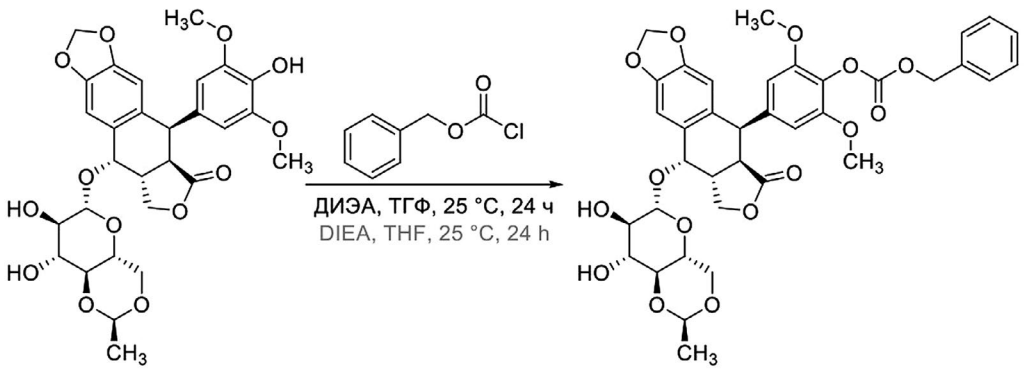


Рисунок 1. **Схема синтеза 4′-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида (ETP-cbz)**

Figure 1. **Synthesis of the 4′-O-benzyloxycarbonyl derivative of etoposide (ETP-cbz)**

деления н-октанол/вода (log P) определяли *in silico* с использованием Molinspiration Cheminformatics (https://www.molinspiration.com, Словакия). Приблизительную растворимость этопозида и ETP-cbz в хлороформе и 96 % EtOH при +25 °C определяли визуально путем постепенного добавления небольших объемов растворителя к навеске вещества. Растворимость в воде и фосфатном буфере с добавлением 1 % Tween® 80 определяли после инкубации при +37 °C в течение 2 ч (250 об/мин, шейкер-инкубатор ES-20, BioSan, Латвия) с последующей фильтрацией (размер пор 0,22 мкм, регенерированная целлюлоза, Teknokroma Analítica S.A., Испания). Содержание в фильтрате определяли методом ВЭЖХ с использованием системы LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенной колонкой Kromasil 100-5-C18 (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм) (AkzoNobel, Нидерланды). Для анализа использовали методику из EP 7.0 с модификациями: ПФ (А) – смесь Et_3N : безводной муравьиной кислоты : воды (1 : 1 : 998 об./об./об.), ПФ (Б) – смесь Et_3N : безводной муравьиной кислоты : ACN (1 : 1 : 998 об./об./об.); режим градиентного элюирования: 75 % А (0–7 мин), 75 → 27 % А (7–23 мин), 27 → 75 % А (23–25 мин), 75 % А (25–40 мин); температура колонки +40 °C; скорость – 1 мл/мин; объем инъекции – 10 мкл, длина волны – 285 нм. Для расчета содержания ETP-cbz (время удерживания – 23 мин) использовали линейную калибровочную кривую с коэффициентом наклона 2879,6 ($R^2 > 0,99$). Для расчета содержания этопозида (время удерживания – 11 мин) использовали линейную калибровочную кривую с коэффициентом наклона 4007,8 ($R^2 > 0,99$); $n = 3$.

Получение наночастиц ETP-cbz-HSA

Наночастицы ETP-cbz, стабилизированные человеческим сывороточным альбумином (ETP-cbz-HSA), были получены методом гомогенизации под давлением с последующим удалением растворителя. Навеску ETP-cbz (60 мг) растворяли в смеси 1,1 мл хлороформа и 0,1 мл 96 % EtOH для получения органической фазы (о), которую смешивали с охлажденным до 13–14 °C 1 % водным раствором альбумина (w), приготовленным путем разведения Плазбумина®-20, при этом соотношение ETP-cbz и альбумина составляло 1 : 10 (в/в); соотношение объемов водной (w) и органической фаз (о) – 49 : 1. Смесь гомогенизировали, вначале используя роторный смеситель с высоким усилием сдвига Ultra-Turrax T18 basic (IKA, Германия), а затем с помощью гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics International Corporation, США) при 2068 бар (30 000 psi) в течение 3 мин 45 с при охлаждении. После удаления остаточного органического растворителя под вакуумом полученные суспензии фильтровали через фильтр 0,2 мкм, разливали во флаконы по 1 мл и лиофилизировали (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия); образцы хранили в холодильнике при температуре +4–5 °C.

Изучение физико-химических параметров НЧ

Средний гидродинамический диаметр частиц (ZaveD), индекс полидисперсности (PDI) и распределение по размерам (Volume, %) определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) при разведении НЧ в 0,9%-м растворе NaCl (0,1 мг/мл по ETP-cbz), ζ-потенциал поверхности НЧ – методом электрофоретического рассеивания света при разведении НЧ в воде Milli-Q (1 мг/мл по ETP-cbz) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Великобритания) (угол 173°, +25 °C, $n = 3$). Концентрацию дезинтеграции частиц определяли методом ДРС по появлению фракции 7–10 нм (Volume) после серийного разведения наносуспензии в 0,9%-м растворе NaCl при +25 °C. Размер и морфологию НЧ оценивали также при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ) (NTEGRA Prima, зонд NSG01 DLC).

Содержание ETP-cbz в НЧ определяли после ресуспендирования лиофилизата в MeOH с последующим отделением альбумина центрифугированием

(15 000 g; 10 мин) с использованием 5804R (Eppendorf, Германия), определяли методом ВЭЖХ, как описано выше; $n = 3$. Для определения содержания альбумина лиофилизат восстанавливали 0,9%-м раствором NaCl, разбавляли в 20 раз и анализировали методом ВЭЖХ, разделение проводили на колонке TSKgel® $G3000SW_{XL}$ (300 × 7,8 мм, 5 мкм) (Tosoh Bioscience, Япония) в изократическом режиме элюирования: ПФ – 0,1 М раствора гидрофосфата калия (pH = 7); скорость – 1 мл/мин; объем инъекции – 10 мкл; температура колонки – +25 °C, длина волны – 228 нм. Для расчета содержания альбумина использовали линейную калибровочную кривую с коэффициентом наклона 3085999 ($R^2 > 0,99$); $n = 3$.

Изучение высвобождения этопозида из ETP-cbz НЧ в модельной среде

Для подтверждения превращения ETP-cbz в составе наносуспензии на основе альбумина в этопозид наночастицы инкубировали в модельной среде (0,05 М фосфатный буфер при pH 7,4 с добавлением 1 % Tween® 80) в концентрации 0,1 мг/мл (ETP-cbz), не содержащей или содержащей эстеразу при молярном соотношении 1:4, инкубировали при +37 °C, 200 об/мин (шейкер-инкубатор ES-20, BioSan, Латвия). Через установленные интервалы (0, 2, 4 и 24 ч) отбирали 3 мл суспензии (без замены среды), центрифугировали (48 254 g, 30 мин, +18 °C) с использованием ультрацентрифуги Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, Inc., США), супернатант лиофилизировали, а затем анализировали содержание этопозида и ETP-cbz методом ВЭЖХ, как описано выше. Конверсию ETP-cbz в этопозид (%) рассчитывали как отношение количества этопозида (моль) в момент времени (t) и первоначального ($t = 0$) количества ETP-cbz (моль):

$$\text{Конверсия ETP-cbz} \rightarrow \text{ETP}(\%) = \frac{\frac{m_{ETP(t)}}{588,9}}{\frac{m_{ETP\text{-}cbz}(t=0)}{722}} \cdot 100\ \%,$$

где $m_{ETP(t)}$ – содержание этопозида в суспензии в момент времени t [*мг*]; $m_{ETP\text{-}cbz(t=0)}$ – содержание производного этопозида в суспензии в начальный момент времени [мг]; молярные массы этопозида и ETP-cbz – 588,9 и 722 г/моль соответственно.

Исследование цитотоксической активности in vitro (MTT-тест)

Сравнительное изучение цитотоксической активности ETP-cbz-HSA НЧ и этопозида/ETP-cbz в свободном виде выполняли с помощью MTT-теста. MTT (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) (Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве колориметрического субстрата для измерения жизнеспособности клеток. Клетки карциномы молочной железы человека HBL-100 и MCF-7 высаживали в 96-луночные планшеты (Corning, США) по 10 тыс. клеток в лунку в 90 мкл среды DMEM с добавлением 10%-й фетальной телячьей сыворотки за 24 ч до начала эксперимента. Лиофилизат НЧ ресуспендировали 0,9%-м раствором NaCl, субстанции этопозида и ETP-cbz растворяли в ДМСО (1 мг/мл), далее разбавляли все полученные образцы средой с добавлением сыворотки и вносили образцы в объеме 10 мкл к клеткам для достижения концентраций в диапазоне от 0,1 до 12,0 мкМ. В контрольные лунки добавляли 10 мкл среды. Клетки культивировали с соединениями в течение 72 ч, затем добавляли MTT (5 мг/мл) (20 мкл/лунку). Через 3 ч инкубации среду с соединениями удаляли, а осадок кристаллов растворяли в 60 мкл ДМСО. Оптическую плотность измеряли на планшетном анализаторе Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 540 нм. Величину IC_{50} определяли графически.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием GraphPad Prism 9.0. Статистическую значимость оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни и дисперсионного анализа (ANOVA). Для оценки цитотоксичности было проведено три независимых эксперимента. Полученные результаты представлены как средние значения ± стандартное отклонение (sd) с указанием числа параллельных измерений (n).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Этерификация полярных гидроксильных (фенильных) групп лекарственных веществ (ЛВ) бензиловым эфиром является успешной стратегией для увеличения их липофильности и клеточной проницаемости [9]. 4′-О-бензилоксикарбонил-этопозид содержит карбонатную связь (рисунок 1), которая в условиях *in vivo* подвергается ферментативному гидролизу под действием эстеразы, обеспечивая быстрое высвобождение ЛВ. Структура ETP-cbz подтверждена методом ЯМР: в спектре ^{1}H-ЯМР помимо сдвигов, характерных для протонов этопозида, присутствуют сдвиги, характерные для протонов бензильной группы: 5,30 (с, 2H) и 7,35–7,43 (м, 5H).

По сравнению с этопозидом ETP-cbz отличается большей гидрофобностью (рассчитанные *in silico* значения log P составили 0,70 и 2,42 соответственно), лучше растворим в органических растворителях (96 % EtOH, хлороформ) и менее растворим в водных средах (таблица 1). При добавлении 1 % Tween® 80 к фосфатному буферному раствору (pH = 7,4) растворимость ETP-cbz повышается до ~0,9 мг/мл, что позволяет использовать данную среду в качестве модельной в экспериментах в *in vitro*.

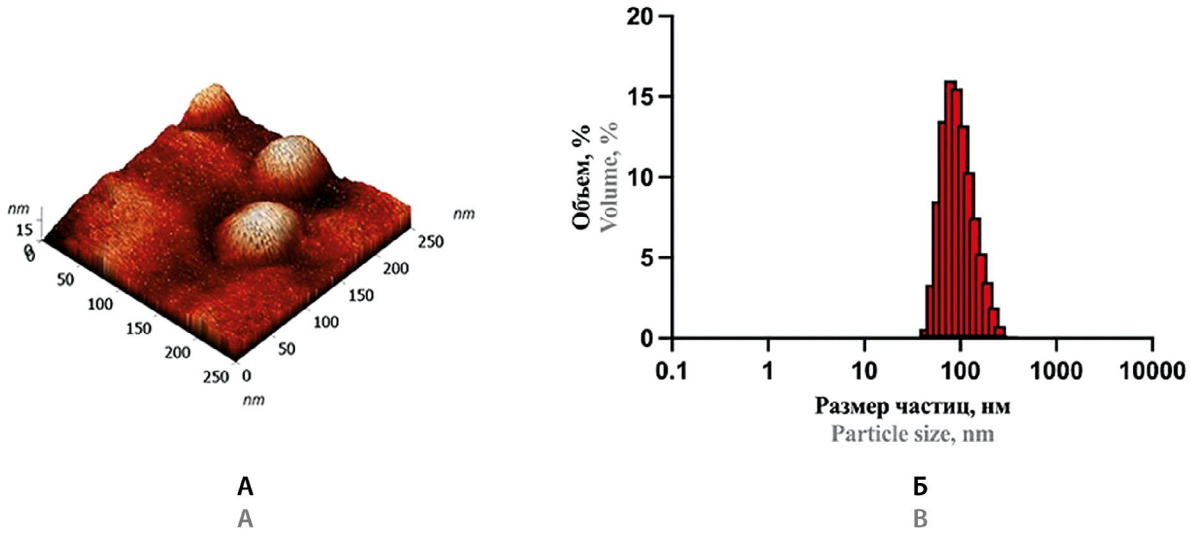


Рисунок 2. **Размеры наночастиц**

А – микрофотография наночастиц ETP-cbz-HSA (атомно-силовой микроскоп NTEGRA Prima, зонд NSG01 DLC, NT-MDT Spectrum Instruments, Россия), разбавление в 10 раз; Б – объемное (Volume) распределение частиц по размерам (метод DLS, анализатор Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Великобритания), разбавление в 50 раз

Figure 2. **Sizes of nanoparticles**

A – micrograph of ETP-cbz-HSA nanoparticles (NTEGRA Prima atomic force microscope, NSG01 DLC cantilever, NT-MDT Spectrum Instruments, Russia), 10-fold dilution; B – volumetric (Vol) particle size distribution (DLS method, Zetasizer Nano ZS analyzer, Malvern Instruments Ltd., UK), 50-fold dilution

Таблица 1. **Растворимость этопозида и Etp-cbz в органических растворителях и водных растворах (репрезентативные данные)**

Table 1. **Solubility of etoposide and its derivate in organic solvents and water solutions (representative data)**

Растворитель Solvent	**96 % Этанол** 96 % Ethanol	**Хлороформ** Chloroform	**Вода** Water	**0,05 М фосфатный буфер + 1 % Tween® 80** 0.05 M phosphate buffer + 1 % Tween® 80
Этопозид Etoposide	2,0	5,8	0,2	0,206
ETP-cbz	19,7	351,0	~0,003	0,876

Водосовместимую форму получали в водно-органической среде методом гомогенизации под давлением ETP-cbz в присутствии альбумина с последующим удалением растворителя (принцип nab™-технологии, описанный в [1,10]). Полученная форма представляет собой стабилизированную альбумином наносуспензию ETP-cbz со средним размером частиц 110 ± 9 нм, низким индексом полидисперсности 0,114 ± 0,012 и отрицательным ζ-потенциалом поверхности (таблица 2). Размеры НЧ, определенные с помощью АСМ, были значительно меньше и составляли в среднем 70 ± 15 нм (рисунок 2, А), что объясняется вкладом гидратной оболочки в размер, определенный методом ДРС. Распределение частиц по размерам (основной пик по объему) при разведении до концентрации ЛВ 0,1 мг/мл представлен на рисунке 2, Б. Наночастицы ETP-cbz-HSA проявили высокую стабильность и при разбавлении 0,9%-м раствором NaCl диссоциировали до растворимых комплексов альбумин-ETP-cbz, по размеру близких к нативному альбумину, только при ~600-кратном разбавлении исходной суспензии (до концентрации 3,0 ± 0,1 мкг/мл). Стоит отметить, концентрация дезинтеграции ETP-cbz-HSA НЧ была значительно ниже известных значений для nab™-паклитаксела

Таблица 2. **Физико-химические параметры наночастиц ETP-cbz-HSA (*n* = 3, среднее ± sd)**

Table 2. **Physicochemical parameters of the ETP-cbz-HSA nanoparticles (n = 3, mean ± sd)**

Содержание ETP-cbz, мг/мл ETP-cbz content, mg/mL	**Содержание альбумина, мг/мл** Albumin content, mg/mL	**Средний размер, нм** Average size, nm	**Индекс полидисперсности (PDI)** Polydispersity index (PDI)	**ζ-потенциал, мВ** ζ-potential, mV	**Концентрация дезинтеграции, мкг/мл** Disintegration concentration, μg/mL
1,75 ± 0,02	20,55 ± 1,48	110 ± 9	0,114 ± 0,012	–21,4 ± 0,1	3,0 ± 0,1

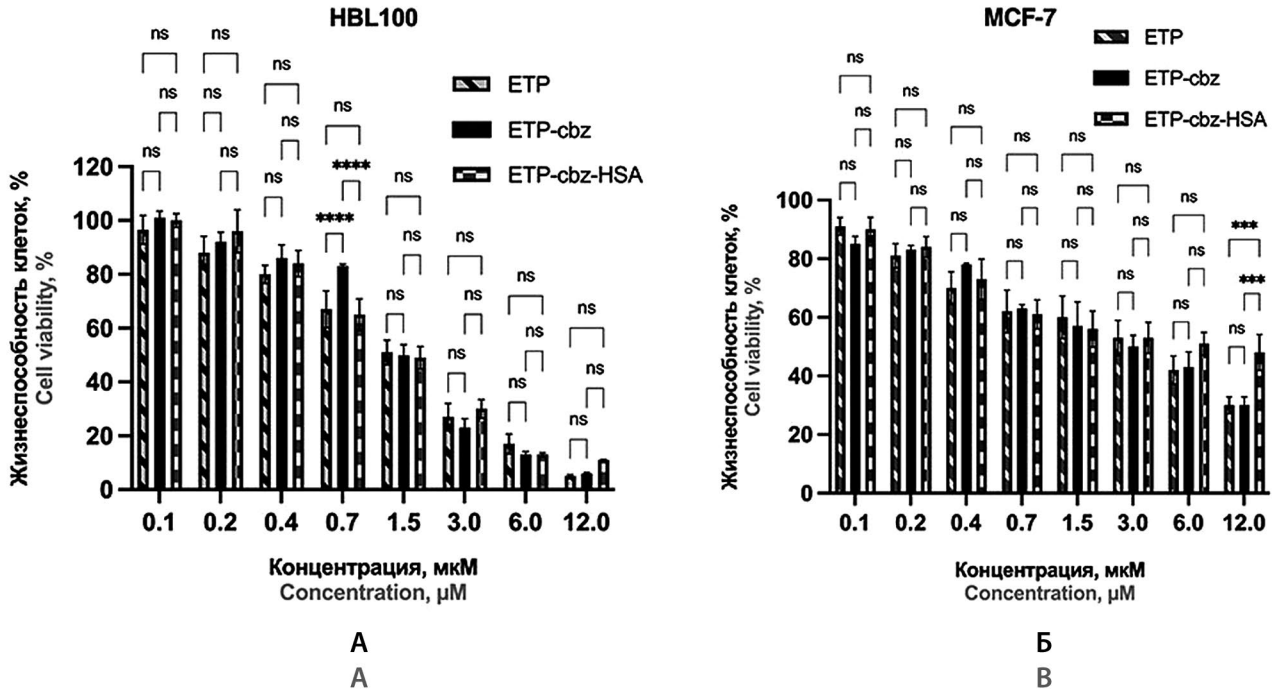


Рисунок 3. Анализ жизнеспособности клеток HBL-100 (А) и MCF-7 (Б) после 72 ч инкубации с наночастицами ETP-cbz-HSA, а также этопозидом и ETP-cbz в свободном виде. Концентрация в пересчете на ETP-cbz/этопозид (среднее значение ± sd; n = 3); ** – $p < 0{,}0005$, *** – $p < 0{,}001$, ns – $p > 0{,}05$**

Figure 3. Cell viability assay for HBL-100 (A) и MCF-7 (Б) cells after 72 h of incubation with different concentrations of ETP-cbz-HSA nanoparticles and free etoposide / ETP-cbz. Concentrations are indicated corresponding to free ETP-cbz/etoposide (mean ± sd; n = 3); ** – $p < 0.0005$, *** – $p < 0.001$, ns – $p > 0.05$**

(Abraxane®) [1,9]. В отличие от ETP-cbz этопозид не образовывал наносуспензию с молекулами человеческого сывороточного альбумина в описанных выше условиях, что, скорее всего, объясняется его более низкой липофильностью. Деградация ETP-cbz в составе НЧ в модельной среде (1 % Tween® 80 в фосфатном буфере) происходит только в присутствии эстеразы: конверсия составила около 76 % за 24 ч (при концентрации ETP-cbz 100 мкг/мл). Кроме того, отмечено, что в момент разведения 70 % ETP-cbz сразу переходит в раствор в комплексе с альбумином, хотя по данным ДРС полного распада НЧ при этом еще не происходит.

Цитотоксичность полученной наноразмерной формы ETP-cbz в сравнении с этопозидом и ETP-cbz в свободном виде исследована *in vitro* на культурах клеток РМЖ с разной степенью злокачественности (HBL-100 и MCF-7) (рисунок 3, таблица 3). Как видно из приведенных данных, статистически значимых различий в цитотоксичности (IC_{50}) этопозида и ETP-cbz в составе НЧ и в свободном виде на клетках HBL-100 ($p < 0{,}05$) не выявлено: в среднем $IC_{50} \approx 1{,}5$ мкМ (рисунок 3, А). Аналогичные результаты получены и на культуре клеток MCF-7. В случае MCF-7 цитотоксичность этопозида соответствовала литературным данным (≈3–4 мкМ) [11], а суспензия наночастиц ETP-cbz-HSA и субстанция ETP-cbz (суспензия в ДМСО) показали близкие уровни цитотоксичности (рисунок 3, Б).

Таблица 3. Цитотоксическая активность наночастиц ETP-cbz-HSA и субстанций этопозида и ETP-cbz на культурах РМЖ после 72 ч инкубации (IC_{50}, $n = 3$, среднее ± sd)

Table 3. Cytotoxic activity of the ETP-cbz-HSA nanoparticles and substances of etoposide and ETP-cbz on breast cancer cultures after 72 h of incubation (IC_{50}, $n = 3$, mean ± sd)

Культура клеток Cell culture		ETP-cbz-HSA	ETP-cbz	Этопозид Etoposide
IC_{50}, мкМ IC_{50}, μM	HBL-100	1,42 ± 0,5	1,55 ± 0,5	1,65 ± 0,8
	MCF-7	7,90 ± 1,2	2,93 ± 0,7	3,86 ± 1,0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученное гидрофобное 4′-О-бензилоксикарбонильное производное этопозида (ETP-cbz), обладающее благодаря лабильной карбонатной связи свойством пролекарства, способно образовывать стабильную наносуспензию с человеческим сывороточным альбумином с размером частиц 110 ± 9 нм. Наноформа ETP-cbz проявила высокую цитотоксическую активность в отношении клеток РМЖ HBL-100 и MCF-7, сходную с активностью этопозида, что по-

зволяет судить об эффективности конверсии ETP-cbz в культуральной среде и проникновению ее комплексов с альбумином в клетки. Таким образом, использование пролекарства этопозида ETP-cbz в форме наносуспензии, стабилизированной альбумином, позволяет создать потенциально безопасную форму этопозида, пригодную для инъекционного введения и заслуживающую дальнейшего изучения для терапии РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Desai N. Nanoparticle albumin bound (nab) technology: targeting tumors through the endothelial gp60 receptor and SPARC. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*. 2007;4(3):339. DOI: 10.1016/j.nano.2007.10.021.
2. Cho H., Jeon S. I., Ahn C.-H., Shim M. K., Kim K. Emerging Albumin-Binding Anticancer Drugs for Tumor-Targeted Drug Delivery: Current Understandings and Clinical Translation. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):728. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040728.
3. Meresse P., Dechaux E., Monneret C., Bertounesque E. Etoposide: discovery and medicinal chemistry. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11(18):2443–2466. DOI: 10.2174/0929867043364531.
4. Alsalhi A., Ayon N. J., Coulibaly F., Alshamrani M., Al-Nafisah A., Youan B.-B. C. Enhancing Etoposide Aqueous Solubility and Anticancer Activity with L-Arginine. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2021;19(8):508–525. DOI: 10.1089/adt.2021.085.
5. Ahire E., Thakkar S., Darshanwad M., Misra M. Parenteral nanosuspensions: a brief review from solubility enhancement to more novel and specific applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(5):733–755. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.07.011.
6. Wang Z., Li Z., Zhang D., Miao L., Huang G. Development of etoposide-loaded bovine serum albumin nanosuspensions for parenteral delivery. *Drug Delivery*. 2015;22(1):79–85. DOI: 10.3109/10717544.2013.871600.
7. Manjushree M., Revanasiddappa H. D. Evaluation of binding mode between anticancer drug etoposide and human serum albumin by numerous spectrometric techniques and molecular docking. *Chemical Physics*. 2020;530:110593. DOI: 10.1016/j.chemphys.2019.110593.
8. Ohnuma T., Obata R., Nishiyama Y., Yamasaki T., Kamei H., Naito T., Oki T. Preparation and Antitumor Activity of 2″-O-, 3″-O- and 2″, 3″-Di-O-substituted Derivatives of Etoposide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1992;40(7):1783–1788. DOI: 10.1248/cpb.40.1783.
9. Leu Y.-L., Chen C.-S., Wu Y.-J., Chern J.-W. Benzyl ether-linked glucuronide derivative of 10-hydroxycamptothecin designed for selective camptothecin-based anticancer therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51(6):1740–1746. DOI: 10.1021/jm701151c.
10. Fu Q., Sun J., Zhang W., Sui X., Yan Z., He Z. Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2009;4(3):262–272. DOI: 10.2174/157489209789206869.
11. Mahidol C., Prawat H., Sangpetsiripan S., Ruchirawat S. Bioactive scalaranes from the Thai sponge *Hyrtios gumminae*. *Journal of Natural Products*. 2009;72(10):1870–1874.DOI: 10.1021/np900267v.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-66-71
УДК 615.454.142

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Оценка рисков для качества геля с коллагеназой камчатского краба в процессе фармацевтической разработки

Ю. О. Иванкова[1], Б. Б. Сысуев[2]✉, С. Б. Евсеева[3]

[1] Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России (ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России), 357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[3] Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственная фирма Фармация» (ООО «НПФ Фармация»), 400032, Россия, Волгоградская область, г. Волгоград, тер. Поселок Веселая Балка, д. 38, офис 13, 14

✉ **Контактное лицо:** Сысуев Борис Борисович. **E-mail:** bsb500@yandex.ru

ORCID: Ю. О. Иванкова – https://orcid.org/0000-0003-1418-9011; Б. Б. Сысуев – https://orcid.org/0000-0002-9933-1808; С. Б. Евсеева – https://orcid.org/0000-0002-9149-5090.

Статья поступила: 22.09.2022 **Статья принята в печать:** 05.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Производство и применение ферментных препаратов в составе наружных средств имеет особенности, связанные с их лабильностью. В предыдущих исследованиях на основании совокупности показателей выбрана основа – гель аэросила и оливкового масла, в котором стабилизация коллагеназы камчатского краба обеспечивается включением в липофильную основу. В процессе фармацевтической разработки выявляются критичные для качества показатели лекарственного препарата. С учетом лабильности коллагеназы камчатского краба актуальными являются исследования, направленные на выявление и минимизацию рисков.

Цель. Оценка и минимизация рисков в процессе фармацевтической разработки геля коллагеназы камчатского краба в рамках концепции QbD [«Фармацевтическая разработка» (ICH Q8)].

Материалы и методы. Исследования проводились на лабораторных образцах гелей с коллагеназой камчатского краба с применением методов анализа, рекомендованных Государственной фармакопеей (ГФ) РФ IV, а также ГОСТ 29188.3-91.

Результаты и обсуждение. Сформулирован целевой профиль разрабатываемого геля коллагеназы камчатского краба. На основании потенциальных критических характеристик материала дана оценка рисков фармацевтической субстанции – коллагеназы камчатского краба (размер частиц), вспомогательных веществ (концентрация и сорбционные свойства аэросила, окисление оливкового масла) и рассмотрены потенциальные меры для снижения указанных рисков. Выявлено, что размер частиц субстанции в исходном виде превышает нормы, предложенные для мазей-суспензий ГФ РФ IV, и требуется предварительное измельчение сырья. Фактор содержания аэросила являлся критическим. Наличие сорбционных свойств аэросила не влияло на протеолитическую и коллагенолитическую активность геля коллагеназы. Экспериментально доказано, что химическая нестабильность масляной фазы относится к критическим факторам, и обоснована целесообразность использования антиоксидантов (альфа-токоферола или бутилгидрокситолуола).

Заключение. В ходе исследования были теоретически обоснованы возможные риски фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ геля коллагеназы камчатского краба в соответствии с концепцией QbD. Дана экспериментальная оценка их возможного влияния на показатели качества геля, что позволит обеспечить качество готовой продукции при выпуске посредством устранения выявленных рисков.

Ключевые слова: коллагеназа, гель, фармацевтическая разработка, оценка рисков

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

Вклад авторов. Ю. О. Иванкова выполняла исследования и анализ данных. Б. Б. Сысуев разработал концепцию и дизайн исследования. С. Б. Евсеева принимала участие в разработке дизайна исследования и написании текста. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Иванкова Ю. О., Сысуев Б. Б., Евсеева С. Б. Оценка рисков для качества геля с коллагеназой камчатского краба в процессе фармацевтической разработки. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):66–71. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-66-71

The Quality Risk Assessment of Paralithodes Camtschaticus Collagenase Gel in the Process of Pharmaceutical Development

Julia O. Ivankova[1], Boris B. Sysuev[2]✉, Snezhana B. Evseeva[3]

[1] Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinin ave., Pyatigorsk, 357532, Russia
[2] I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[3] LLC "Pharmacy", office 13, 14, 38, ter. Village of Veselaya Balka, Volgograd, Volgograd Region, 400032, Russia

✉ **Corresponding author:** Boris B. Sysuev. **E-mail:** bsb500@yandex.ru

ORCID: Julia O. Ivankova – https://orcid.org/0000-0003-1418-9011; Boris B. Sysuev – https://orcid.org/0000-0002-9933-1808; Snezhana B. Evseeva – https://orcid.org/0000-0002-9149-5090.

Received: 22.09.2022 **Revised:** 05.07.2023 **Published:** 25.08.2023

© Иванкова Ю. О., Сысуев Б. Б., Евсеева С. Б., 2023
© Ivankova J. O., Sysuev B. B., Evseeva S. B., 2023

Abstract
Introduction. The manufacturing and application of enzyme preparations in the semisolid topical products has features associated with their lability. In previous studies, on the set of specifications the gel form was selected, containing aerosil and olive oil, in which the stabilization of collagenase from Paralithodes camtschaticus was ensured by lipophilic base. In the pharmaceutical development process, the drug critical quality attributes must be defined. Taking into account the lability of Paralithodes camtschaticus collagenase, the identification and minimizing risks are relevant.
Aim. The aim was the risk factors assessment and minimization during the pharmaceutical development of the gel, containing Paralithodes camtschaticus collagenase within the QbD concept.
Materials and methods. The laboratory samples of gels, containing Paralithodes camtschaticus collagenase, were tested, using the analysis methods recommended by the SP RF 14th ed., as well as GOST 29188.3-91.
Results and discussion. Based on the potential critical characteristics of the material, the pharmaceutical substance Paralithodes camtschaticus collagenase (particle size) and excipients (concentration and sorption properties of aerosil, oxidation of olive oil) risk factors were assessed, and potential measures to reduce these risks are considered. It was revealed that the substance particle size in its origin exceeds the norm and requires preliminary grinding. The aerosil content factor was reveal as critical. The sorption properties of aerosil were not affected the proteolytic and collagenolytic activity of the collgenase gel. It was proved that chemical instability of oil refers to critical factors and the antioxidants (alpha-tocopherol or butylhydroxytoluene) content was justified.
Conclusion. In the course of the study, the Paralithodes camtschaticus collagenase gel the possible risks of pharmaceutical substances and excipients were theoretically justified in accordance with the QbD concept. An experimental assessment of their possible impact on the gel quality was given, which can improve the finished product quality during manufacturing manufacturing by eliminating the identified risks.

Keywords: collagenase, gel, pharmaceutical development, 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. Julia O. Ivankova carried out research, carried out analysis of the data obtained. Boris B. Sysuev developed the concept and design of the study. Snezhana B. Evseeva took part in the design of the study and the writing of the text. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Ivankova J. O., Sysuev B. B., Evseeva S. B. The quality risk assessment of paralithodes camtschaticus collagenase gel in the process of pharmaceutical development. *Drug development & registration*. 2023;12(3):66–71. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-66-71

ВВЕДЕНИЕ

Коллагеназы считаются эффективными протеолитическими ферментами для очищения ран, в то же время контент-анализ показал, что на российском фармацевтическом рынке присутствует ограниченное число средств на их основе: лиофилизированный порошок для инъекций «Коллализин», медицинская повязка «Дигестол», сорбент дренирующий полимерный стерильный «АсептиСорб»[1]. Исходя из этого, разработка состава геля с коллагеназой камчатского краба может считаться актуальной задачей [1, 2].

Производство и применение ферментных препаратов в составе наружных средств имеет особенности, связанные с их лабильностью. Ранее проведены исследования по выбору оптимальной основы мази коллагеназы камчатского краба, в которых на основании совокупности показателей выбран гель аэросила и оливкового масла (липогель, олеогель). Был реализован подход к стабилизации коллагеназы путем включения в липофильную основу для исключения аутолиза [3].

Соблюдение принципа «качество в процессе разработки» (QbD) является базовой концепцией фармацевтической разработки, предполагающей, что качество закладывается на этапе разработки. В процессе определения состава выявляются особенности фармацевтических субстанций (ФС) и вспомогательных веществ (ВВ), критичные для качества лекарственного препарата. С учетом специфики ФС – лабильности коллагеназы камчатского краба – актуальными являются дальнейшие исследования, направленные на выявление и минимизацию рисков для качества [4–6].

Целью исследования были оценка и минимизация рисков в процессе фармацевтической разработки геля коллагеназы камчатского краба в рамках концепции QbD [«Фармацевтическая разработка» (ICH Q8)].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллагеназа камчатского краба (ТУ 9154-032-11734126-10) (ООО «Биопрогресс», Россия); оливковое масло рафинированное фармакопейное (Ph. Eur) (Франция); Аэросил А380 (Ph. Eur) (Evonik Degussa AG, Германия); DL-альфа-токоферол (витамин Е) (Ph. Eur) (Китай); бутилгидрокситолуол (Ph. Eur) (PanReac AppliChem, Испания).

Модельные образцы гелей (содержание аэросила 5–10 %) получали в лабораторных условиях. Проводили испытания образцов по ОФС.1.4.1.0008.18 «Мази» (описание, pH гелей, размер частиц субстанции).

[1] Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: http://grls.rosminzdrav.ru. Ссылка активна на 10.09.2022.

Таблица 1. Характеристика свойств ФС и ВВ, определяющих возможные риски

Table 1. Characteristics of the properties of pharmaceutical substances and excipients that determine possible risks

Ингредиент Ingredient	**Фактор риска** Risk factor	**Потенциальное воздействие на критические показатели качества геля** Potential impact on CQAS	**Мероприятия по снижению рисков** Risk reduction action plans
Коллагеназа камчатского краба Paralithodes camtschaticus collagenase	Размер частиц Particle size	Возможно нарушение однородности дозирования и равномерность распределения препарата по коже There may be a violation of uniformity of dosage units and the drug distribution on the skin	Размер частиц определяется в рамках разработки. Содержание белка должно контролироваться при производстве The particle size is determined as part of testing. The protein total content will be monitored during production
Аэросил А380 Aerosil A380	Концентрация Concentration	Влияет на вязкость, термостабильность, намазываемость Affects viscosity, thermal stability, spreadability	Выбор оптимальной концентрации в процессе разработки Choosing the optimal concentration in the development process
	Сорбционные свойства Sorption properties	Изменение активности и биодоступности за счет адсорбции фермента The activity and bioavailability changes due to the adsorption of the enzyme	При разработке необходимо оценивать протеолитическую и коллагенолитическую активность Proteolytic and collagenolytic activity will be evaluated during development
Оливковое масло Olive oil	Химическая нестабильность Chemical instability	Изменение органолептических свойств и показателя «Йодное число» в процессе хранения. The organoleptic properties and the parameter «iodine value» changes at storage	При разработке необходимо оценивать стабильность и проводить исследования по снижению риска Stability will be assessed during development and risk reduction studies will be carried out

Определение термостабильности гелей осуществляли по методикам, изложенным в ГОСТ 29188.3-91 «Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсий». Образцы геля массой 10,0 г помещали в климатическую камеру с температурой 40–45 °С на 7 суток. Затем выдерживали при температуре 10–12 °С 7 суток, после чего выдерживали при температуре 20–25 °С 3 суток. Стабильность определяли визуально.

Изучали стабильность при хранении геля коллагеназы в соответствии с ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств». Образцы, помещенные по 50,0 г в плотно укупоренные банки оранжевого стекла, хранили при температуре 40 °С, что согласно Решению Коллегии ЕЭК № 69 от 10.05.2018 г. соответствует 12 мес. хранения при температуре не выше +10 °С.

Коллагеназную активность определяли методом гидролиза коллагена в пересчете на L-лейцин, используя оптическую плотность окрашенного соединения нингидрина с продуктами гидролиза коллагена при длине волны 400 нм. Активность коллагеназы выражали в МЕ. 1 МЕ = 1 моль продуктов гидролиза коллагена, образованный за 1 мин 1 мг фермента при 37 °С.

Протеолитическую активность геля коллагеназы определяли, используя в качестве субстрата желатиновый гель 5 %, помещенный в пробирки. На поверхность желатинового геля наносили навеску исследуемого геля 1,0 г и фиксировали размер зоны желатина, подвергшийся деструкции, выражая интенсивность протеолиза в мм/г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка состава предусматривает выявление потенциальных критических характеристик материала для обеспечения надлежащего качества продукта и их контроля[1]. На основании данных литературы, НД и предварительных исследований дана оценка рисков, связанных со свойствами ФС – коллагеназы камчатского краба, а также ВВ, и возможные мероприятия для их снижения, которые могут быть реализованы в том числе в процессе фармацевтической разработки (таблица 1) [6–8].

Как следует из данных таблицы 1, одним из критериев риска является размер частиц коллагеназы камчатского краба. В случае, если ФС суспендирована в лекарственной форме, размер частиц может изменяться из-за агрегации, разделения фаз на протяжении срока годности. Изменения данного параметра в мазях-суспензиях могут привести к нарушению однородности дозирования коллагеназы в геле, в частности, за счет седиментации более крупных частиц и, как следствие, нарушению точности дозирования фермента и эффективности терапии. Размер частиц может оказывать влияние на характеристику «распределение по коже» геля, что может негативно сказываться на комплаенсе. Согласно требованиям ОФС.1.4.1.0008.18 размер частиц в мазях-суспензиях не должен превышать 100 мкм. Для установления влияния риска по показателю «Размер

[1] European Medicines Agency. Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products. 2018. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/quality-equivalence-topical-products. Accessed: 10.09.2022.

частиц» были проведены исследования по установлению размера частиц методом световой микроскопии. Результаты представлены на рисунке 1.

Как показали результаты анализа субстанции коллагеназы камчатского краба, размер частиц в исходном виде составляет от 10 до 150 мкм и превышает нормы, рекомендуемые ОФС для мазей-суспензий, поэтому требуется предварительное измельчение сырья.

Концентрация гелеобразователя Аэросила А380 может оказывать влияние на вязкость, термостабильность, намазываемость готового продукта. Недостаточная концентрация аэросила может приводить к расслаиванию, особенно в условиях возможного изменения температуры в процессе хранения, так как процесс синерезиса гелей ускоряется при низких и высоких температурах [9, 10]. Тестированию термостабильности в условиях хранения при различных температурах подвергались модельные образцы геля коллагеназы с концентрацией Аэросила А380 5–10 %. (таблица 2).

Таблица 2. Результаты оценки термостабильности образцов геля

Table 2. Results of thermal stability assessment of gel samples

Образец Sample	Температурный режим, срок хранения (7 суток) Temperature range, storage time (7 days)		
	10–12 °C	20–25 °C	40–45 °C
Образец 1 (аэросила 5,0 %) Sample 1 (aerosil 5,0 %)	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Расслоение Unstable
Образец 2 (аэросила 6,0 %) Sample 2 (aerosil 6,0 %)	Расслоение Unstable	Стабилен Stable	Стабилен Stable
Образец 3 (аэросила 7,0 %) Sample 3 (aerosil 7,0 %)	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable
Образец 4 (аэросила 8,0 %) Sample 4 (aerosil 8,0 %)	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable
Образец 5 (аэросила 9,0 %) Sample 5 (aerosil 9,0 %)	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable
Образец 6 (аэросила 10,0 %) Sample 6 (aerosil 10,0 %)	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable

В ходе исследования установлено, что образец 1 (аэросила 5 %) после выдерживания в течение 7 суток при температуре 40–45 °C подвергся расслоению, а в образце 2 (аэросила 6 %) расслоение произошло после хранения в течение 7 суток при температуре 10–12 °C. Образцы с концентрацией аэросила 7–10 % оставались стабильными при всех температурных условиях. Таким образом, полученные данные подтверждают, что содержание аэросила в составе основы является критическим.

Для оценки возможного нежелательного влияния аэросила на протеолитическую и коллагенолитическую активность, обеспечивающую эффективность раноочищения, проведены исследования протеолитической активности геля на модели гидролиза желатина (рисунок 2) и количественная оценка коллагенолитической активности исследуемого геля (таблица 3).

Таблица 3. Коллагенолитическая активность геля с коллагеназой

Table 3. Collagenolytic activity of gel with collagenase

Образец Sample	Удельная активность геля экспериментальная, МЕ/г Specific gel activity, experiment, IU/g	Удельная активность геля теоретическая*, МЕ/г Specific gel activity, theoretical*, IU/g
Гель 0,5 % Gel 0,5 %	72,56 ± 0,11	72,62 ± 0,15
Гель 0,2 % Gel 0,2 %	29,30 ± 1,32	29,01 ± 0,41

Примечание. * Коллагенолитическая активность фермента коллагеназы по L-лейцину, определенная экспериментально, составляет 0,0555 МЕ/мг.

Note. *Collagenolytic activity of the collagenase enzyme for L-leucine, determined experimentally, is 0.0555 IU/mg.

Как следует из данных, представленных на рисунке 2, модельные образцы геля с концентраций коллагеназы от 0,1 до 0,5 % превосходили препарат сравнения «Ируксол» по протеолитической активности в отношении желатина. Выраженная протеолитическая активность модельных образцов сохранялась на временном промежутке от 0 до 24 часов. Как следует

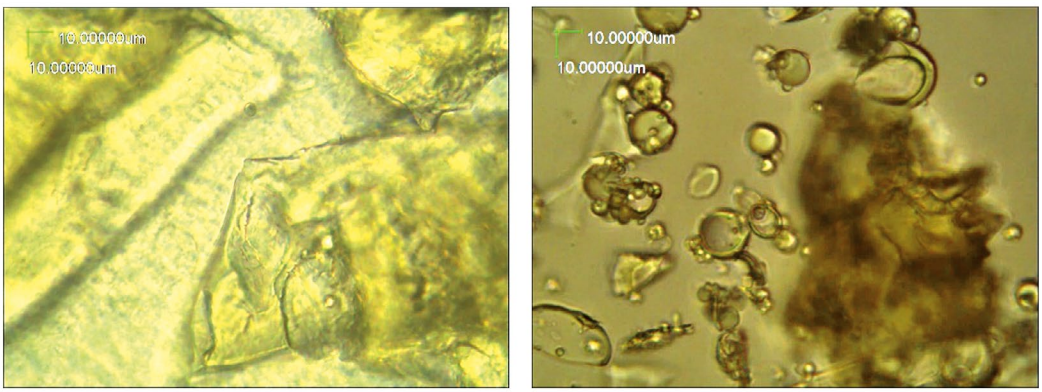


Рисунок 1. Размер частиц субстанции коллагеназы камчатского краба

Figure 1. Paralithodes camtschaticus collagenase substance particle size

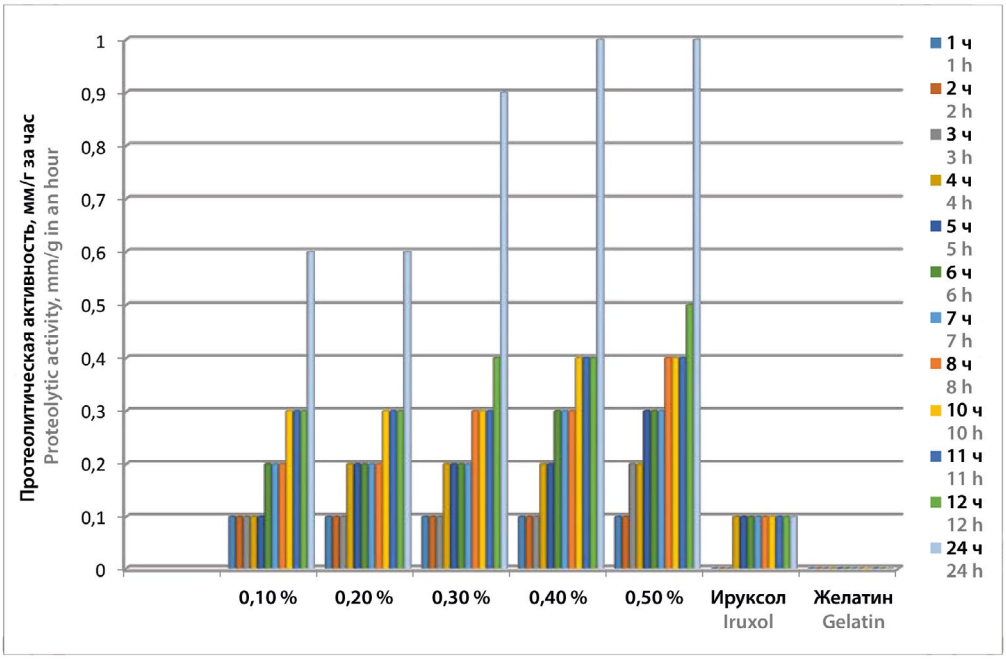


Рисунок 2. Протеолитическая активность геля коллагеназы различной концентрации

Figure 2. Proteolytic activity of collagenase of different concentrations gel samples

из данных таблицы 3, экспериментально определенная удельная активность геля коллагеназы сопоставима с теоретически рассчитанной для испытуемых концентраций фермента 0,20 и 0,50 %. Таким образом, наличие сорбционных свойств у аэросила не влияло на протеолитическую и коллагенолитическую активность геля с коллагеназой.

Химическая лабильность оливкового масла относится к факторам риска разрабатываемого геля (см. таблица 1), так как может оказывать влияние на его стабильность и сроки годности из-за окисления ненасыщенных жирных кислот, которое возможно в процессе хранения (изменение запаха, pH лекарственной формы). Исходя из этого, было изучено влияние оливкового масла на качество геля и возможность снижения рисков для качества путем введения в состав основы антиоксидантов: альфа-токоферола (образец геля 8) и бутилгидрокситолуола (образец геля 9) в концентрации 0,5 % (согласно рекомендуемым нормам ввода). Исследовано влияние антиоксидантов на качество геля в процессе хранения методом ускоренного изучения стабильности в течение 46 сут., что соответствует 12 мес. хранения при температуре не выше +10 °C (Решение Коллегии ЕЭК № 69 от 10.05.2018 г.). Результаты представлены в таблице 4.

Как следует из данных таблицы 4, в образцах геля, не содержащих антиоксидант, изменялся запах. В процессе хранения значение pH снижалось во всех образцах. В образце геля 7 показатель изменился с 5,60 ± 0,18 до 5,30 ± 0,18, оставаясь в пределах pH содержимого раны на стадии воспаления (5,5 до 7,0.) [11]. Максимальное снижение протеолитической активности зафиксировано у образцов без антиоксиданта. Также наиболее значительно снижалось значение йодного числа в образцах без антиоксидантов, что свидетельствует об эффективности добавления в состав геля антиоксиданта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования в рамках фармацевтической разработки геля коллагеназы камчатского краба в соответствии с концепцией QbD были теоретически обоснованы возможные риски ФС – коллагеназы камчатского краба и ВВ (оливкового масла, аэросила). Дана экспериментальная оценка их возможного влияния на качество геля и предложены пути снижения рисков. Полученные данные позволят минимизировать риски при производстве геля коллагеназы, а также гарантировать качество готовой продукции в процессе всего срока годности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Waycaster C., Carter M. J., Gilligan A. M., Mearns E. S., Fife C. E., Milne C. T. Comparative cost and clinical effectiveness of clostridial collagenase ointment for chronic dermal ulcers. *Journal of Comparative Effectiveness Research*. 2018;7(2):149–165. DOI: 10.2217/cer-2017-0066.
2. Майорова А. В., Сысуев Б. Б., Иванкова Ю. О., Ханалиева И. А. Коллагеназы в медицинской практике: современные средства на основе коллагеназы и перспективы их совершенствования. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5):260–270. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-260-270.
3. Иванкова Ю. О., Верниковский В. В., Степанова Э. Ф. Исследования по выбору основы для наружной лекарственной формы коллагеназы. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;2–2:478.

Таблица 4. Оценка рисков для качества геля коллагеназы в процессе хранения, связанных с наличием/отсутствием антиоксиданта

Table 4. Assessment of risks on the collagenase gel quality during storage, associated with the presence/absence of the antioxidant

Показатель Index	Свежеприготовленный After preparation			Хранение 46 суток, 40 °С 46 storage days, 40 °С		
	Образец 7 Sample 7	Образец 8 Sample 8	Образец 9 Sample 9	Образец 7 Sample 7	Образец 8 Sample 8	Образец 9 Sample 9
Описание Appearance	Прозрачный однородный гель желто-коричневого цвета с характерным запахом коллагеназы Yellow-brown transparent homogeneous gel, odor characteristic to collagenase	Прозрачный однородный гель желто-коричневого цвета с характерным запахом коллагеназы Yellow-brown transparent homogeneous gel, odor characteristic to collagenase	Прозрачный однородный гель желто-коричневого цвета с характерным запахом коллагеназы Yellow-brown transparent homogeneous gel, odor characteristic to collagenase	Прозрачный однородный гель коричневого цвета с резким запахом, характерным для прогоркших масел Transparent brown color homogeneous gel with odor of rancid oils	Прозрачный однородный гель желто-коричневого цвета с характерным запахом коллагеназы Yellow-brown transparent homogeneous gel, odor characteristic to collagenase	Прозрачный однородный гель желто-коричневого цвета с характерным запахом коллагеназы Yellow-brown transparent homogeneous gel, odor characteristic to collagenase
pH	5,60 ± 0,18	5,63 ± 0,10	5,67 ± 0,28	5,30 ± 0,18	5,70 ± 0,10	5,60 ± 0,18
Йодное число Iodine value	71,33 ± 1,06	70,67 ± 1,06	67,67 ± 1,06	61,67 ± 1,28	66,33 ± 1,06	66,67 ± 1,06
Протеолитическая активность, мм/г Proteolytic activity, mm/g	12,33 ± 0,54	11,00 ± 0,66	10,83 ± 0,42	9,00 ± 0,00	8,00 ± 0,66	9,08 ± 0,20

4. Namjoshi S., Dabbaghi M., Roberts M. S., Grice J. E., Mohammed Y. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products. *Pharmaceutics*. 2020;12(3):287. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030287.
5. Верниковский В. В., Степанова Э. Ф. Иммобилизованные протеазы для очищения раневых поверхностей. *Российский химический журнал*. 2010;LIV(6): 94–100.
6. Chang R.-K., Raw A., Lionberger R., Yu L. Generic development of topical dermatologic products, Part II: quality by design for topical semisolid products. *The AAPS Journal*. 2013;15(3):674–683. DOI: 10.1208/s12248-013-9472-8.
7. Sivaraman A., Banga A. K. Quality by design approaches for topical dermatological dosage forms. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*. 2015;4:9–21. DOI: 10.2147/rrtd.s82739.
8. Chavda H. Qbd in developing topical dosage forms. *Ely. J. Pharm. Res*. 2016;2:1–2.
9. Xiong C., Wei F., Li W., Liu P., Wu Y., Dai M., Chen J. Mechanism of Polyacrylamide Hydrogel Instability on High-Temperature Conditions. *ACS Omega*. 2018;3(9):10716–10724. DOI: 10.1021/acsomega.8b01205.
10. Albiero M., Fullin A., Villano G., Biasiolo A., Quarta S., Bernardotto S., Turato C., Ruvoletto M., Fadini G. P., Pontisso P., Morpurgo M. Semisolid Wet Sol-Gel Silica/Hydroxypropyl Methyl Cellulose Formulation for Slow Release of Serpin B3 Promotes Wound Healing In Vivo. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1944. DOI: 10.3390/pharmaceutics14091944.
11. Морозов А. М., Армасов А. Р., Сергеев А. Н., Жуков С. В., Беляк М. А., Соболь Е. А., Муравлянцева М. М. Влияние pH на динамику течения раневого процесса в послеоперационном периоде. Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». *Реабилитация, Врач и Здоровье*. 2021;11(2):87–91. DOI: 10.20340/vmi-rvz.2021.2.clin.9.

REFERENCES

1. Waycaster C., Carter M. J., Gilligan A. M., Mearns E. S., Fife C. E., Milne C. T. Comparative cost and clinical effectiveness of clostridial collagenase ointment for chronic dermal ulcers. *Journal of Comparative Effectiveness Research*. 2018;7(2):149–165. DOI: 10.2217/cer-2017-0066.
2. Mayorova A. V., Sysuev B. B., Ivankova J. O., Hanalieva I. A. Collagenases in medical practice: modern collagenase-based preparations and prospects for their improvement. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019; 7(5):260–270. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-260-270.
3. Ivankova J. O., Vernikovsky V. V., Stepanova E. F. Study selection framework for external medicinal forms collagenase. *Modern problems of science and education*. 2015;2–2:478. (In Russ.)
4. Namjoshi S., Dabbaghi M., Roberts M. S., Grice J. E., Mohammed Y. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products. *Pharmaceutics*. 2020;12(3):287. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030287.
5. Vernikovsky V. V., Stepanova E. F. Immobilized proteases for cleaning wound surfaces. *Russian Journal of General Chemistry*. 2010;LIV(6):94–100. (In Russ.)
6. Chang R.-K., Raw A., Lionberger R., Yu L. Generic development of topical dermatologic products, Part II: quality by design for topical semisolid products. *The AAPS Journal*. 2013;15(3):674–683. DOI: 10.1208/s12248-013-9472-8.
7. Sivaraman A., Banga A. K. Quality by design approaches for topical dermatological dosage forms. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*. 2015;4:9–21. DOI: 10.2147/rrtd.s82739.
8. Chavda H. Qbd in developing topical dosage forms. *Ely. J. Pharm. Res*. 2016;2:1–2.
9. Xiong C., Wei F., Li W., Liu P., Wu Y., Dai M., Chen J. Mechanism of Polyacrylamide Hydrogel Instability on High-Temperature Conditions. *ACS Omega*. 2018;3(9):10716–10724. DOI: 10.1021/acsomega.8b01205.
10. Albiero M., Fullin A., Villano G., Biasiolo A., Quarta S., Bernardotto S., Turato C., Ruvoletto M., Fadini G. P., Pontisso P., Morpurgo M. Semisolid Wet Sol-Gel Silica/Hydroxypropyl Methyl Cellulose Formulation for Slow Release of Serpin B3 Promotes Wound Healing In Vivo. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1944. DOI: 10.3390/pharmaceutics14091944.
11. Morozov A. M., Armasov A. R., Sergeev A. N., Zhukov S. V., Sobol E. A., Muravlyantseva M. M., Belyak M. A. Influence of pH on the dynamics of the wound process in the postoperative period. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ" (Rehabilitation, doctor and health)*. 2021;11(2):87–91. (In Russ.) DOI: 10.20340/vmi-rvz.2021.2.clin.9.

ЦФА | центр фармацевтической аналитики

научно-производственный журнал
РРЛС
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

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-73-79
УДК 615.32; 615.07

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка состава и технологии таблеток на основе сухого экстракта астрагала перепончатого

М. В. Ароян✉, Д. Э. Лохматова, Д. Д. Ванторина, Е. К. Новикова, И. Е. Каухова, М. В. Нечаев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ **Контактное лицо:** Ароян Мария Вахтанговна. **E-mail:** mariya.aroyan@pharminnotech.com

ORCID: М. В. Ароян – https://orcid.org/0000-0002-8314-8398; Д. Э. Лохматова – 000-0002-9771-0839; Д. Д. Ванторина – https://orcid.org/0000-0001-8647-532X; Е. К. Новикова – https://orcid.org/0000-0002-2602-0697; И. Е. Каухова – https://orcid.org/0000-0002-0896-6956; М. В. Нечаев – https://orcid.org/0000-0003-4754-724.

Статья поступила: 04.04.2023 **Статья принята в печать:** 14.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Работоспособность человека зависит от внешних и внутренних факторов. Из ряда внешних факторов экологический аспект является одним из ведущих. Внутренние факторы взаимосвязаны с внешними. К числу внутренних факторов относятся общее состояние организма человека, нормальное функционирование отдельных систем и органов. Говоря о внутренних факторах, можно отметить рациональность приема препаратов растительного происхождения с целью профилактики развития патологий. Целый ряд растений содержит вещества, способные повышать работоспособность за счет укрепления сердечно-сосудистой системы, нормализации работы печени, налаживания суточных ритмов, снижения стресса. В связи с этим разработка состава и технологии получения лекарственных средств на основе субстанций растительного происхождения не теряет актуальности.

Цель. Разработка состава твердой лекарственной формы на основе сухого экстракта астрагала перепончатого, содержащего сапонины.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований использовали субстанцию – сухой экстракт астрагала перепончатого, стандартизованный в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XIV изд. В качестве вспомогательных веществ в технологии таблеток использовали лактозы моногидрат, кальция стеарат, метилцеллюлозу, крахмал кукурузный, тальк. В лабораторных условиях гранулирование осуществляли методом продавливания влажных масс. В качестве увлажнителя использовали раствор метилцеллюлозы 3 %. Показатели качества готовой лекарственной формы, таблеток, определяли по методикам, описанным в ГФ РФ XIV.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований предложен состав твердой лекарственной формы на основе сухого экстракта астрагала перепончатого. Определены основные показатели качества полученной лекарственной формы, и разработан проект спецификации качества на лекарственное средство.

Заключение. В настоящем исследовании была предложена технология получения сухого экстракта астрагала перепончатого травы. Определены показатели качества полученной растительной субстанции. Были разработаны состав и технология производства таблеток на основе сухого экстракта астрагала перепончатого травы. Определены основные показатели качества таблеток на основе сухого экстракта травы астрагала перепончатого. Разработан проект спецификации качества полученной лекарственной формы.

Ключевые слова: астрагал перепончатый, сухой экстракт, сапонины, работоспособность, таблетки

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

Вклад авторов. Д. Э. Лохматова, М. В. Ароян, Е. К. Новикова – проведение экспериментов по разработке состава и технологии получения лекарственного средства. Д. Д. Ванторина, И. Е. Каухова, М. В. Нечаев – анализ и интерпретация полученных данных. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

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

Для цитирования: Ароян М. В., Лохматова Д. Э., Ванторина Д. Д., Новикова Е. К., Каухова И. Е., Нечаев М. В. Разработка состава и технологии таблеток на основе сухого экстракта астрагала перепончатого. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):73–79. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-73-79

Development of the Composition and Technology of Tablets Based on *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge Dry Extract

Mariya V. Aroyan✉, Dar'ya E. Lohmatova, Dar'ya D. Vantorina, Ekaterina K. Novikova, Irina E. Kaukhova, Mikhail V. Nechaev

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

✉ **Corresponding author:** Mariya V. Aroyan. **E-mail:** mariya.aroyan@pharminnotech.com

ORCID: Mariya V. Aroyan – https://orcid.org/0000-0002-8314-8398; Dar'ya E. Lohmatova – 000-0002-9771-0839; Dar'ya D. Vantorina – https://orcid.org/0000-0001-8647-532X; Ekaterina K. Novikova – https://orcid.org/0000-0002-2602-0697; Irina E. Kaukhova – https://orcid.org/0000-0002-0896-6956; Mikhail V. Nechaev – https://orcid.org/0000-0003-4754-724.

Received: 04.04.2023 **Revised:** 14.08.2023 **Published:** 25.08.2023

© Ароян М. В., Лохматова Д. Э., Ванторина Д. Д., Новикова Е. К., Каухова И. Е., Нечаев М. В., 2023
© Aroyan M. V., Lohmatova D. E., Vantorina D. D., Novikova E. K., Kaukhova I. E., Nechaev M. V., 2023

Abstract
Introduction. Human performance depends on external and internal factors. Of a number of external factors, the environmental aspect is one of the leading ones. Internal factors are interrelated with external ones. The latter include the general condition of the human body, as well as the normal functioning of individual systems and organs. It must be noted that the use of herbal drugs in order to prevent the development of pathologies caused by internal factors is rational. A number of plants contain substances that can improve performance by strengthening the cardiovascular system, normalizing the liver, adjusting daily rhythms, reducing stress. In this regard, the development of the composition and technology of drugs based on substances of plant origin does not lose relevance.
Aim. Development of the composition of solid oral dosage form based on dry extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge containing saponins.
Materials and methods. As an object of research, a substance was used – dry extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge, standardized in accordance with the requirements of SP XIV ed. Lactose monohydrate, calcium stearate, methylcellulose, corn starch, talc were used as excipients in the tablet technology. Under laboratory conditions, granulation was carried out by the wet mass extrusion method. A 3 % methylcellulose solution was used as the wetting reagent. Quality parameters of the final dosage form, tablets, were determined according to the methods described in SP XIV ed.
Results and discussion. As a result of the conducted research, the composition of a solid oral dosage form based on a dry extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge was proposed. The main quality indicators of the obtained dosage form are determined. A design quality specification has been developed for a drug.
Conclusion. The present study proposed technology dry extract for *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge herb. Quality index of the obtained plant substance are determined. The composition and technology of tablets based on the dry extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge herb have been developed. The main quality indicators of tablets based on the dry extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge herb were determined. A draft quality specification of the resulting dosage form has been developed.

Keywords: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge, dry extract, saponins, fitness to work, tablets

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

Contribution of the authors. Dar'ya E. Lohmatova, Mariya V. Aroyan, Ekaterina K. Novikova conducting experiments on the development of the composition and technology of the drug. Dar'ya D. Vantorina, Irina E. Kaukhova, Mikhail V. Nechaev processed the data obtained. All the authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Aroyan M. V., Lohmatova D. E., Vantorina D. D., Novikova E. K., Kaukhova I. E., Nechaev M. V. Development of the composition and technology of tablets based on *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge dry extract. *Drug development & registration*. 2023;12(3):73–79. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-73-79

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос повышения работоспособности человека, адаптации к внешним условиям является актуальным более века [1]. Уже в 850 году нашей эры народы Эфиопии жевали свежие зерна кофе, заметив их бодрящий эффект. История чая как адаптогенного средства уходит корнями в 2737 год до нашей эры, когда Шэнь-нуну в котел с кипящей водой случайно упали листы чайного дерева, отвар оказался вкусным и бодрящим. Но сейчас известно гораздо больше веществ и их источников, способных оказывать адаптогенный эффект. Наиболее изученными лекарственным растительным сырьем с точки зрения адаптогенной активности являются элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus*), женьшень (*Panax ginseng*), ашваганда (*Withania somnifera*), лимонник китайский (*Schisandra chinensis*) и родиола розовая (*Rhodiola rósea*). Биологически активные вещества, обуславливающие адаптогенные свойства, в основном относятся к флавоноидам, терпеноидам и фенилпропаноидным гликозидам [2–4]. Все большее внимание привлекают перспективы использования древесной зелени хвойных деревьев [5–7].

В данной статье представлены более подробные данные об астрагале перепончатом (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge). Это растение было известно еще кочевым народам Азии: его настои и отвары являются неотъемлемой частью традиционного питания. Имеется значительное количество публикаций, посвященных изучению фармакологической активности субстанций астрагала перепончатого, свидетельствующих о перспективности его использования в качестве лекарственного средства [8, 9].

Иммуностимулирующая активность астрагала лечебного широко изучалась в Китае в 1970–80-х годах [9]. Исследователей интересовал вопрос о пользе растения для пациентов, подвергшихся химиотерапии. Оказалось, что растение действовало как неспецифичный стимулятор иммунной системы, активно поддерживая нормальную продукцию белых клеток крови. Было также обнаружено, что астрагал хорошо поддерживает работу органов желудочно-кишечного тракта у таких пациентов, стимулирует у них

подавленный и отсутствующий аппетит. Установлено, что иммуностимулирующий эффект астрагала обуславливают полисахариды, сапонины [10–12]. Препараты на основе астрагала перепончатого обладают тонизирующим свойствами, применяются при общей усталости или затяжной депрессии.

Важным этапом в разработке технологии получения лекарственного средства является выбор лекарственной формы. Таблетки как лекарственная форма обладают рядом преимуществ: точностью дозирования, удобством хранения, возможностью маскировки неприятных органолептических свойств (вкус, запах, окрашивающая способность), возможностью сочетания лекарственных веществ, несовместимых по физико-химическим свойствам в других лекарственных формах, локализацией действия лекарственных веществ в определенном отделе желудочно-кишечного тракта [13].

Цель работы – разработка состава твердой лекарственной формы, таблеток, на основе сухого экстракта астрагала перепончатого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Астрагала перепончатого трава (ООО «Компания Хорст», Россия), крахмал картофельный (CAS: 121095.1210, ООО «Лабораторка», Россия), крахмал кукурузный (CAS: 9005-84-9, ООО «Лабораторка», Россия), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – 90 (EMCOCEL® 90M, CAS № 9004-34-6, JRS Pharma GmbH & Co. KG, Германия), стеарат кальция (х.ч., ООО «Реактив», Россия), лактозы моногидрат (АО «ВЕКТОН», Россия), аэросил (х.ч., АО «ВЕКТОН», Россия), трикальцийфосфат (CAS: 7789-77-7, Catrosa, Италия), дикальцийфосфат (CAS: 7789-78-6, Catrosa, Италия), метилцеллюлоза (RB-955189, Acros Organics, Россия).

Методы

Входной контроль качества растительного сырья – астрагала перепончатого травы – проводили по следующим показателям: коэффициент водопоглощения; влажность (анализатор влажности «Эвлас-2М», Россия); общая зола; зола, нерастворимая в 10%-й соляной кислоте (печь муфельная лабораторная LOIP LF-7/13-G1, Россия); органические и минеральные примеси (стандартный набор сит «ЭКРОС», ТУ 3618-001-39436682-98, Россия); содержание экстрактивных веществ; фракционный состав (стандартный набор сит «ЭКРОС», ТУ 3618-001-39436682-98, Россия). Анализ был проведен согласно требованиям Государственной фармакопеи РФ 14 издания[1].

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 14.09.2022.

Для получения сухого экстракта астрагала перепончатого, содержащего сапонины, навеску лекарственного растительного сырья, измельченную на электротраво- и корнерезке (ТУ 37-53 тип 622-1-М, Россия) до размера частиц 1,0–2,0 мм, загружали в емкость, заливали экстрагентом – спиртом этиловым 70 % в соотношении сырье : экстрагент (1 : 20). Экстрагирование было проведено методом перколяции. Полученное извлечение отстаивали при температуре не выше 8 °С в течение 40 минут, отфильтровывали. Экстракт сушили в сушильном шкафу (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 70–80 °С до тех пор, пока остаточное содержание влаги в экстракте составляло не более 5 %. Сухой экстракт измельчали и просеивали через сито 1,0 мм [15, 16]. Были определены основные показатели качества сухого экстракта: описание, потеря в массе при высушивании (анализатор влажности «Эвлас-2М», Россия), количественное содержание сапонинов (электроспектрофотометр UV mini-1240, Shimadzu Япония), сыпучесть (оборудование для определения сыпучести ВП12А ТУ 64-7-260).

Для получения твердой лекарственной формы сухой экстракт астрагала перепончатого, вспомогательные вещества (крахмал кукурузный, кальция стеарат) просеивали через сито с размером ячеек 0,5 мм. Компоненты взвешивали на лабораторных весах «Сартогосм» СЕ 612-С (ООО «САРТОГОСМ», Россия). Гранулы получали методом продавливания влажных масс. Вспомогательные вещества (кроме лубрикантов) смешивали и увлажняли 3%-м раствором метилцеллюлозы. Полученную массу гранулировали через сито-гранулятор с диаметром отверстия 3 мм. Полученные гранулы высушивали в сушильном шкафу (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 25–27 °С в течение 30 минут. Затем высушенный гранулят калибровали через сито-гранулятор с диаметром отверстия 1 мм и опудривали. Таблетирование проводили на гидравлическом прессе (ТУ 3822-002-85479441-2008, Lab Tools, Россия).

Были определены основные показатели качества таблеток на основе сухого экстракта травы астрагала перепончатого: описание, однородность массы (ВКЛТ-500 по ГОСТ 24104-88, Россия), прочность на истирание (тестер истираемости таблеток GUOMING CS-1, Китай), распадаемость (тестер распадаемости таблеток GUOMING BJ-1, Китай), растворение (тестер для определения показателя «Растворение» DT 820, ERWEKA GmbH, Германия), прочность на раздавливание (машина раздавливания таблеток GUOMING YD-3, Китай), количественное содержание сапонинов (электроспектрофотометр UV mini-1240, Shimadzu Япония).

Определение суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин в лекарственном растительном сырье, сухом экстракте и готовой лекарственной форме проводили согласно Государственной фармакопее 14 издания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате определения показателей качества астрагала перепончатого травы было установлено, что растительное сырье соответствует требованиям ГФ РФ XIV издания, предъявляемым к лекарственному растительному сырью [14].

Результаты определения числовых показателей представлены в таблице 1.

По вышеизложенной методике был получен сухой экстракт астрагала перепончатого и определены показатели качества согласно ГФ РФ XIV. Результаты испытаний приведены в таблице 2.

В работе проведены исследования по изучению влияния вспомогательных веществ на показатели качества готового продукта [17]. В качестве вспомогательных веществ были изучены следующие компоненты: крахмал картофельный, микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), лактозы моногидрат, стеариновая кислота, кальция стеарат, метилцеллюлоза, трикальцийфосфат, дикальцийфосфат, крахмал кукурузный. Были изучены 6 составов таблеток с сухим экстрактом астрагала перепончатого, представленные в таблице 3. Исследовались такие показатели, как описание, прочность на истирание, прочность на раздавливание, распадаемость. Результаты представлены в таблице 3.

На основании анализа результатов эксперимента установлено, что составы таблеток № 1–3, 5 и 6 не соответствуют требованиям нормативной документации по показателю распадаемость. Состав таблеток № 4, представленный в таблице 4, имеет удовлетворительные показатели. В ходе работы было произведено несколько партий таблеток на основе сухого экстракта астрагала перепончатого травы и проведена оценка их качества. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 1. Результаты определения числовых показателей качества астрагала перепончатого травы

Table 1. The results of determining the numerical parameters quality of the *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge herbal

Наименование показателя The name of the indicator		**НД** RD	**Требования НД** Requirement RD	**Экспериментальные данные** Results
Влажность, % Humidity, %		ОФС.1.5.3.0007.15 GM 1.5.3.0007.15	Не более 10 No more 10	6,07 ± 0,12
Водопоглощение Water absorption		ОФС.1.5.3.0012.15 GM 1.5.3.0012.15	Не менее 2 No less 2	2,40 ± 0,21
Зола общая, % Ash total, %		ОФС.1.2.2.2.0013.15 GM 1.2.2.2.0013.15	Не более 14 No more 14	3,86 ± 0,12
Зола, нерастворимая в 10% кислоте хлористоводородной, % Ash insoluble in hydrochloric acid, %		ОФС.1.5.3.0005.15 GM 1.5.3.0005.15	Не более 2,5 No more 2,5	1,72 ± 0,04
Другие части растения, не соответствующие установленному описанию сырья, % Other parts of the plant (flowers and pieces of stems), %		ОФС.1.5.3.0004.15 GM 1.5.3.0004.15	Не более 2 No more 2	Не обнаружены Not found
Органические примеси, % Organic impurity, %		ОФС.1.5.3.0004.15 GM 1.5.3.0004.15	Не более 1 No more 1	Не обнаружены Not found
Минеральные примеси, % Mineral impurity, %		ОФС.1.5.3.0004.15 GM 1.5.3.0004.15	Не более 1 No more 1	Не обнаружены Not found
Количественное содержание сапонинов в пересчете на β-эсцин, % Quantitative content of saponins in terms of β-escin, %		ОФС.1.5.3.0006.15 GM 1.5.3.0006.15	Не менее 1,5 No less 1,5	2,24 ± 0,01
Содержание экстрактивных веществ, % Extractive substances, %	Вода Water	ОФС.1.5.3.0006.15 GM 1.5.3.0006.15	Не нормируется Not standardized	33,12 ± 0,45
	Спирт этиловый 40 % Ethyl alcohol 40 %			34,03 ± 0,41
	Спирт этиловый 50 % Ethyl alcohol 50 %			35,20 ± 0,32
	Спирт этиловый 70 % Ethyl alcohol 70 %			37,74 ± 0,63
Фракционный состав, % Grinding of raw materials, %	>2,0 мм, <3,0 мм >2.0 mm, <3.0 mm			23,07 ± 0,06
	>1,0 мм, <2,0 мм >1.0 mm, <2.0 mm			33,88 ± 0,05
	>0,5 мм, <1,0 мм >0.5 mm, <1.0 mm			28,73 ± 0,02
	<0,5 мм <0.5 mm			6,24 ± 0,07

Таблица 2. Спецификация показателей качества сухого экстракта астрагала перепончатого травы

Table 2. Specification of quality indicators of dry extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge herb

Тест Test	Метод Method	Норма Norm	Экспериментальные значения Experimental values
Описание Description	ГФ РФ визуально SP visually	Порошок светло- коричневого цвета, с характерным запахом, горького вкуса The powder is light brown in color, with a characteristic odor, bitter taste	Порошок светло- коричневого цвета, с характерным запахом, горького вкуса The powder is light brown in color, with a characteristic odor, bitter taste
Потеря в массе при высушивании, % Weight loss on drying, %	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0010.15 GM 1.2.1.0010.15	Не более 5,00 No more	2,01 ± 0,22
Количественное содержание сапонинов в пересчете на эсцин, % Quantitative content of saponins in terms of escin, %	ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях» GM 1.2.1.1.0003.15 "Spectrophotometry in the UV and visible regions"	Не менее 5,00 No less	7,23 ± 0,12
Насыпной объем Bulk weight	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0016.15. GM 1.4.2.0016.15.	K ≤ 0,6	0,53 ± 0,18
Сыпучесть Looseness	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0016.15. GM 1.4.2.0016.15.	Сыпучесть выражают в секундах с точностью до 0,1 с, отнесенных к 100 г образца Looseness is expressed in seconds with an accuracy of 0.1 s, attributed to 100 g of the sample	25,21 ± 0,13

Таблица 3. Составы исследуемых таблеток без добавления сухого экстракта астрагала перепончатого травы

Table 3. Composition of test tablets without addition of dry extract of *Astragalus membranaceus* herb

№ состава № composition	Содержание компонентов, % Content of components, %											
	Крахмал картофельный Potato starch	МКЦ Microcrystalline cellulose	Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	Стеариновая кислота Stearic acid	Аэросил Aerosil	Кальция стеарат Calcium stearate	Трикальцийфосфат Tricaleium phosphate	Тальк Talc	Крахмал кукурузный Corn starch	Дикальцийфосфат № 1 Dicalcium phosphate № 1	Дикальцийфосфат № 2 Dicalcium phosphate № 2	МЦ Methylcellulose
1	10	10	30	0,5	5	–	–	–	–	–	–	14,5
Однородные таблетки, округлой формы, без фаски и без риски, коричневого цвета, травянистые на вкус. Прочность – 201,2 Н. Прошли испытание на истираемость. Не распались в течение 15 минут при 37 °С Uniform tablets, round shape, without bevel and without risks, brown color, herbaceous taste. Crushing strength – 201.2 N. Abrasion test passed. Did not break up for 15 minutes at 37 °C												
2	10	10	–	0,5	5	–	30	–	–	–	–	14,5
Однородные таблетки, округлой формы, без фаски и без риски, коричневого цвета, травянистые на вкус. Прочность – 198,1 Н. Прошли испытание на истираемость. Не распались в течение 15 минут при 37 °С Uniform tablets, round shape, without bevel and without risks, brown color, herbaceous taste. Crushing strength – 198.1 N. Abrasion test passed. Did not break up for 15 minutes at 37 °C												
3	5	–	45	–	–	1	–	0,5	–	–	–	18,5
Однородные таблетки, округлой формы, без фаски и без риски, коричневого цвета, травянистые на вкус. Прочность – 156,2 Н. Прошли испытание на истираемость. Не распались в течение 15 минут при 37 °С Uniform tablets, round shape, without bevel and without risks, brown color, herbaceous taste. Crushing strength – 156.2 N. Abrasion test passed. Did not break up for 15 minutes at 37 °C												
4	–	–	20	–	–	1	–	0,5	50	–	–	0,5
Однородные таблетки, округлой формы, без фаски и без риски, коричневого цвета, травянистые на вкус. Прочность – 67,9 Н. Прошли испытание на истираемость. Распались в течение 15 минут при 37 °С Uniform tablets, round shape, without bevel and without risks, brown color, herbaceous taste. Crushing strength – 67.9 N. Abrasion test passed. Broke up within 15 minutes at 37 °C												
5	–	–	–	–	–	1	–	0,5	50	20	–	0,5
Однородные таблетки, округлой формы, без фаски и без риски, коричневого цвета, травянистые на вкус. Прочность – 110,7 Н. Прошли испытание на истираемость. Не распались в течение 15 минут при 37 °С Uniform tablets, round shape, without bevel and without risks, brown color, herbaceous taste. Crushing strength – 110.7 N. Abrasion test passed. Did not break up for 15 minutes at 37 °C												
6	–	–	–	–	–	1	–	0,5	50	–	20	0,5
Однородные таблетки, округлой формы, без фаски и без риски, коричневого цвета, травянистые на вкус. Прочность – 131,8 Н. Прошли испытание на истираемость. Не распались в течение 15 минут при 37 °С Uniform tablets, round shape, without bevel and without risks, brown color, herbaceous taste. Crushing strength – 131.8 N. Abrasion test passed. Did not break up for 15 minutes at 37 °C												

Таблица 4. **Состав разработанных таблеток**

Table 4. **Composition of the developed tablets**

Наименование компонента Name of the component	**Содержание компонента, %** Component content, %
Действующие вещества Active ingredients	
Сухой экстракт астрагала перепончатого травы Dry extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge herb	28,0
Вспомогательные вещества inactive ingredient	
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	20,0
Крахмал кукурузный Amylum maidis	50,0
Стеарат кальция Calcium Stearate	1,0
Тальк Talcum powder	0,5
Метилцеллюлоза 3 % Methylcellulose 3 %	0,5

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании была предложена технология получения сухого экстракта астрагала перепончатого травы. Определены показатели качества полученной растительной субстанции. Были разработаны состав и технология таблеток на основе сухого экстракта астрагала перепончатого травы. Определены основные показатели качества таблеток на основе сухого экстракта травы астрагала перепончатого: описание, однородность массы, прочность на истирание, распадаемость, растворение, количественное содержание сапонинов. Разработан проект спецификации качества полученной лекарственной формы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Повыдыш М. Н., Лужанин В. Г., Ивкин Д. Ю., Белоусов М. В., Яковлев Г. П. Перспективы использования фитотерапевтических средств при нарушениях жирового и углеводного обменов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(3):130–135.
2. Esmaealzadeh N., Iranpanah A., Sarris J., Rahimi R. A literature review of the studies concerning selected plant-derived adaptogens and their general function in body with a focus on animal studies. *Phytomedicine*. 2022;105:154354. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154354.
3. Todorova V., Ivanov K., Delattre C., Nalbantova V., Karcheva-Bahchevanska D., Ivanova S. Plant Adaptogens—History and Future Perspectives. *Nutrients*. 2021;13(8):2861. DOI: 10.3390/nu13082861.
4. Panossian A. G., Efferth T., Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Kuchta K., Mukherjee P. K., Banerjee S., Heinrich M., Wu W., Guo D., Wagner H. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress- and aging-related diseases. *Medicinal research*. 2021;41(1):630–703. DOI: 10.1002/med.21743.
5. Гуляев Д. К., Белоногова В. Д., Мащенко П. С. Сезонная изменчивость компонентного состава эфирного масла древесной зелени ели обыкновенной *Piceae abietis* (Pinaceae). *Фундаментальные исследования*. 2015;7:14–19.
6. Sciukaite A., Loziene K., Labokas J., Jurkoniene S. Contents of some bioactive compounds in Norway spruce needles as affected by short-term storage at different conditions and implications for their industrial use. *Industrial Crops and Products*. 2022;182:114919. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114919.
7. Sirgedaitė-Šėžien V., Lučinskaitė I., Mildažienė V., Ivankov A., Koga K., Shiratan M., Laužikė K., Baliuckas V. Changes in Content of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Induced in

Таблица 5. **Показатели качества таблеток на основе сухого экстракта астрагала перепончатого травы**

Table 5. **Quality indicators of tablets based on dry extract of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge herb**

Показатель Index	**Метод** Method	**Норма** Norm	**Экспериментальные значения** Experimental values
Описание Description	ГФ РФ визуально SP visually	Светло-коричневый цвет, округлая форма Light brown color, rounded shape	Светло-коричневый цвет, округлая форма Light brown color, rounded shape
Однородность массы, % Uniformity of mass, %	ОФС.1.4.2.0009.15 GM 1.4.2.0009.15	Допустимое отклонение при массе больше 250 мг – 5 % The permissible deviation at a weight greater than 250 mg is 5 %	3,87 ± 0,08
Прочность на истирание, % Abrasive-resistance, %	ОФС.1.4.2.0004.15 GM 1.4.2.0004.15	Потеря в массе не больше 1 % No more 1 %	0,51 ± 0,12
Распадаемость Disintegration	ОФС.1.4.2.0013.15 GM 1.4.2.0013.15	Не более 15 минут при 37 °С No more than 15 minutes at 37 °С	7 минут при 37 °С 7 minutes at 37 °С
Растворение, % Dissolution, %	ОФС.1.4.2.0014.15 GM 1.4.2.0014.15	Количество ДВ не менее 75 % от заявленного содержания Not less than 75 % of the declared content	78,00 ± 0,01
Количественное содержание сапонинов в пересчете на эсцин, % Quantitative content of saponins in terms of escin, %	ОФС.1.2.3.0019.15 GM 1.2.3.0019.15	Не менее 0,05 No less 0,05	0,08 ± 0,01

Needles of Different Half-Sib Families of Norway Spruce (Picea abies (L.) H. Karst) by Seed Treatment with Cold Plasma. *Antioxidants*. 2022;11(8):1558. DOI: 10.3390/antiox11081558.
8. Auyeung K. K., Woo P. K., Law P. C, Ko J. K. Astragalus saponins modulate cell invasiveness and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma cells. *Journal Ethnopharmacol*. 2012;141(2):635–641. DOI: 10.1016/j.jep.2011.08.010.
9. Cheng M., Hu J., Zhao Y., Jiang J., Qi R., Chen S., Li Y., Zheng H., Liu R., Guo Q., Zhang X., Qin Y., Hua B. Efficacy and Safety of Astragalus-Containing Traditional Chinese Medicine Combined With Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*. 2021;11. DOI: 10.3389/fonc.2021.632168.
10. Chen X., Deng L., Jiang X., Wu T. Chinese herbal medicine for oesophageal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;1. DOI: 10.1002/14651858.
11. Chang X., Chen X., Guo Y., Gong P., Pei Sh., Wang D., Wang P., Wang M., Chen F. Advances in Chemical Composition, Extraction Techniques, Analytical Methods, and Biological Activity of Astragali Radix. *Molecules*. 2022;27(3):1058. DOI: 10.3390/molecules27031058.
12. Zhang W., Cui Y., Liu Z., Wang Sh., Yang A., Li X., Zhang J. Astragalus membranaceus ultrafine powder alleviates hyperuricemia by regulating the gut microbiome and reversing bile acid and adrenal hormone biosynthesis dysregulation. *Arabian Journal of Chemistry*. 2022;15(9):103970. DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.103970.
13. Arshad M. S., Zafar S., Yousef B., Alyassin Y., Ali R., AlAsiri A., Chang M.-W., Ahmad Z., Elkordy A. A., Faheem A., Pitt K. A review of emerging technologies enabling improved solid oral dosage form manufacturing and processing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;178:113840. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113840.
14. Каухова И. Е., Новикова Е. К., Чачин Д. А. Разработка условий экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(3):64–67.
15. Лохматова Д. Э., Ароян М. В. Исследование экстрагирования сапонинов из астрагала перепончатого. Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего». 14 марта – 18 апреля 2022. Санкт-Петербург, Российская Федерация. СПб.: Изд-во СПХФУ; 2022. 1362 с.
16. Tsakalozou E., Alam K., Babiskin A., Zhao L. Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling to Support Determination of Bioequivalence for Dermatological Drug Products: Scientific and Regulatory Considerations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2022;11(5):1036–1049. DOI: 10.1002/cpt.2356.
17. Chryssafidis P., Athanasios A. Revising Pharmacokinetics of Oral Drug Absorption: II Bioavailability-Bioequivalence Considerations. *Pharmaceutical Research*. 2021;(38):1345–1356. DOI: 10.1007 / s11095-021-03078.

REFERENCES

1. Povydysh M. N., Luzhanin V. G., Ivkin D. Yu., Belousov M. V., Yakovlev G. P. Prospects of using phytotherapy at disorders of fat and carbohydrate metabolism. *Drug development & registration*. 2018;(3):130–135. (In Russ.)
2. Esmaealzadeh N., Iranpanah A., Sarris J., Rahimi R. A literature review of the studies concerning selected plant-derived adaptogens and their general function in body with a focus on animal studies. *Phytomedicine*. 2022;105:154354. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154354.
3. Todorova V., Ivanov K., Delattre C., Nalbantova V., Karcheva-Bahchevanska D., Ivanova S. Plant Adaptogens—History and Future Perspectives. *Nutrients*. 2021;13(8):2861. DOI: 10.3390/nu13082861.
4. Panossian A. G., Efferth T., Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Kuchta K., Mukherjee P. K., Banerjee S., Heinrich M., Wu W., Guo D., Wagner H. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress- and aging-related diseases. *Medicinal research*. 2021;41(1):630–703. DOI: 10.1002/med.21743.
5. Gulyaev D. K., Belonogova V. D., Mashchenko P. S. Seasonal variability of the component composition of the essential oil of the arboreal greens of the common spruce *Piceae abietis* (Pinaceae). *Fundamental research*.2015;7:14–19. (In Russ.)
6. Sciukaite A., Loziene K., Labokas J., Jurkoniene S. Contents of some bioactive compounds in Norway spruce needles as affected by short-term storage at different conditions and implications for their industrial use. *Industrial Crops and Products*. 2022;182:114919. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114919.
7. Sirgedaitė-Šėžien V., Lučinskaitė I., Mildažienė V., Ivankov A., Koga K., Shiratan M., Laužikė K., Baliuckas V. Changes in Content of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Induced in Needles of Different Half-Sib Families of Norway Spruce (Picea abies (L.) H. Karst) by Seed Treatment with Cold Plasma. *Antioxidants*. 2022;11(8):1558. DOI: 10.3390/antiox11081558.
8. Auyeung K. K., Woo P. K., Law P. C, Ko J. K. Astragalus saponins modulate cell invasiveness and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma cells. *Journal Ethnopharmacol*. 2012;141(2):635–641. DOI: 10.1016/j.jep.2011.08.010.
9. Cheng M., Hu J., Zhao Y., Jiang J., Qi R., Chen S., Li Y., Zheng H., Liu R., Guo Q., Zhang X., Qin Y., Hua B. Efficacy and Safety of Astragalus-Containing Traditional Chinese Medicine Combined With Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*. 2021;11. DOI: 10.3389/fonc.2021.632168.
10. Chen X., Deng L., Jiang X., Wu T. Chinese herbal medicine for oesophageal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;1. DOI: 10.1002/14651858.
11. Chang X., Chen X., Guo Y., Gong P., Pei Sh., Wang D., Wang P., Wang M., Chen F. Advances in Chemical Composition, Extraction Techniques, Analytical Methods, and Biological Activity of Astragali Radix. *Molecules*. 2022;27(3):1058. DOI: 10.3390/molecules27031058.
12. Zhang W., Cui Y., Liu Z., Wang Sh., Yang A., Li X., Zhang J. Astragalus membranaceus ultrafine powder alleviates hyperuricemia by regulating the gut microbiome and reversing bile acid and adrenal hormone biosynthesis dysregulation. *Arabian Journal of Chemistry*. 2022;15(9):103970. DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.103970.
13. Arshad M. S., Zafar S., Yousef B., Alyassin Y., Ali R., AlAsiri A., Chang M.-W., Ahmad Z., Elkordy A. A., Faheem A., Pitt K. A review of emerging technologies enabling improved solid oral dosage form manufacturing and processing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;178:113840. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113840.
14. Kaukhova I. E., Novikova E. K., Chachin D. A. The development conditions for extraction of the *Bidens Tripartita* L., *Solidago Canadensis* L. and *Agrimonia Eupatoria* L. herbs. *Drug development & registration*. 2018;(3):64–67. (In Russ.)
15. Lohmatova D. E., Aroyan M. V. Study of extraction of saponnins from Astragalus membranous (Fisch.) Bunge. Collection of materials of the conference "Young Pharmacy-the potential of the future". March 14 – April 18 2022. St. Petersburg, Russian Federation. St. Petersburg: SPCPU Publishing house; 2022. 1362 p. (In Russ).
16. Tsakalozou E., Alam K., Babiskin A., Zhao L. Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling to Support Determination of Bioequivalence for Dermatological Drug Products: Scientific and Regulatory Considerations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2022;11(5):1036–1049. DOI: 10.1002/cpt.2356.
17. Chryssafidis P., Athanasios A. Revising Pharmacokinetics of Oral Drug Absorption: II Bioavailability-Bioequivalence Considerations. *Pharmaceutical Research*. 2021;(38):1345–1356. DOI: 10.1007 / s11095-021-03078.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-80-88
УДК 615.074

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Анализ этанольных извлечений корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. методом ГХ/МС

А. М. Джумабаева[1]✉, А. С. Кожамжарова[1], Л. Н. Ибрагимова[1], И. И. Тернинко[2], Е. С. Сурбеева[2], З. Б. Сакипова[1]

[1] Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова», 050012, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Толе би, д. 94
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ **Контактное лицо:** Джумабаева Айнур Махаметкуловна. **E-mail:** ainur.j0603@gmail.com

ORCID: А. М. Джумабаева – https://orcid.org/0000-0003-1226-7696; А. С. Кожамжарова – https://orcid.org/0000-0002-6688-6209;
Л. Н. Ибрагимова – https://orcid.org/0000-0002-8381-5330; И. И. Тернинко – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015; Е. С. Сурбеева – https://orcid.org/0000-0002-7005-2477;
З. Б. Сакипова – https://orcid.org/0000-0003-1400-1971.

Статья поступила: 04.04.2023 **Статья принята в печать:** 13.06.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Инновационные технологии, новые подходы к созданию лекарственных препаратов, сочетание классических технологических приемов с новейшими тенденциями делает фармацевтическое производство направлением с позитивной динамикой развития. Но наряду с появлением новых синтетических препаратов, а также биотехнологической продукции остается актуальным использование растительного сырья для получения лекарственных средств. Фитопрепараты имеют ряд преимуществ перед синтетическими средствами, такие как относительно низкая токсичность (за исключением групп БАВ с выраженной фармакологической активностью – алкалоиды и сердечные гликозиды), отсутствие ксенобиотического действия сбалансированного комплекса растительных биологически активных веществ (БАВ) на организм, возможность рационального сочетания растительных и синтетических БАВ и другие, и, как следствие, являются препаратами выбора в педиатрической и гериатрической практиках, в том числе и для целей профилактической медицины. Флора Казахстана отличается присутствием эндемичных растений с достаточной сырьевой базой, что создает предпосылки для их фитохимического профилирования и последующей разработки фитопрепаратов. В этой связи привлекает внимание Ферула акичкенская (*Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol.), которая имеет широкое распространение на территории Казахстана, отличается накоплением различных классов биологически-активных веществ (флавоноидов, кумаринов, эфирных масел) и имеет опыт применения в народной медицине.

Цель. Изучить компонентный состав этанольных извлечений корней ферулы акичкенской методом ГХ/МС с использованием библиотеки Wiley 7th edition, NIST'02 и провести прогнозирование фармакологической активности идентифицированных соединений с использованием веб-ресурса PASS Online.

Материалы и методы. Этанольное извлечение корней получали путем экстракции сырья этанолом 80%-го в соотношении сырье : экстрагент (1 : 10) и при ультразвуковом воздействии с частотой 15–25 кГц в течение 10–20 мин с последующим отделением вытяжки от шрота. Анализ полученного извлечения проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) в режиме сканирования полного тока. Для расшифровки полученных масс-спектров использовали библиотеки Wiley 7th edition и NIST'02. Для прогнозирования биологической активности идентифицируемых соединений использовали веб-ресурс PASS Online.

Результаты и обсуждение. Состав этанольного извлечения корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. характеризуется метаболомным профилем соединений, отличающимся от других представителей рода Ферула. Так, в корнях накапливается *о*-цимен, кислородное производное *п*-цимена тимол и 2,2'-метиленбис[6-(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол. Данные соединения могут составлять маркерный профиль корней *Ferula akitschkensis* и использоваться при идентификации вида в рамках рода Ферула. Прогностическая оценка фармакологической активности идентифицированных соединений ферулы акичкенской показала наличие влияния на метаболические и биохимические процессы, в частности создание протонного потенциала на мембране митохондрий, катализ, окислительно-восстановительные процессы, стабилизацию клеточных мембран. Кроме того, можно прогнозировать спазмолитическую, фибринолитическую, антиоксидантную активности для корней ферулы акичкенской. И в фокусе создания потенциальных лекарственных средств на основе сырья данного вида ферулы целесообразно рассмотреть разработку дерматологических и ветрогонных препаратов.

Заключение. Изучение фитохимического профиля этанольных извлечений корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. методом ГХ-МС позволило установить наличие *о*-цимена и производных *п*-цимена – тимола и 2,2'-метиленбис[6-(1,1-диметилэтил)-4-метилфенола. Данные соединения составляют маркерный профиль корней *Ferula akitschkensis* и могут использоваться при идентификации вида в рамках рода Ферула, так как тимол не является основным компонентом эфирного масла других представителей этого рода. Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений *in silico* показало возможность использования сырья *Ferula akitschkensis* в комплексной терапии в качестве средства, улучшающего тканевое дыхание, при состояниях, сопровождающихся нарушением окислительно-восстановительных процессов в организме. Показано, что для потенциальных лекарственных кандидатов на основе корней ферулы акичкенской будет характерно спазмолитическое, фибринолитическое и антиоксидантное действие. Разработка лекарственных средств дерматологического направления также может быть в фокусе научных групп ввиду противоэкзематозной активности большинства соединений этанольного извлечения корней *Ferula akitschkensis*.

Ключевые слова: *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol., газовая хроматография-масс-спектрометрия, корни, PASS Online, метаболомный профиль

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

Вклад авторов. А. М. Джумабаева отвечала за выполнение отдельных разделов эксперимента, обработку, интерпретацию полученных данных и формулирование выводов. Е. С. Сурбеева провела расшифровку полученных масс-спектров в веб-ресурсе PASS Online. И. И. Тернинко, А. С. Кожамжарова и Л. Н. Ибрагимова осуществили подготовку проекта рукописи, литературный поиск по научному направлению и осуществили редакторские правки. З. Б. Сакиповой принадлежит научная идея и планирование дизайна эксперимента.

© Джумабаева А. М., Кожамжарова А. С., Ибрагимова Л. Н., Тернинко И. И., Сурбеева Е. С., Сакипова З. Б., 2023
© Jumabayeva A. M., Kozhamzharova A. S., Ibragimova L. N., Terninko I. I., Surbeeva E. S., Sakipova Z. B., 2023

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

Для цитирования: Джумабаева А. М., Кожамжарова А. С., Ибрагимова Л. Н., Тернинко И. И., Сурбеева Е. С., Сакипова З. Б. Анализ этанольных извлечений корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. методом ГХ/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):80–88. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-80-88

Screening of the Alcohol Fraction of *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. by GC/MS Method

Ainur M. Jumabayeva[1]✉, Assel S. Kozhamzharova[1], Liliya N. Ibragimova[1], Inna I. Terninko[2], Elizaveta S. Surbeeva[2], Zuriyadda B. Sakipova[1]

[1] Asfendiyarov Kazakh National Medical University, 94, str. Tole bi, Almaty, 050012, Republic of Kazakhstan
[2] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Ainur M. Jumabayeva. **E-mail:** ainur.j0603@gmail.com

ORCID: Ainur M. Jumabayeva – https://orcid.org/0000-0003-1226-7696; Assel S. Kozhamzharova – https://orcid.org/0000-0002-6688-6209; Liliya N. Ibragimova – https://orcid.org/0000-0002-8381-5330; Inna I. Terninko – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015; Elizaveta S. Surbeeva – https://orcid.org/0000-0002-7005-2477; Zuriyadda B. Sakipova – https://orcid.org/0000-0003-1400-1971.

Received: 04.04.2023 **Revised:** 13.06.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Innovative technologies, new approaches to the creation of medicines, a combination of classic technological methods with the latest trends makes pharmaceutical production a direction with positive dynamics of development. But along with the emergence of new synthetic drugs, as well as biotech products, the use of herbal raw materials for the production of medicines remains relevant. Phytopreparations have a number of undeniable advantages over synthetic drugs and are the drugs of choice in different age groups, including for preventive medicine. The flora of Kazakhstan is distinguished by the presence of endemic plants with a sufficient source of raw materials, which creates the prerequisites for their phytochemical profiling and the subsequent development of phytopreparations. In this regard, *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol., which is widespread in Kazakhstan, is distinguished by the accumulation of various classes of biologically active substances (flavonoids, coumarins, essential oils) and has experience in folk medicine.

Aim. To study the component composition of ethanol extracts of *Ferula akitschkensis* roots by GC/MS using the Wiley 7th edition, NIST'02 library and to predict the pharmacological activity of identified compounds using the PASS Online web resource

Materials and methods. Ethanol extraction of roots was obtained by extraction of raw materials with 80 % ethanol in the ratio of raw materials : extractant 1 : 10 and under ultrasonic exposure at a frequency of 15–25 kHz for 10–20 min, followed by separation of the extract from the meal. The obtained extract was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) in full current scanning mode. The obtained mass spectra were interpreted using the Wiley 7th edition and NIST'02 libraries. To predict the biological activity of the identified compounds, the PASS Online web resource was used.

Results and discussion. The composition of the ethanol extract of the roots of *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. is characterized by a metabolomic profile of compounds that differs from other members of the Ferula genus. Thus, o-cymene, the oxygen derivative of *p*-cymene – thymol and 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol accumulate in the roots. These compounds can form a marker profile of the roots of *Ferula akitschkensis* and be used for species identification within the genus *Ferula*. The prognostic evaluation of the pharmacological activity of the identified compounds of *Ferula akitschkensis* showed the presence of an effect on metabolic and biochemical processes, in particular, the creation of a proton potential on the mitochondrial membrane, catalysis, redox processes, and stabilization of cell membranes. In addition, antispasmodic, fibrinolytic, and antioxidant activities can be predicted for the roots of *Ferula akitschkensis*. And in the focus of creating potential drugs based on the raw materials of this species of *Ferula*, it is advisable to consider the development of dermatological and carminative drugs.

Conclusion. Study of the phytochemical profile of ethanol extracts from the roots of *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. by GC-MS made it possible to establish the presence of *o*-cymene and *p*-cymene derivatives – thymol and 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol. These compounds make up the marker profile of the roots of *Ferula akitschkensis* and can be used to identify the species within the genus *Ferula*, since thymol is not the main component of the essential oil of other representatives of this genus. Prediction of the pharmacological activity of the identified compounds in silico showed the possibility of using *Ferula akitschkensis* raw materials in complex therapy as a means of improving tissue respiration in conditions accompanied by a violation of redox processes in the body. It has been shown that potential medicinal candidates based on the roots of *Ferula akitschkensis* will be characterized by antispasmodic, fibrinolytic and antioxidant effects. The development of dermatological drugs may also be in the focus of scientific groups due to the anti-eczematous activity of most compounds of the ethanolic extract of the roots of *Ferula akitschkensis*.

Keywords: *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol., gas chromatography–mass spectrometry, roots, PASS Online, metabolomic profile

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

Contribution of the authors. Ainur M. Jumabayeva was responsible for performing individual sections of the experiment, processing, interpreting the obtained data and formulating conclusions. Elizaveta S. Surbeeva deciphered the obtained mass spectra in the PASS Online web resource. Inna I. Terninko, Assel S. Kozhamzharova and Liliya N. Ibragimova carried out the preparation of a draft manuscript, a literary search in the scientific field and carried out editorial changes. Zuriyadda B. Sakipova is responsible for the scientific idea and design of the experiment.

Funding. The results of the work were obtained using equipment the Core Shared Research Facilities "Analytical Center" of the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-685; dated 26 July 2021 on the provision of the Federal budget grants).

For citation: Jumabayeva A. M., Kozhamzharova A. S., Ibragimova L. N., Terninko I. I., Surbeeva E. S., Sakipova Z. B. Screening of the alcohol fraction of *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. by GC/MS method. *Drug development & registration*. 2023;12(3):80–88. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-80-88

ВВЕДЕНИЕ

Ферула (лат. *Ferula*) – род цветковых растений, третий по величине в семействе Зонтичных (Apiaceae), локализованный преимущественно в горной и засушливой местности с распространением некоторых видов в зоне пустынь [1]. Представители рода широко распространены в Средиземноморье, Северной Африке, Западной, Центральной, Средней и Восточной Азии, в Северной Индии, на Дальнем Востоке и на Алтайском крае [2]. По данным ресурса The Plant List[1] род Ферула насчитывает около 200 видов с принятыми (установленными) названиями. Причем более 40 видов данного рода произрастает в Республике Казахстан на территории Кызылординской, Жамбылской, Алматинской и Южно-Казахстанской областей [3]. В литературе [4, 5] была дана положительная оценка современного состояния ценопопуляций ферулы казахстанского произрастания для вовлечения в хозяйственное использование.

Растения рода Ферула издавна применяются в этнофармакологии народов Азии и также находятся в фокусе различных научных групп. Так, автор P. Sonigra с соавторами [6] систематизировали данные научной литературы о применении различных видов рода Ферула и сообщают об установленной в рамках научного эксперимента и предполагаемой антимикробной [7], инсектицидной [8], антигельминтной [9], антипротозойной [10], противовирусной [11], антиоксидантной [12], противоопухолевой [13], цитотоксической [14], антипролиферативной [15], противоязвенной [16], гипотензивной [17], противоэпилептической [18], спазмолитической [17], гипогликемической [19] и антиноцицептивной [20] активностях. Кроме того, сообщается [21], что растения рода Ферула находят свое применение помимо фармацевтической индустрии еще и в пищевой промышленности в качестве корригентов запаха и натуральных красителей, а также в косметической практике в качестве парфюмерных композиций.

Фармакотерапевтические свойства растений рода Ферулы обусловлены обширным метаболическим профилем [6, 22]. Большее число исследований посвящено изучению компонентного состава эфирного масла, содержание которого в различных представителях рода колеблется в диапазоне 2,54–19,6 %. Основными терпенами, идентифицированными в эфирном масле растений рода Ферула, являются мирцен, сабинен, лимонен, γ-терпинен, ρ-цимен, δ-3-карен, α-пинен и β-пинен [23–25]. По данным всех авторов α-пинен является мажоритарным компонентом (около 75 %) эфирных масел всех представителей рода Ферула. Также сообщается о накоплении флавоноидов (2,44–2,88 %) и фенолкарбоновых кислот, кумаринов (ферулинол, ауроптен и гальбановая кислота и др.) [26, 27]. В массивных корнях содержатся ароматические смолы, большая часть которых состоит из сложных эфиров феруловой кислоты и камеди [24]. Резкий запах ферулы обусловлен содержанием соединений серы: 2-бутил-1-пропенил дисульфида и некоторых других дисульфидов, которые разрушаются при тепловой обработке [28].

Среди видов рода Ферула казахстанского происхождения обращает на себя внимание ферула акичкенская (*Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol.), которая имеет достаточные сырьевые запасы, введена в культуру. Опыт применения в народной медицине Казахстана [3, 4, 21] создает предпосылки для разработки лекарственных средств на основе корней данного вида Ферулы. Однако отсутствие результатов метаболического профилирования сообщает необходимость проведения комплексных фитохимических исследований. И в этой связи изучение профиля эфирного масла ферулы акичкенской для установления мажоритарных компонентов является обоснованной задачей.

Цель данной работы – изучить компонентный состав этанольных извлечений корней ферулы акичкенской методом ГХ/МС с использованием библиотеки Wiley 7th edition, NIST'02 и провести прогнозирование фармакологической активности идентифицированных соединений с использованием веб-ресурса PASS Online [29].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали корни *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol., заготовленные в ноябре 2017 г. в Кордайском перевале (43° 16′ 42″ с. ш., 74° 51′ 23″ в. д.). Сбор и заготовку лекарственного растительного сырья осуществляли в соответствии с принципами надлежащей практики культивирования и сбора лекарственных растений (GACP). Растение идентифицировано в РГП ПВХ «Институт ботаники и фитониринга» Республики Казахстан. Сырье высушивали методом воздушно-теневой сушки, раскладывая тонким слоем в 1 ряд и периодически переворачивали в соответствии с регламентом сушки эфиромасличного сырья до характерного разламывания с треском (остаточная влажность составила 9,0 %).

Этанольное извлечение корней получали путем экстракции сырья этанолом 80%-го в соотношении сырье : экстрагент (1 : 10) при ультразвуковом воздействии частотой 15–25 кГц в течение 10–20 мин в ультразвуковой ванне «Сапфир» (ООО «Сапфир», Россия) с последующим отделением извлечения от шрота.

Анализ полученной фракции проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) в режиме сканирования полного тока на газовом хромато-масс-спектрометре Agilent 6890N/5973N (Agilent Technologies, США). Условия хроматографирования: объем образца – 1,0 мкл, температура ввода пробы – 260 °С, без деления потока. Разделение проводили с помощью хроматографической капиллярной

[1] The Plant List. Available at: http://www.worldfloraonline.org/ Accessed: 19.03.2023.

колонки – DB-WAX (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, Agilent Technologies, США) при постоянной скорости газа-носителя (гелий) 1 мл/мин. Температуру хроматографирования программировали от 40 °С (выдержка 10 мин) со скоростью нагрева 5 °С/мин до 270 °С (выдержка 10 мин). Детектирование проводили в режиме – SCAN m/z 34–750. Для управления системой газовой хроматографии, регистрации и обработки полученных результатов и данных использовали программное обеспечение Agilent MSD ChemStation (версия 1701EA). Обработка данных включала в себя определение времен удерживания, площадей пиков, а также обработку спектральной информации, полученной с помощью масс-спектрометрического детектора (способ ионизации – электронный удар). Для расшифровки полученных масс-спектров использовали библиотеки Wiley 7th edition и NIST'02 (общее количество спектров в библиотеках – более 550 тыс.). Количественную оценку осуществляли методом внутренней нормализации без оценки отклика детектора.

После интерпретации масс-спектров пиков хроматограмм осуществляли прогностическую оценку фармакологической активности идентифицированных соединений с использованием программы PASS Online. При изучении каждого вида активности оценивали вероятность наличия (*Pa*) и отсутствия (*Pi*) ее проявления.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Этанольные извлечения, представляющие собой густую фракцию, выделенные из корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol., были проанализированы методом ГХ/МС. Хроматограмма этанольного извлечения корней *Ferula akitschkensis* представлена на рисунке 1.

В извлечении было обнаружено 29 соединений (таблица 1), из которых 15 было идентифицировано (49 %) с вероятностью не ниже 80 %. Идентифицированные соединения относятся к различным классам БАВ, но в мажоритарном количестве представлены жирные кислоты (21,77 %) и производные цимена (13,71 %).

Как видно из таблицы 1, состав этанольного извлечения корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. характеризуется метаболомным профилем соединений, отличающимся от других представителей рода Ферула. Так, в эфирном масле накапливается *о*-цимен, кислородное производное *п*-цимена – тимол и 2,2'-метиленбис[6-(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол. Данные соединения могут составлять маркерный профиль корней *Ferula akitschkensis* и использоваться при идентификации вида в рамках рода Ферула.

Посредством программы PASS Online провели *in silico* прогноз фармакологической активности основных соединений этанольного извлечения (таблица 2) для оценки потенциальной фармакологической активности и дальнейшего направленного изучения сырья *Ferula akitschkensis*. Биологическая активность веществ рассматривалась от значения вероятности ее проявления *Pa* > 0,7.

Данные таблицы 2 показывают, что для идентифицированных соединений ферулы акичкенской характерно влияние на метаболические и биохимические процессы, в частности создание протонного потенциала на мембране митохондрий, катализ,

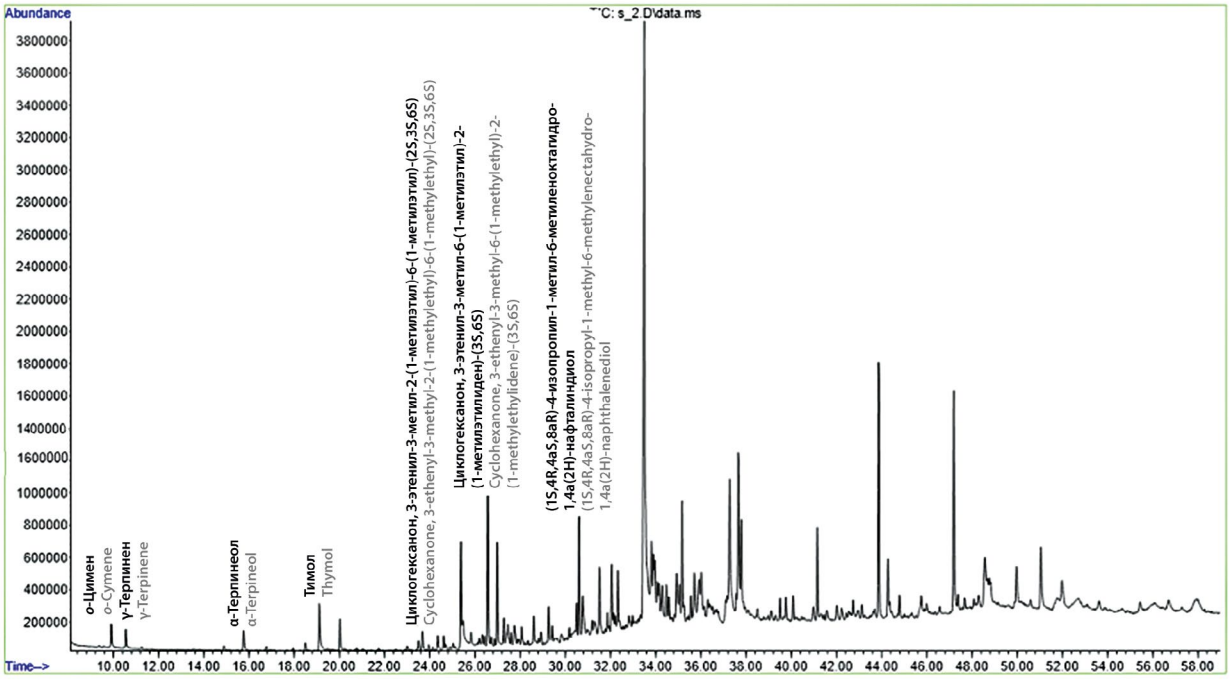


Рисунок 1. **Хроматограмма этанольного извлечения корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol.**

Figure 1. **Chromatogram of the ethanol fraction of roots of *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol.**

окислительно-восстановительные реакции, стабилизация клеточных мембран. Кроме того, можно прогнозировать спазмолитическую, фибринолитическую, антиоксидантную активности для корней ферулы акичкенской. И в фокусе создания потенциальных лекарственных средств на основе сырья данного вида ферулы целесообразно рассмотреть разработку дерматологических и ветрогонных препаратов.

Таблица 1. Идентифицированные соединения этанольной фракции корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol.

Table 1. Identified compounds of the ethanol fraction of roots of *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol.

№	t_R	Наименование идентифицируемого вещества Name of identified substance	Вероятность идентификации, % Probability of identification, %	Содержание, % Content, %
	Ароматические углеводороды и их производные *Aromatic hydrocarbons and their derivatives*			
1	9,9	о-Цимен o-Cymene	90	1,07
2	19,1	Тимол Thymol	93	2,49
3	42,2	2,2′-метиленбис[6-(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол 2,2′-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	91	10,15
	Монотерпены *Monoterpens*			
4	10,5	γ-Терпинен γ-Terpinene	88	0,66
5	15,8	α-Терпинеол α-Terpineol	85	0,95
	Гидроксикоричная кислота *Hydroxycinnamic acid*			
6	43,5	3-метокси-4-гидроксикоричная (феруловая) кислота 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid	94	2,52
	Сесквитерпены *Sesquiterpenes*			
7	23,7	Циклогексанон, 3-этенил-3-метил-2-(1-метилэтил)-6-(1-метилэтил)-, (2S,3S,6S) Cyclohexanone, 3-ethenyl-3-methyl-2-(1-methylethyl)-6-(1-methylethyl)-, (2S,3S,6S)	90	0,83
8	27,0	Изошиобунон Isoshyobunone	80	1,65
9	30,8	Изокаламендиол Isocalamendiol	81	3,37
	Органическое вещество класса алканов *Organic substance of the alkane class*			
10	25,8	Гептадекан Heptadecane	82	0,53
	Соли и эфиры фталевой кислоты *Salts and esters of phthalic acid*			
11	35,6	Эфир бутилгексил 3 фталевой кислоты Phthalic acid, butyl hex-3-yl ester	84	1,90
	Жирные кислоты *Fatty acid*			
12	37,3	Линолевая кислота, 9,12-октадекадиеновая кислота Linoleic acid 9,12-Octadecadienoic acid	88	11,83
13	37,7	α-Линоленовая кислота 9,12,15-октадекатриеновая кислота α-linolenic acid 9,12,15-Octadecatrienoic acid	87	9,94
	Алканы (парафины) *Alkanes (paraffins)*			
14	44,3	Гептакозан Heptacosane	81	2,54
15	47,2	Нонакозан Nonacosane	91	10,12

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение фитохимического профиля этанольных извлечений корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. методом ГХ-МС позволило установить наличие *о*-цимена и производных *n*-цимена – тимола и 2,2′-метиленбис[6-(1,1-диметилэтил)-4-метилфенола. Данные соединения составляют маркерный профиль корней *Ferula akitschkensis* и могут использоваться при идентификации вида в рамках рода Ферула, так как тимол не является основным компонентом эфирного масла других представителей этого рода.

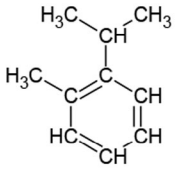
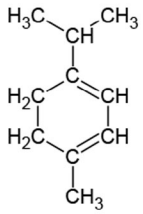
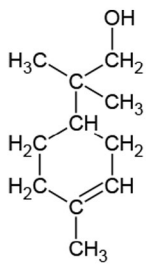
Прогнозирование фармакологической активности идентифицируемых соединений *in silico* показало возможность использования сырья *Ferula akitschkensis* в комплексной терапии в качестве средства, улучшающего тканевое дыхание, при состояниях, сопровождающихся нарушением окислительно-восстановительных процессов в организме. Показано, что для потенциальных лекарственных кандидатов на основе корней ферулы акичкенской будет характерно спазмолитическое, фибринолитическое и антиоксидантное действие. Разработка лекарственных средств дерматологического направления также может быть в фокусе научных групп ввиду противоэкзематозной активности большинства соединений этанольного извлечения корней *Ferula akitschkensis*.

ЛИТЕРАТУРА

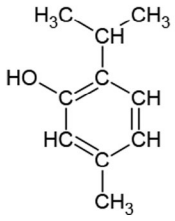
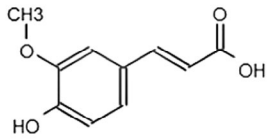
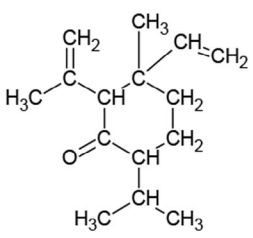
1. Yaqoob U., Nawchoo I. A. Distribution and taxonomy of *Ferula* L.: a review. *Research & Reviews: Journal of Botany.* 2016;5(3): 15–23.
2. Hosseinzadeh N., Shomali T., Hosseinzadeh S., Raouf Fard F., Jalaei J., Fazeli M. Cytotoxic activity of *Ferula persica* gum essential oil on murine colon carcinoma (CT26) and Vero cell lines. *Journal of Essential Oil Research.* 2020;32(2):169–177. DOI: 10.1080/10412905.2020.1729880.
3. Грудзинская Л. М., Гемеджиева Н. Г., Нелина Н. В, Каржаубекова Ж. Ж. Аннотированный список лекарственных растений Казахстана. Алматы. 2014. 200 с.
4. Куприянов А. Н., Хрусталева И. А., Эбель А. Л. Флористические находки в Центральном Казахстане. *Систематические заметки по материалам Гербария им. П. Н. Крылова Томского государственного университета*. 2015;112:14–21. DOI: 10.17223/20764103.112.2.
5. Сводный аналитический отчет о состоянии и использовании земель республики Казахстан за 2011 год. Комитет по управлению земельными ресурсами. Астана: Агентство РК по управлению земельными ресурсами. 2012. 191 с. Доступно по: https://www.gov.kz/uploads/2022/4/11/b09469de9be9cc54d2cc0e9cc7a77e84_original.7131188.pdf. Ссылка активна на 19.03.2023.
6. Sonigra P., Meena M. Metabolic Profile, Bioactivities, and Variations in the Chemical Constituents of Essential Oils of the *Ferula* Genus (Apiaceae). *Frontiers in Pharmacology.* 2021;11. DOI: 10.3389/FPHAR.2020.608649.
7. Niazmand R., Razavizadeh B. M. Ferula asafoetida: chemical composition, thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and gum hydroalcoholic extracts. *Journal of Food Science and Technology*. 2021;58(6):2148–2159. DOI: 10.1007/s13197-020-04724-8.
8. Pavela R., Morshedloo M. R., Lupidi G., Carolla G., Barboni L., Quassinti L., Bramucci M., Vitali L. A., Petrelli D., Kavallieratos N. G., Boukouvala M. C., Ntalli N., Kontodimas D. C., Maggi F., Canale A., Benelli G. The volatile oils from the oleo-gum-resins of *Ferula assa-foetida* and *Ferula gummosa*: A comprehensive investigation of their insecticidal activity and eco-toxicological effects. *Food and Chemical Toxicology.* 2020;140:111312. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111312.
9. Badar S. N., Iqbal Z., Sajid M. S., Rizwan H. M., Shareef M., Malik M. A., Khan M. N. Comparative anthelmintic efficacy of *Arundo donax*, *Areca catechu*, and *Ferula assa-foetida* against *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2021;30(2):e001221. DOI: 10.1590/S1984-29612021028.
10. Amin A., Tuenter E., Cos P., Maes L., Exarchou V., Apers S., Pieters L. Antiprotozoal and Antiglycation Activities of Sesquiterpene Coumarins from *Ferula narthex* Exudate. *Molecules*. 2016;21(10):1287. DOI: 10.3390/molecules21101287.

Таблица 2. Прогнозирование фармакологической активности основных идентифицированных соединений с использованием программы PASS Online

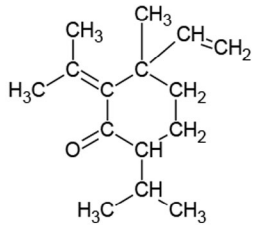
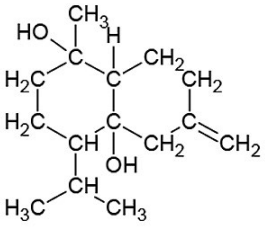
Table 2. Prediction of the pharmacological activity of the main identified compounds using the PASS Online program

Название и структурная формула вещества Substance name and structural formula	*Pa*	*Pi*	Фармакологическая активность Pharmacological activity
o-Цимен *o*-Cymene 	0,924	0,004	Ингибитор убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы Ubiquinol ubiquinol-cytochrome c-reductase inhibitor
	0,890	0,006	Ингибитор алкениглицерофосфохолин гидролазы Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor
	0,874	0,004	Ингибитор глутамил эндопептидазы II Glutamyl endopeptidase II inhibitor
	0,874	0,010	Ингибитор тестостерона 17бета-дегидрогеназы (НАДФ+) Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor
γ-Терпинен γ-Terpinene 	0,920	0,004	Ингибитор убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы Ubiquinol ubiquinol-cytochrome c-reductase inhibitor
	0,910	0,010	Субстрат CYP2C12 CYP2C12 substrate
	0,904	0,005	Противоэкземное действие Antieczematic
	0,878	0,002	Ветрогонное действие Carminative
	0,878	0,009	Ингибитор тестостерона 17бета-дегидрогеназы (НАДФ+) Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor
	0,871	0,008	Ингибитор алкениглицерофосфохолин гидролазы Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor
α-Терпинеол α-Terpineol 	0,888	0,006	Ингибитор алкениглицерофосфохолин гидролазы Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor
	0,873	0,011	Убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза Ubiquinol-cytochrome c-reductase inhibitor

Продолжение таблицы 2

Название и структурная формула вещества **Substance name and structural formula**	***Pa***	***Pi***	**Фармакологическая активность** **Pharmacological activity**
Тимол Thymol 	0,931	0,004	Убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза Ubiquinol-cytochrome c-reductase inhibitor
	0,922	0,004	Мукомембранный протектор Mucomembranous protector
	0,913	0,003	Антисептическое действие Antiseptic
	0,904	0,001	Субстрат SULT1A3 SULT1A3 substrate
	0,875	0,001	Субстрат SULT1A2 SULT1A2 substrate
	0,888	0,015	Субстрат CYP2C12 CYP2C12 substrate
	0,883	0,012	Ингибитор гидролазы алкенилглицерофосфохолина Aspulvinone dimethylallyltransferase inhibitor
	0,876	0,004	Ингибитор проницаемости мембраны Membrane permeability inhibitor
	0,870	0,004	Ингибитор синтазы диола линолеата Linoleate diol synthase inhibitor
	0,858	0,004	Ингибитор алкан-1-монооксигеназы Alkane 1-monooxygenase inhibitor
	0,866	0,011	Ингибитор тестостерона 17бета-дегидрогеназы (НАДФ+) Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor
	0,858	0,004	Фибринолитическое действие Fibrinolytic
	0,863	0,009	Ингибитор алкенилглицерофосфохолин гидролазы Alkenylglycerophosphocholine hydrolase inhibitor
	0,852	0,003	Ветрогонное действие Carminative
3-метокси-4-гидроксикоричная кислота 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid 	0,931	0,004	Антиоксидантный компонент Antioxidant component
Циклогексанон Cyclohexanone 	0,927	0,001	Ветрогонное действие Carminative
	0,859	0,007	Ингибитор глюконат-2-дегидрогеназы (акцептор) Gluconate-2-dehydrogenase (acceptor) inhibitor

Окончание таблицы 2

Название и структурная формула вещества **Substance name and structural formula**	***Pa***	***Pi***	**Фармакологическая активность** **Pharmacological activity**
Циклогексанон, 3-этенил-3-метил-6-(1-метилэтил)-2-(1-метилэтилиден)-(3S,6S) Cyclohexanone, 3-ethenyl-3-methyl-6-(1-methylethyl)-2-(1-methylethylidene)-(3S,6S) 	0,907	0,002	Ветрогонное действие Carminative
	0,876	0,005	Ингибитор глюконат-2-дегидрогеназы (акцептор) Gluconate-2-dehydrogenase (acceptor) inhibitor
	0,853	0,009	Противоэкзематозная активность Antieczematic
(1S,4R,4aS,8aR)-4-изопропил-1-метил-6-метиленоктагидро-1,4a(2H)-нафталиндиол (1S,4R,4aS,8aR)-4-isopropyl-1-methyl-6-methylenectahydro-1,4a(2H)-naphthalenediol 	0,972	0,001	Спазмолитическое, мочегонное действие Spasmolytic, urinary
	0,853	0,009	Противоэкзематозная активность Antieczematic

11. Lee C.-L., Chiang L.-C., Cheng L.-H., Liaw C.-C., Abd El-Razek M. H., Chang F.-R., Wu Y.-C. Influenza A (H_1N_1) Antiviral and Cytotoxic Agents from *Ferula assa-foetida*. *Journal of Natural Products*. 2009;72(9):1568–1572. DOI: 10.1021/np900158f.
12. Macrì R., Musolino V., Gliozzi M., Carresi C., Maiuolo J., Nucera S., Scicchitano M., Bosco F., Scarano F., Ruga S., Zito M. C., Guarnieri L., Bombardelli E., Mollace V. *Ferula L*. Plant Extracts and Dose-Dependent Activity of Natural Sesquiterpene Ferutinin: From Antioxidant Potential to Cytotoxic Effects. *Molecules*. 2020;25(23):5768. DOI: 10.3390/molecules25235768.
13. Li Y.-S., Yang B.-C., Zheng S.-M., Cheng Y.-X., Cui H.-H. Racemic Norlignans as Diastereoisomers from *Ferula sinkiangensis* Resins with Antitumor and Wound-Healing Promotion Activities. *Molecules*. 2022;27(12):3907. DOI: 10.3390/molecules27123907.
14. Iranshahi M., Rezaee R., Najaf Najafi M., Haghbin A., Kasaian J. Cytotoxic activity of the genus *Ferul* (Apiaceae) and its bioactive constituents. *Avicenna J. Phytomed*. 2018;8(4):296–312. DOI: 10.22038/AJP.2018.26953.1963.
15. Verma S., Khambhala P., Joshi S., Kothari V., Patel T., Seshadri S. Evaluating the role of dithiolane rich fraction of *Ferula asafoetida* (apiaceae) for its antiproliferative and apoptotic properties: in vitro studies. *Experimental Oncology*. 2019;41(2):90–94. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-2.12989.
16. Zhong C., Zhan P., Tian H., Wang P., Lei F. Anti-ulcer activity of the three different extracts of *Ferula lehmannii* Boiss leaf in rats. *Pak J Pharm Sci*. 2019;32(6):2625–2632.
17. Fatehi M., Farifteh F., Fatehi-Hassanabad Z. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;91(2–3):321–324. DOI: 10.1016/j.jep.2004.01.002.
18. Kiasalari Z., Khalili M., Roghani M., Heidari H., Azizi Y. Antiepileptic and Antioxidant Effect of Hydroalcoholic Extract of *Ferula Assa* Foetida Gum on Pentylentetrazole- induced Kindling in Male Mice. *Basic Clin Neurosci*. 2013;4(4):299–306.
19. Latifi E., Mohammadpour A. A., Fathi H B., Nourani H. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic *Ferula assafoetida* oleo-gum-resin extract in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019;110:197–202. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.152.
20. Bagheri S. M., Dashti-R. M. H., Morshedi A. Antinociceptive effect of *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin in mice. *Res Pharm Sci*. 2014;9(3):207–212.
21. Кабланова Д. А., Мирзадинов Р. А., Акымбекова Л. Д. Ферулы (*Ferula) Казахстана и их народнохозяйственное значение. Вестник науки и образования*.2020;20(98):18–21.
22. Salehi M., Naghavi M. R., Bahmankar M. A review of *Ferula* species: biochemical characteristics, pharmaceutical and industrial applications, and suggestions for biotechnologists. *Industrial Crops and Products*. 2019;139:111511. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111511.
23. Znati M., Jabrane A., Hajlaoui H., Harzallah-Skhiri F., Bouajila J. Casanova J., Ben Jannet H. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antimicrobial and anti-acetylcholinesterase properties of the flower oil of *Ferula lutea*. *Natural Product Communications*. 2012;7(7):1934578X1200700. DOI: 10.1177/1934578X1200700738.
24. Koulaei S. A., Hadjiakhoondi A., Delnavazi M. R., Tofighi Z., Ajani Y., Kiashi F., Yasa N. Chemical composition and biological activity of *Ferula aucheri* essential oil. *Res. J. Pharmacogn*. 2020;7(2):21–31. DOI: 10.22127/RJP.2020.210354.1537.
25. Utegenova G. A., Pallister K. B., Kushnarenko S. V., Özek G., Özek T., Abidkulova K. T., Kirpotina L. N., Schepetkin I. A., Quinn M. T., Voyich J. M. Chemical Composition and Antibacterial Activi-

ty of Essential Oils from *Ferula* L. Species against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2018;23(7):1679. DOI: 10.3390/molecules23071679.
26. Zellagui A., Gherraf N., Rhouati S. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* Coss et Dur. leaves, endemic in Algeria. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012;2(1). DOI: 10.1186/2191-2858-2-31.
27. Mohammadhosseini M., Venditti A., Akbarzadeh A. The genus *Perovskia* Kar.: ethnobotany, chemotaxonomy and phytochemistry: a review. *Toxin Reviews*. 2021;40(4):484–505. DOI: 10.1080/15569543.2019.1691013.
28. Hassanabadi M., Ebrahimi M., Farajpour M., Dejahang A. Variation in essential oil components among Iranian *Ferula assa-foetida* L. accessions. *Industrial Crops and Products*. 2019;140:111598. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111598.
29. Сурбеева Е. С., Сипкина Н. Ю., Комова С. И., Ефремова У. А., Тернинко И. И. Скрининг липофильных фракций ботанических форм Сельдерея пахучего методом ГХ/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):181–194. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-181-194.

REFERENCES

1. Yaqoob U., Nawchoo I. A. Distribution and taxonomy of *Ferula* L.: a review. *Research & Reviews: Journal of Botany*. 2016;5(3): 15–23.
2. Hosseinzadeh N., Shomali T., Hosseinzadeh S., Raouf Fard F., Jalaei J., Fazeli M. Cytotoxic activity of *Ferula persica* gum essential oil on murine colon carcinoma (CT26) and Vero cell lines. *Journal of Essential Oil Research*. 2020;32(2):169–177. DOI: 10.1080/10412905.2020.1729880.
3. Grudzinskaya L. M., Gemedzhieva N. G., Nelina N. V., Karzhaubekova Zh. Zh. Annotated list of medicinal plants of Kazakhstan. Almaty. 2014. 200 p. (In Russ.)
4. Kupriyanov A. N., Khrustaleva I. A., Ebel A. L. Floristic finds in Central Kazakhstan. *Systematic notes on the materials of the Herbarium. P. N. Krylov Tomsk State University*. 2015;112:14–21. (In Russ.) DOI: 10.17223/20764103.112.2.
5. Consolidated analytical report on the state and use of lands of the Republic of Kazakhstan for 2011. Land Management Committee. Astana: Agency of the Republic of Kazakhstan for land management. 2012. 191 334 p. Available at: https://www.gov.kz/uploads/2022/4/11/b09469de9be9cc54d2cc0e9cc7a77e84_original.7131188.pdf. Accessed: 19.03.2023. (In Russ.)
6. Sonigra P., Meena M. Metabolic Profile, Bioactivities, and Variations in the Chemical Constituents of Essential Oils of the *Ferula* Genus (Apiaceae). *Frontiers in Pharmacology*. 2021;11. DOI: 10.3389/FPHAR.2020.608649.
7. Niazmand R., Razavizadeh B. M. Ferula asafoetida: chemical composition, thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and gum hydroalcoholic extracts. *Journal of Food Science and Technology*. 2021;58(6):2148–2159. DOI: 10.1007/s13197-020-04724-8.
8. Pavela R., Morshedloo M. R., Lupidi G., Carolla G., Barboni L., Quassinti L., Bramucci M., Vitali L. A., Petrelli D., Kavallieratos N. G., Boukouvala M. C., Ntalli N., Kontodimas D. C., Maggi F., Canale A., Benelli G. The volatile oils from the oleo-gum-resins of *Ferula assa-foetida* and *Ferula gummosa*: A comprehensive investigation of their insecticidal activity and eco-toxicological effects. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;140:111312. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111312.
9. Badar S. N., Iqbal Z., Sajid M. S., Rizwan H. M., Shareef M., Malik M. A., Khan M. N. Comparative anthelmintic efficacy of *Arundo donax*, *Areca catechu*, and *Ferula assa-foetida* against *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2021;30(2):e001221. DOI: 10.1590/S1984-29612021028.
10. Amin A., Tuenter E., Cos P., Maes L., Exarchou V., Apers S., Pieters L. Antiprotozoal and Antiglycation Activities of Sesquiterpene Coumarins from *Ferula narthex* Exudate. *Molecules*. 2016;21(10):1287. DOI: 10.3390/molecules21101287.
11. Lee C.-L., Chiang L.-C., Cheng L.-H., Liaw C.-C., Abd El-Razek M. H., Chang F.-R., Wu Y.-C. Influenza A (H_1N_1) Antiviral and Cytotoxic Agents from *Ferula assa-foetida*. *Journal of Natural Products*. 2009;72(9):1568–1572. DOI: 10.1021/np900158f.
12. Macrì R., Musolino V., Gliozzi M., Carresi C., Maiuolo J., Nucera S., Scicchitano M., Bosco F., Scarano F., Ruga S., Zito M. C., Guarnieri L., Bombardelli E., Mollace V. *Ferula L*. Plant Extracts and Dose-Dependent Activity of Natural Sesquiterpene Ferutinin: From Antioxidant Potential to Cytotoxic Effects. *Molecules*. 2020;25(23):5768. DOI: 10.3390/molecules25235768.
13. Li Y.-S., Yang B.-C., Zheng S.-M., Cheng Y.-X., Cui H.-H. Racemic Norlignans as Diastereoisomers from *Ferula sinkiangensis* Resins with Antitumor and Wound-Healing Promotion Activities. *Molecules*. 2022;27(12):3907. DOI: 10.3390/molecules27123907.
14. Iranshahi M., Rezaee R., Najaf Najafi M., Haghbin A., Kasaian J. Cytotoxic activity of the genus *Ferul* (Apiaceae) and its bioactive constituents. *Avicenna J. Phytomed*. 2018;8(4):296–312. DOI: 10.22038/AJP.2018.26953.1963.
15. Verma S., Khambhala P., Joshi S., Kothari V., Patel T., Seshadri S. Evaluating the role of dithiolane rich fraction of *Ferula asafoetida* (apiaceae) for its antiproliferative and apoptotic properties: in vitro studies. *Experimental Oncology*. 2019;41(2):90–94. DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-2.12989.
16. Zhong C., Zhan P., Tian H., Wang P., Lei F. Anti-ulcer activity of the three different extracts of *Ferula lehmannii* Boiss leaf in rats. *Pak J Pharm Sci*. 2019;32(6):2625–2632.
17. Fatehi M., Farifteh F., Fatehi-Hassanabad Z. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;91(2–3):321–324. DOI: 10.1016/j.jep.2004.01.002.
18. Kiasalari Z., Khalili M., Roghani M., Heidari H., Azizi Y. Antiepileptic and Antioxidant Effect of Hydroalcoholic Extract of *Ferula Assa* Foetida Gum on Pentylentetrazole- induced Kindling in Male Mice. *Basic Clin Neurosci*. 2013;4(4):299–306.
19. Latifi E., Mohammadpour A. A., Fathi H B., Nourani H. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic *Ferula assafoetida* oleo-gum-resin extract in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019;110:197–202. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.152.
20. Bagheri S. M., Dashti-R. M. H., Morshedi A. Antinociceptive effect of *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin in mice. *Res Pharm Sci*. 2014;9(3):207–212.
21. Kablanova D. A., Mirzadinov R. A., Akymbekova L. D. Ferula (Ferula) of Kazakhstan and their national significance. *Vestnik nauki i obrazovaniya*. 2020;20(98):18–21. (In Russ.)
22. Salehi M., Naghavi M. R., Bahmankar M. A review of *Ferula* species: biochemical characteristics, pharmaceutical and industrial applications, and suggestions for biotechnologists. *Industrial Crops and Products*. 2019;139:111511. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111511.
23. Znati M., Jabrane A., Hajlaoui H., Harzallah-Skhiri F., Bouajila J. Casanova J., Ben Jannet H. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antimicrobial and anti-acetylcholinesterase properties of the flower oil of *Ferula lutea*. *Natural Product Communications*. 2012;7(7):1934578X1200700. DOI: 10.1177/1934578X1200700738.
24. Koulaei S. A., Hadjiakhoondi A., Delnavazi M. R., Tofighi Z., Ajani Y., Kiashi F., Yasa N. Chemical composition and biological activity of *Ferula aucheri* essential oil. *Res. J. Pharmacogn*. 2020;7(2):21–31. DOI: 10.22127/RJP.2020.210354.1537.
25. Utegenova G. A., Pallister K. B., Kushnarenko S. V., Özek G., Özek T., Abidkulova K. T., Kirpotina L. N., Schepetkin I. A., Quinn M. T., Voyich J. M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Ferula* L. Species against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2018;23(7):1679. DOI: 10.3390/molecules23071679.
26. Zellagui A., Gherraf N., Rhouati S. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* Coss et Dur. leaves, endemic in Algeria. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012;2(1). DOI: 10.1186/2191-2858-2-31.
27. Mohammadhosseini M., Venditti A., Akbarzadeh A. The genus *Perovskia* Kar.: ethnobotany, chemotaxonomy and phytochemistry: a review. *Toxin Reviews*. 2021;40(4):484–505. DOI: 10.1080/15569543.2019.1691013.
28. Hassanabadi M., Ebrahimi M., Farajpour M., Dejahang A. Variation in essential oil components among Iranian *Ferula assa-foetida* L. accessions. *Industrial Crops and Products*. 2019;140:111598. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111598.
29. Surbeeva E.S., Sipkina N.Yu., Komova S.I., Screening of Lipophilic Fractions of Botanical Forms of Celery by GC/MS Method. *Drug development & registration*. 2022;11(3):181–194. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-181-194.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-89-95
УДК 615.322

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Состав и содержание гидролизуемых таннинов в листьях фейхоа, *Acca sellowiana*

Т. А. Кроль✉, Д. Н. Балеев, В. И. Осипов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), 117216, Россия, Москва, ул. Грина, д. 7

✉ **Контактное лицо:** Кроль Татьяна Анатольевна. **E-mail:** tatianakroll1@gmail.com

ORCID: Т. А. Кроль – https://orcid.org/0000-0003-4642-651X; Д. Н. Балеев – https://orcid.org/0000-0002-1228-0594; В. И. Осипов – https://orcid.org/0000-0002-8383-9965.

Статья поступила: 30.06.2022 **Статья принята в печать:** 07.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Растение *Acca sellowiana*, или фейхоа, принадлежит к семейству *Myrtaceae* и представляет собой вечнозеленый кустарник или небольшое дерево высотой 4–6 метров. Фитохимический состав наиболее подробно изучен у плодов *A. sellowiana*. Показано, что они наиболее богаты фенольными кислотами, гидролизуемыми и конденсированными таннинами, стероидными сапонинами и флавоноидами. Известно, что гидролизуемые таннины обладают высокой биологической активностью.

Цель. Изучить состав и содержание гидролизуемых таннинов в листьях *A. sellowiana*.

Материалы и методы. Ультраэффективная жидкостная хроматография в комбинации с диодным и масс-спектрометрическим детекторами.

Результаты и обсуждение. В результате анализа в экстракте из листьев *A. sellowiana* были обнаружены 22 фенольных соединения. Они были классифицированы как флаван-3-олы, флавоноиды и гидролизуемые таннины. Два соединения идентифицировать не удалось. Общее содержание гидролизуемых таннинов составило 44,28 мг/г или 90 % всех фенольных соединений. При этом эллаготаннины были основными фенольными соединениями экстракта. Их содержание составило 40,47 мг/г, тогда как галлоилглюкоз только 3,81 мг/г.

Заключение. Таким образом, изучен состав и содержание гидролизуемых таннинов в листьях растений *A. sellowiana*, интродуцированных в оранжерейном комплексе ФГБНУ ВИЛАР. Показано, что листья накапливают в основном мономерные эллаготаннины, на долю которых приходится 92 % от общего содержания гидролизуемых таннинов. Полученные данные свидетельствуют, что листья *A. sellowiana* могут быть использованы в качестве сырья для получения экстрактов с высоким содержанием эллаготаннинов и разработки на их основе лекарственных препаратов.

Ключевые слова: *Acca sellowiana*, жидкостная хроматография, фенольные соединения, гидролизуемые таннины

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

Вклад авторов. Т. А. Кроль и Д. Н. Балеев участвовали в обработке полученных данных и написании текста статьи. В. И. Осипов проводил хроматографический анализ и анализ полученных данных, осуществлял научно-теоретическое управление исследованием и рецензирование статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Авторы выражаем благодарность проф. Ю.-П. Салминен, Университет Турку (Финляндия), за предоставленную возможность использовать УЭЖХ-ДД-МС-систему.

Для цитирования: Кроль Т. А., Балеев Д. Н., Осипов В. И. Состав и содержание гидролизуемых таннинов в листьях фейхоа, *Acca sellowiana*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):89–95. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-89-95

Composition and Content of Hydrolysable Tannins in Feijoa Leaves, *Acca sellowiana*

Tatiana A. Krol✉, Dmitry N. Baleev, Vladimir I. Ossipov

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

✉ **Corresponding author:** Tatiana A. Krol. **E-mail:** tatianakroll1@gmail.com

ORCID: Tatiana A. Krol – https://orcid.org/0000-0003-4642-651X; Dmitry N. Baleev – https://orcid.org/0000-0002-1228-0594; Vladimir I. Ossipov – https://orcid.org/0000-0002-8383-9965.

Received: 30.06.2022 **Revised:** 07.07.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. *Acca sellowiana*, or feijoa belongs to the *Myrtaceae* family and it is an evergreen shrub or small tree 4–6 meters high. The phytochemical composition has been most thoroughly studied in the fruits of *A. sellowiana*. It has been shown that feijoa is rich in phenolic acids, hydrolysable and condensed tannins, steroidal saponins, and flavonoids. Hydrolysable tannins are known to have high biological activity.

Aim. To study the composition and content of hydrolysable tannins in the leaves of *A. sellowiana*.

Materials and methods. Ultra-high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry.

Results and discussion. The results obtained showed the presence of 22 phenolic compounds in the extract of the *A. sellowiana* leaves. They have been classified as flavan-3-ols, flavonoids and hydrolysable tannins. Two compounds could not be identified. The total content of hydrolysable tannins was 44,28 mg/g (90 % of the total phenolic content). At the same time, ellagitannins were the main phenolic compounds of the extract (40,47 mg/g), while the amount of galloyl-glucose was only 3,81 mg/g.

© Кроль Т. А., Балеев Д. Н., Осипов В. И., 2023
© Krol T. A., Baleev D. N., Ossipov V. I., 2023

Conclusions. Composition and content of hydrolysable tannins in the leaves of *A. sellowiana* introduced in the greenhouse of VILAR have been studied. The leaves accumulate mainly monomeric ellagitannins represented 92 % of the total content of hydrolysable tannins. The data obtained indicate that the leaves of *A. sellowiana* can be used as a raw material for obtaining extracts with a high content of ellagitannins and developing drugs based on them.

Keywords: *Acca sellowiana*, liquid chromatography, phenolic compounds, hydrolysable tannins

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

Contribution of the authors. Tatiana A. Krol and Dmitry N. Baleev participated in the processing of the obtained data and writing the text of the article. Vladimir I. Ossipov carried out chromatographic analysis and analysis of the obtained data, carried out scientific and theoretical management of the study and reviewed the article.

Acknowledgment. We express our gratitude to Prof. Juha-Pekka Salminen, University of Turku (Finland), for the opportunity to use the UPLC-UV-MS system.

For citation: Krol T. A., Baleev D. N., Ossipov V. I. Composition and content of hydrolysable tannins in feijoa leaves, *Acca sellowiana*. *Drug development & registration*. 2023;12(3):89–95. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-89-95

ВВЕДЕНИЕ

Растение *Acca sellowiana*, или фейхоа, принадлежит к семейству *Myrtaceae* и представляет собой вечнозеленый кустарник или небольшое дерево высотой 4–6 метров [1]. Данный вид произрастает в тропическом и субтропическом климате [2]. Естественный ареал его произрастания охватывает территорию Южной Америки (юг Бразилии и север Уругвая) [3]. Однако *A. sellowiana* культивируется во многих странах, в том числе и на юге России [4]. Растения *A. sellowiana* известны прежде всего благодаря своим ароматным, обладающим высокими вкусовыми качествами плодам с восковидной зеленой кожурой и плотной, зернистой, сочной и сладкой мякотью медового цвета [5]. Из-за высокого содержания свободного йода *A. sellowiana* используется при лечении и профилактике заболевания щитовидной железы [6]. Показано, что плоды и листья данного вида обладают антибактериальной активностью в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [7]. Кроме того, экстракт из плодов эффективен в отношении как чувствительных, так и резистентных опухолевых клеток [8], обладает противомикробной и противогрибковой активностью [9] и оказывает противовоспалительное и иммуностимулирующее действие [10].

Фитохимический состав наиболее подробно изучен у плодов *A. sellowiana* [1]. Показано, что мякоть и кожура наиболее богаты фенольными кислотами, гидролизуемыми и конденсированными таннинами, стероидными сапонинами и флавоноидами. Общее содержание фенольных соединений в плодах варьирует в зависимости от генотипа [11].

Цветки характеризуются высоким содержанием антоцианов и флавонолов [12]. Идентифицированы дельфинидин-диглюкозид, дельфинидин-3-О-глюкозид, дельфинидин-пентозид, цианидин-3-О-глюкозид [12], а также эллаготаннин педункулагин и галловая кислота [1]. В листьях *A. sellowiana* также идентифицированы фенольные кислоты, в том числе протокатеховая, п-кумаровая, галловая, кофейная, феруловая, сиреневая и эллаговая кислоты [11, 13, 14]. Обнаружены различные гидролизуемые таннины (стриктинин, казуарин, касталагин) и фенилпропаноиды (умбеллиферон) [15]. Показано наличие таких флавоноидов, как катехин, кемпферол, кверцетин, изокверцетин, нарингенин, мирицетин, рутин, авикулярин, кверцитрин и эриодиктиол [13–15].

Особый интерес представляют гидролизуемые таннины (галлоилглюкозы, галлотаннины и эллаготаннины), содержащие в качестве центрального ядра полиол (обычно глюкозу), образующий сложноэфирные связи с фенольными группами [16]. Образование эллаготаннинов из галлоилглюкозы происходит в результате окислительного взаимодействия галловых кислот с образованием гексагидроксидифеноиловых групп. Структурное разнообразие эллаготаннинов проявляется за счет олигомеризации мономеров и раскрытия полиольного ядра [17]. В результате молекулярная масса эллаготаннинов может достигать 5000 Да [18].

Известно, что гидролизуемые таннины обладают высокой биологической активностью [19]. В связи с этим целью исследования было изучение состава

и содержания гидролизуемых таннинов в листьях *A. sellowiana* методом ультраэффективной жидкостной хроматографии в комбинации с диодным и масс-спектрометрическим детекторами (УЭЖХ-ДД-МС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследований были листья дерева *Acca sellowiana* (O. Berg) Burre [syn. *Feijoa sellowiana* (O. Berg.)] высотой около 6 метров, ранее интродуцированного и растущего в оранжерее Ботанического сада ФГБНУ ВИЛАР. Возраст дерева 40 лет. Листья были собраны в 2019 году в период цветения и хранились в холодильнике при температуре –20 °C.

Подготовка образцов

Перед началом исследования листья лиофильно высушивали в течение 72 часов (FreeZone 2.5 L, Labconco, США) и гомогенизировали с помощью вибрационной мельницы (MM 400, Retsch, Германия) при частоте 20 Гц в течение 2 минут. Затем образец измельченных листьев массой 20,0 мг экстрагировали в 1 мл 80%-го ацетона (для хроматографии, ООО «Компонент-Реактив», Россия) при постоянном перемешивании в течение 60 минут (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc., США) и экстракт отделяли центрифугированием в течение 20 минут при 14 000 об/мин (5430R, Eppendorf, Германия). Экстракцию образца повторяли еще два раза. Объединенный экстракт упаривали досуха при 45 °C в вакуумном концентраторе (CentriVap, Labconco, США), растворяли в 1 мл деионизованной воды (Direct-Q 3, Merch, Германия) в течение 60 минут и центрифугировали в течение 20 минут при 14 000 об/мин. Полученный водный раствор метаболитов разбавляли в 5 раз водой, фильтровали (PTFE filter Clean 2, 0,45 µm, Thermo Fisher Scientific, США) и фенольные соединения анализировали методом УЭЖХ-ДД-МС.

УЭЖХ-ДД-МС-анализ

При изучении состава фенольных соединений использовали ультраэффективную жидкостную хроматографическую систему ACQUITY UPLC® 2.9.0 (Waters Corporation, США), которая включала фотодиодный детектор (190–500 нм) и тройной квадрупольный масс-спектрометр Xevo® TQ (Waters Corporation, США). Хроматографическое разделение проводили на колонке ACQUITY UPLC® BEH Phenyl (100 × 2,1 мм, 1,7 µm, Waters, Ирландия) в градиенте двух систем: (А) 0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты (Sigma-Aldrich, США); (Б) ацетонитрил (HPLC grade, MACRON, Польша). Условия УЭЖХ: 0–0,5 мин, 0,1 % Б в А; 0,5–5,0 мин, 0,1–30,0 % Б в А (линейный градиент); 5,0–6,0 мин, 30–35 % Б в А (линейный градиент). Скорость потока элюента – 0,5 мл/мин, объем введенного образца – 5 мкл. Регистрация при 280 нм [20]. Масс-спектрометр функционировал в режиме регистрации отрицательных ионов, обработка данных проводилась с использованием DataAnalysis 4.0.

Идентификация фенольных соединений

Идентификацию фенольных соединений проводили, анализируя УФ- и масс-спектры соединений и сравнивая полученные результаты с данными, опубликованными в литературе [1, 12, 21–23].

Количественное определение фенольных соединений

Содержание основных классов фенольных соединений определяли, используя метод мониторинга множественных реакций, который характеризуется высокой чувствительностью и селективностью [20]. Содержание фенольных соединений выражали в мг на 1 г сухой массы листьев, используя калибровочные графики стандартов различных фенольных соединений (кофейная кислота [C0625-5G, ≥98,0 % (HPLC)], 1,2,3,4,6-пентагаллоилглюкоза [PHL82752-10MG, ≥90,0 % (HPLC)], эллаговая кислота [14668-50MG, ≥95,0 % (HPLC)], галловая кислота (91215-100MG, certified reference material), кверцетин [PHL89262-20MG, ≥95,0 % (HPLC)], кемпферол [96353-10MG, ≥99,0 % (HPLC)], мирицетин [72576-10MG, ≥98,0 % (HPLC)] (Sigma-Aldrich, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного анализа в экстракте из листьев *A. sellowiana* обнаружены 22 фенольных соединения (рисунок 1). На основании УФ-спектров фенольные соединения были классифицированы как флаван-3-олы, флавоноиды и гидролизуемые таннины. Два соединения идентифицировать не удалось.

Соединения **1**, **2**, **3** (время удерживания 0,90, 1,07, 1,13 минут) имели УФ-спектр с одним максимумом поглощения в области 223 нм, что характерно для эллаготаннинов, в структуре которых отсутствуют галлоильные группы. Все три соединения имели депропротонированный ион $[M\text{-}H]^-$ *m/z* 481 и идентифицированы как изомеры гексагидроксидифеноил-гексозида (ГГДФ-гексозид) (рисунок 2, А).

Соединения **4** и **5** практически не разделялись хроматографией и регистрировались при 280 нм в виде одного пика. Однако сравнение профилей интенсивных ионов *m/z* 481 и 633 показало, что эти ионы принадлежат масс-спектрам двух разных соединений. Соединение **4** идентифицировано как изомер гексагидроксидифеноил-гексозида. Соединение **5** имело депротонированный ион *m/z* 633 и идентифицировано как стриктинин, что подтверждается наличием в масс-спектре фрагмента *m/z* 169 [Галло-

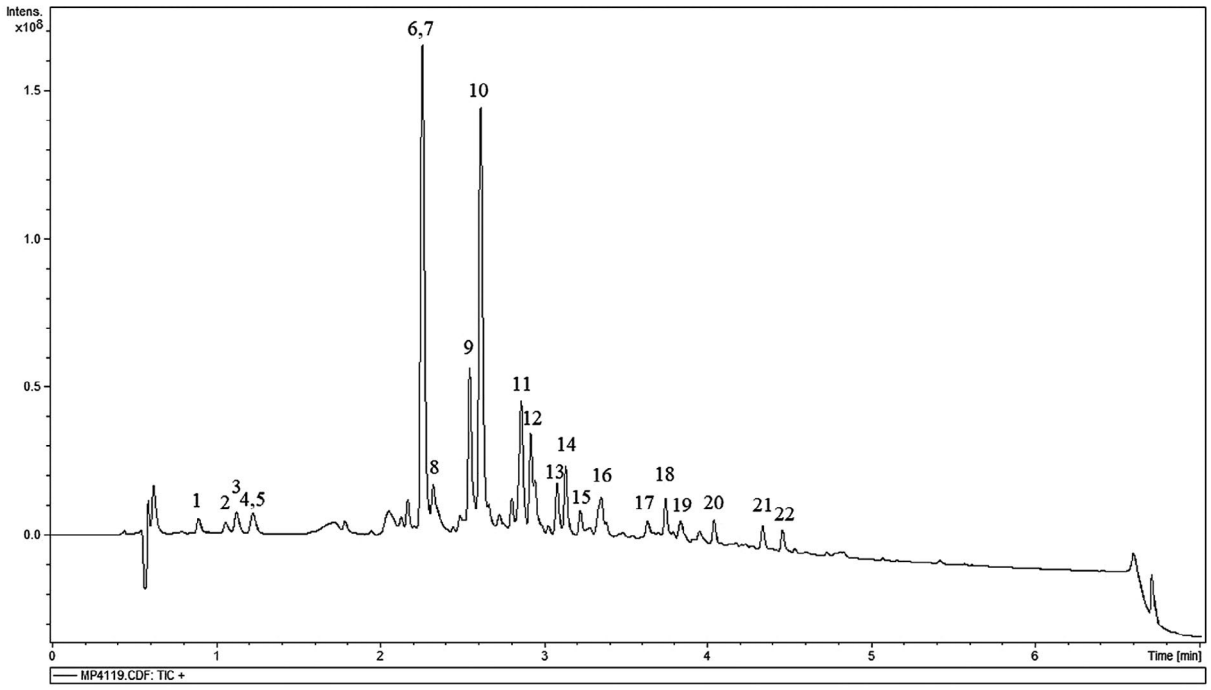


Рисунок 1. **УЭЖХ-УФ-профиль (280 нм) фенольных соединений экстракта листьев *A. sellowiana*/**

Обозначения: 1 – ГГДФ-гексозид, изомер 1; 2 – ГГДФ-гексозид, изомер 2; 3 – ГГДФ-гексозид, изомер 3; 4 – ГГДФ-гексозид, изомер 4; 5 – стриктинин; 6 – вескалагин; 7 – галлокатехина галлат, изомер 1; 8 – производное эллаговой кислоты; 9 – педункулагин, изомер 1; 10 – касталагин; 11 – педункулагин, изомер 2; 12 – галлокатехина галлат, изомер 2; 13 – казуаринин; 14 – ругозин B или изомер; 15 – казуариктин; 16 – катехин; 17 – n/d; 18 – пентозид эллаговой кислоты; 19 – n/d; 20 – кверцетин-глюкуронид; 21 – кверцетин-пентозид; 22 – изорамнетин-пентозид

Figure 1. **UPLC-UV (280 nm) profile of phenolic compounds of A. sellowiana leaves extract.**

Notes: 1 – HHDP-hexoside, isomer 1; 2 – HHDP-hexoside, isomer 2; 3 – HHDP-hexoside, isomer 3; 4 – HHDP-hexoside, isomer 4; 5 – Strictinin; 6 – Vescalagin; 7 – Gallocatechin gallate, isomer 1; 8 – Ellagic acid derivative; 9 – Pedunculagin, isomer 1; 10 – Castalagin; 11 – Pedunculagin, isomer 2; 12 – Gallocatechin gallate, isomer 2; 13 – Casuarinin; 14 – Rugosin B or isomer; 15 – Casuarictin; 16 – Catechin; 17 – n/d; 18 – Ellagic acid pentoside; 19 – n/d; 20 – Quercetin glucuronide; 21 – Quercetin pentoside; 22 – Isorhamnetin pentoside

вая кислота – H]⁻ и характерным для эллаготаннинов, содержащих в молекуле галлоильные и гексагидроксидифеноильные группы, УФ-спектром с двумя максимумами поглощения при 216 и 262 нм. Стриктинин был обнаружен ранее в цветках *A. sellowiana* [12, 23].

Соединения **6** и **10** (время удерживания 2,26 и 2,61 минуты) имели УФ-спектр с максимумом поглощения в области 237-239 нм и депротонированный ион *m/z* 933 (рисунок 2, Б). Эти соединения идентифицированы как вескалагин и касталагин, которые представляют собой диастереоизомеры эллаготаннина с С-гликозидной связью [24]. Известно, что оба соединения накапливаются в плодах и цветках *A. sellowiana* [12, 21].

Идентифицированы два изомера педункулагина (соединения **9** и **11**), имеющие УФ-спектр 229 нм и депротонированный ион *m/z* 783 Да (рисунок 2, В). Эти соединения ранее обнаружены во многих видах растений, в том числе и в листьях *A. sellowiana* [1, 12, 21].

Соединения **13** и **15** идентифицированы как казуаринин и казуариктин (депротонированный ион *m/z* 935), обнаруженные в листьях и цветках *A. sellowiana* [12, 22]. Казуаринин представляет собой мономерный эллаготаннин, первоначально выделенный из листьев *Casuarina stricta*, структура которого состоит из открытой цепи звена D-глюкозы с двумя (S)-гексагидроксидифеноильными группами [25].

Соединение **14** (время удерживания 3,13 минуты) имело УФ-спектр, характерный для эллаготаннинов, и депротонированный ион *m/z* 953. На основании этого оно было идентифицировано как ругозин B или его изомер. Структура данного эллаготаннина характеризуется наличием в молекуле валонеоильной группы.

Соединение **8** (время удерживания 2,33 минуты) имело депротонированный ион *m/z* 553 и характерный фрагмент *m/z* 301, соответствующий иону эллаговой кислоты. Данное соединение идентифицировано как производное эллаговой кислоты. Ранее оно было идентифицировано в плодах *A. sellowiana* [21].

Соединение **18** имело УФ-спектр, характерный для эллаговой кислоты, депротонированный ион *m/z* 433 и было идентифицировано как пентозид эллаговой кислоты.

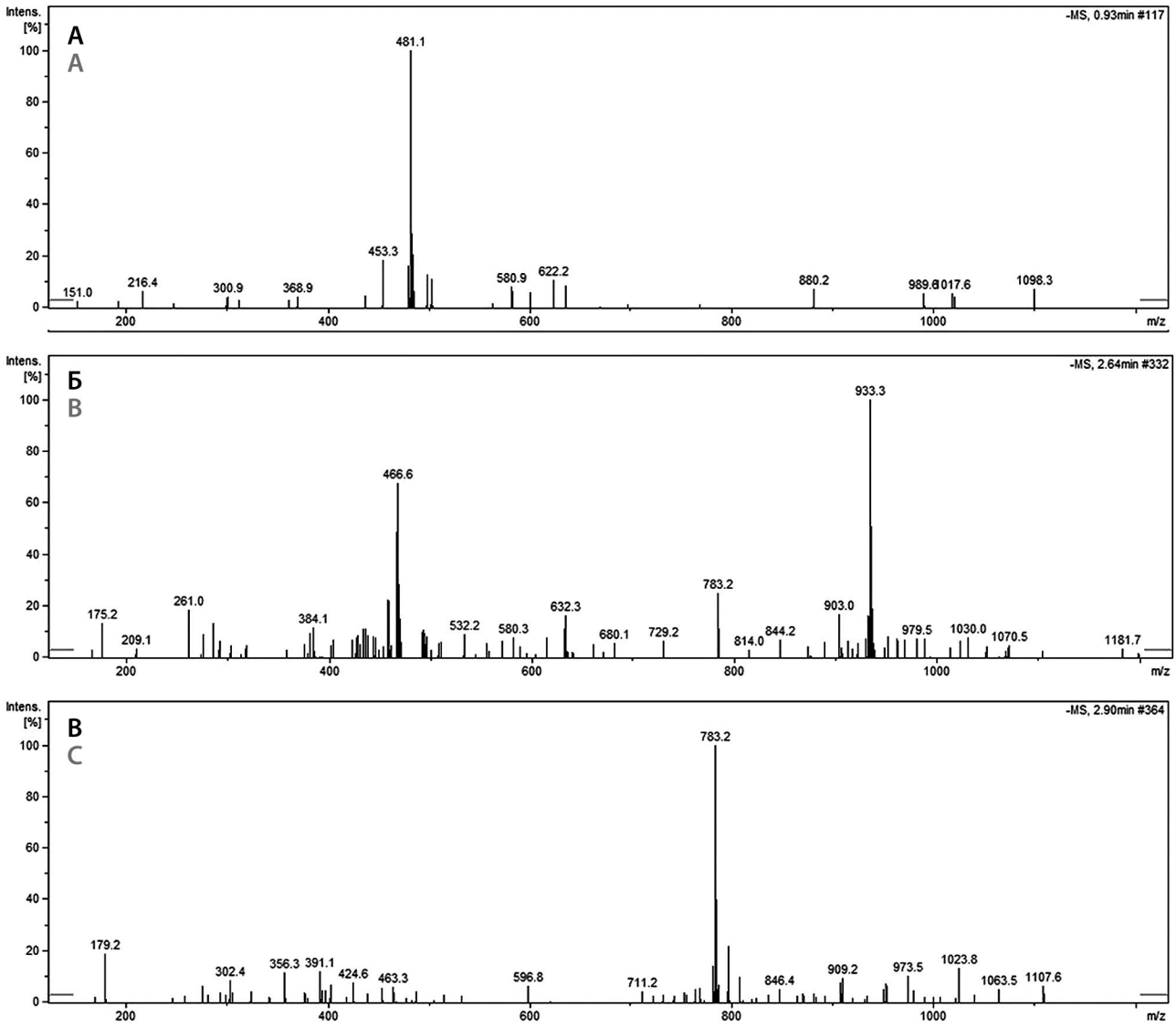


Рисунок 2. Масс-спектры ГГДФ-гексозида, изомер 1 (А), касталагин (Б) и педункулагин, изомер 2 (В) листьев *A. sellowiana*

Figure 2. Mass spectra of HHDP-hexoside, isomer 1 (A), Castalagin (B) and Pedunculagin, isomer 2 (C) of *A. sellowiana* leaves extract

Производные катехина были представлены двумя соединениями **7** и **12** (время удерживания 2,26 и 2,92 минуты). По характерным фрагментам *m/z* 169 [Галловая кислота – H]$^-$ и 289 [Катехин – H]$^-$ они были идентифицированы как изомеры галлокатехина галлата. Соединение **16** имело характерный для катехина УФ-спектр с двумя максимумами поглощения в области 226 и 275 нм. В масс-спектре данного соединения обнаружены ионы с *m/z* 289 и 579, которые соответствуют ионам [M-H]$^-$ и [2M-H]$^-$ катехина. В результате данное соединение идентифицировано как катехин. Ранее данное соединение обнаружено в листьях и плодах *A. sellowiana* [21, 22, 26].

Соединения **20**, **21** и **22** имели характерный для флавоноидов УФ-спектр. При изучении масс-спектров соединений **20** и **21** было установлено присутствие одинакового фрагмента с *m/z* 301, который соответствует *m/z* агликона [Кверцетин-H]$^-$. В масс-спектре соединения **20** были обнаружены ионы с *m/z* 477 и 955, которые соответствуют ионам [M-H]$^-$ и [2M-H]$^-$ кверцетин-глюкуронида. Соединение **21** имело депротонированный ион *m/z* 433 и было идентифицировано как кверцетин-пентозид [21, 22, 26]. Соединение **22** (время удерживания 4,45 минуты) имело депротонированный ион *m/z* 447 и было идентифицировано как пентозид изорамнетина [21, 22, 26].

Полученные нами результаты анализа состава фенольных соединений листьев *A. sellowiana* согласуются с ранее проведенными исследованиями, где авторы сообщают о присутствии 15 соединений, в том числе флавоноидов и эллаговой кислоты [13]. По другим данным, листья *A. sellowiana* также содержат катехин, кверцетин, галловую и эллаговую кислоты и

могут быть использованы в качестве потенциального источника этих соединений [14].

Проведенный анализ содержания фенольных соединений в листьях *A. sellowiana* показал, что количество гидролизуемых таннинов в листьях *A. sellowiana* составляло 44,28 мг/г или 90 % от общего содержания фенольных соединений. При этом эллаготаннины были основными соединениями изучаемого экстракта. Их содержание составило 40,47 мг/г, тогда как на долю галлоилглюкоз приходилось только 3,81 мг/г.

Согласно литературным данным, вескалагин и касталагин проявляют антибактериальную активность, в том числе против метициллинрезистентных штаммов бактерий *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus* [27], а также противовирусную активность в отношении вируса простого герпеса первого и второго типа, включая устойчивые к ацикловиру штаммы [28].

Ругозин B, характерное соединение для семейства *Rosaceae*, является ингибитором дипептидилпептидазы-4 и может быть использован при разработке препаратов для профилактики диабета 2 типа [29].

Казуаринин проявляет противолейшманиальную, нейропротекторную, противовирусную активность, показывает гастропротекторный эффект [30], а также способен ингибировать пролиферацию клеток аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) [31]. Ранее в ВИЛАР был разработан препарат «Гипорамин», который представляет собой сухой очищенный экстракт, получаемый из листьев облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.), основными действующими веществами которого являются гидролизуемые таннины, в том числе казуаринин, казуариктин и стриктинин. Препарат обладает широким спектром противовирусного действия (вирусы гриппа A и B, аденовирусы, парамиксовирусы, *Herpes simplex*, *Varicella zoster*, цитомегаловирусы, респираторно-синцитиальный вирус и др.) [32]. Наши исследования показывают, что данные соединения обнаружены и в экстракте из листьев *A. sellowiana*, что может свидетельствовать об их потенциальном использовании для разработки противовирусных препаратов.

Педункулагин обладает противовоспалительной активностью, показывает дозозависимую цитотоксичность в отношении клеточных линий хронического миелогенного лейкоза человека (K-562), промиелоцитарного лейкоза человека (HL-60), а также дозозависимую противоопухолевую активность в отношении клеток опухоли печени человека (QGY-7703) [33]. Сообщается, что педункулагин может специфически изменять структуру мембраны и улучшать проницаемость мембраны опухолевых клеток [33]. Предполагается, что педункулагин может взаимодействовать с сайтом связывания рецептора и каталитической парой (Cys145 и His41) основной протеазы COVID-19 [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используя УЭЖХ-ДД-МС-метод, изучили состав и содержание гидролизуемых таннинов в листьях растения *A. sellowiana*, интродуцированного в оранжерейном комплексе ФГБНУ ВИЛАР. Обнаружено 22 фенольных соединения, и 20 из них были идентифицированы. 12 соединений относятся к гидролизуемым таннинам, содержание которых составляет 90 % от общего содержания фенольных соединений. Показано, что листья *A. sellowiana* накапливают в основном мономерные эллаготаннины, на долю которых приходится 92 % от общего содержания гидролизуемых таннинов. Полученные данные свидетельствуют, что листья *A. sellowiana* могут быть использованы в качестве сырья для получения экстрактов с высоким содержанием эллаготаннинов и разработки на их основе лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Aoyama H., Sakagami H., Hatano T. Three new flavonoids, proanthocyanidin, and accompanying phenolic constituents from *Feijoa sellowiana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2018;82(1):31–41. DOI: 10.1080/09168451.2017.1412246.
2. Fischer G., Parra-Coronado A. Influence of some environmental factors on the feijoa (*Acca sellowiana* [Berg] Burret): A review. *Agronomía Colombiana*. 2020;38(3):388–397. DOI: 10.15446/agron.colomb.v38n3.88982.
3. Tuncel N. B., Yılmaz N. Optimizing the extraction of phenolics and antioxidants from feijoa (*Feijoa sellowiana*, *Myrtaceae*). *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52(1):141–150. DOI: 10.1007/s13197-013-0968-0.
4. Omarova Z. M., Kuljan R. V. Evaluation of hybrid forms of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) on the basis of productivity and fruit quality. *Novye tehnologii*. 2019;3:181–189. (In Russ.)
5. Mehrabani D., Rasekh H., Farahi M. H., Masoumi S. J., Acker J. P. Screening of feijoa (*Acca Sellowiana* (O. Berg) Burret) fruit effect on proliferation and apoptosis using bone marrow derived stem cells model. *Electronic Journal of General Medicine*. 2020;18(1):em269. DOI: 10.29333/ejgm/8458.
6. Kedelidze N., Nakashidze I., Baratashvili D., Lomtatidze N. Feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) and its usage in medicine. *Georgian Journal of Biomedical Sciences*. 2019:11.
7. Mosbah H., Louati H., Boujbiha M. A., Chahdoura H., Snoussi M., Flamini G., Ascrizzi R., Bouslema A., Achour L., Selmi B. Phytochemical characterization, antioxidant, antimicrobial and pharmacological activities of *Feijoa sellowiana* leaves growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. 2018;112:521–531. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.12.051.
8. Dell'Olmo E., Gaglione R., Pane K., Sorbo S., Basile A., Esposito S., Arciello A. Fighting multidrug resistance with a fruit extract: anti-cancer and anti-biofilm activities of *Acca sellowiana*. *Natural Product Research*. 2021;35(10):1686–1689. DOI: 10.1080/14786419.2019.1624961.
9. Motohashi N., Kawase M., Shirataki Y., Tani S., Saito S., Sakagami H., Kurihara T., Nakashima H., Wolfard K., Mucsi I., Varga A., Molnár, J. Biological activity of Feijoa peel extracts. *Anticancer research*. 2000;20:4323–4330.
10. Ramírez F., Kallarackal J. Phenological growth stages of Feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret] according to the BBCH scale under tropical Andean conditions. *Scientia Horticulturae*. 2018;232:184–190. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.12.059.

11. Zhu F. Chemical and biological properties of feijoa (*Acca sellowiana*). *Trends in Food Science & Technology*. 2018;81:121–131. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.09.008.
12. Montoro P., Serreli, G., Gil K. A., D'Urso G., Kowalczyk A., Tuberoso C. I. G. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant capacity of edible feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) flower extracts. *Journal of Food Science and Technology*. 2020;57(6):2051–2060. DOI: 10.1007/s13197-020-04239-2.
13. Aniq F. O., Elfarnini M., Abdel-hamid A. A., Blaghen M. Chemical composition of isoflavones compounds and antioxidants from *Feijoa sellowiana* leaves. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2019;9(1):120–124. DOI: 10.30574/gscbps.2019.9.1.0157.
14. Cebi N., Sagdic O. Characterization of *Feijoa sellowiana* leaves based on volatile and phenolic compound compositions and antimicrobial properties. *Food Science and Technology*. 2022;42:e14221. DOI: 10.1590/fst.14221.
15. El-Shenawi S. M., Marzouk M. S., Dib R. A., Elyazed H. A., Shaffie N. M., Moharram F. A. Polyphenols and biological activities of *Feijoa sellowiana* leaves and twigs. *Revista Latinoamericana de Química*. 2008;36(3):103–120.
16. Kim J., Gripenberg S., Karonen M., Salminen J.-P. Seed tannin composition of tropical plants. *Phytochemistry*. 2021;187:112750. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.112750.
17. Haslam E. Vegetable tannins–Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*. 2007;68(22–24):2713–2721. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.09.009.
18. Baert N., Karonen M., Salminen J.-P. Isolation, characterisation and quantification of the main oligomeric macrocyclic ellagitannins in *Epilobium angustifolium* by ultra-high performance chromatography with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015;1419:26–36. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.050.
19. Yoshida T., Yoshimura M., Amakura Y. Chemical and biological significance of oenothein B and related ellagitannin oligomers with macrocyclic structure. *Molecules*. 2018;23(3):552. DOI: 10.3390/molecules23030552.
20. de Oliveira Schmidt H., Rockett F. C., Klen A. V. B., Schmidt L., Rodrigues E., Tischer B., Augusti P. R., de Oliveira V. R., da Silva V. L., Flôres S. H., de O. Rios A. New insights into the phenolic compounds and antioxidant capacity of feijoa and cherry fruits cultivated in Brazil. *Food Research International*. 2020;136:109564. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109564.
21. Mosbah H., Chahdoura H., Adouni K., Kamoun J., Boujbiha M. A., Gonzalez-Paramas A. M., Santos-Buelga C., Ciudad-Mulero M., Morales P., Fernández-Ruiz V., Achour L., Selmi B. Nutritional properties, identification of phenolic compounds, and enzyme inhibitory activities of *Feijoa sellowiana* leaves. *Journal of Food Biochemistry*. 2019;43(11):e13012. DOI: 10.1111/jfbc.13012.
22. Díaz-de-Cerio E., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Ferranti P., Nicoletti R., Perrotta G. M., Gómez-Caravaca A. M. Establishment of pressurized-liquid extraction by response surface methodology approach coupled to HPLC-DAD-TOF-MS for the determination of phenolic compounds of myrtle leaves. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018;410(15):3547–3557. DOI: 10.1007/s00216-018-0914-0.
23. Engström M. T., Palijarvi M., Salminen J. P. Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid, and quinic acid derivatives and quercetin-, kaempferol-and myricetin-based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(16):4068–4079.
24. Vivas N., Laguerre M., de Boissel I. P., de Gaulejac N. V., Nonier M.-F. Conformational interpretation of vescalagin and castalagin physicochemical properties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(7):2073–2078. DOI: 10.1021/jf030460m.
25. Wakamori S., Matsumoto S., Kusuki R., Ikeuchi K., Yamada H. Total synthesis of casuarinin. *Organic Letters*. 2020;22(9):3392–3396. DOI: 10.1021/acs.orglett.0c00876.
26. Santos L. S., Alves Filho E. G., Ribeiro P. R. V., Zocolo G. J., Silva S. M., de Lucena E. M. P., Alves R. E., de Brito E. S. Chemotaxonomic evaluation of different species from the *Myrtaceae* family by UPLC-qToF/MS-MS coupled to supervised classification based on genus. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2020;90:104028. DOI: 10.1016/j.bse.2020.104028.
27. Araújo A. R., Araújo A. C., Reis R. L., Pires R. A. Vescalagin and castalagin present bactericidal activity toward methicillin-resistant bacteria. *ACS biomaterials science & engineering*. 2021;7(3):1022–1030. DOI: 10.1021/acsbiomatrials.0c01698.
28. Quideau S., Varadinova T., Karagiozova D., Jourdes M., Pardon P., Baudry C., Genova P., Diakov T., Petrova R. Main structural and stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonahydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. *Chemistry & biodiversity*. 2004;1(2):247–258. DOI: 10.1002/cbdv.200490021.
29. Kato E., Uenishi Y., Inagaki Y., Kurokawa M., Kawabata J. Isolation of rugosin A, B and related compounds as dipeptidyl peptidase-IV inhibitors from rose bud extract powder. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2016;80(11):2087–2092. DOI: 10.1080/09168451.2016.1214533.
30. Al-Sayed E., Michel H. E., Khattab M. A., El-Shazly M., Singab A. N. Protective role of casuarinin from melaleuca leucadendra against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Planta Medica*. 2020;86(01):32–44. DOI: 10.1055/a-1031-7328.
31. Kuo P.-L., Hsu Y.-L., Lin T.-C., Lin L.-T., Chang J.-K., Lin C.-C. Casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Planta medica*. 2005;71(3):237–243. DOI: 10.1055/s-2005-837823.
32. Tolkachev O. N., Sheichenko O. P., Fadeeva I. I., Sheichenko V. I., Semenova T. S., Shipulina L. D., Vichkanova S. A., inventors. The method of obtaining the antiviral drug «Hyporamine». Patent RUS RU2098111C1. 10.12.1997. Available at: https://patents.google.com/patent/RU2098111C1/ru. (In Russ.)
33. Xiao S.-Y., Wen B.-Q., Zhuang H.-Y., Wang J.-L., Tang J., Chen H.-Z., Chen X.-X., Cao Y. Extraction and antitumor activity of pedunculagin from eucalyptus leaves. *International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology*. 2012:280–282. DOI: 10.1109/iCBEB.2012.217.
34. Khalifa I., Zhu W., Nafie M. S., Dutta K., Li C. Anti-COVID-19 effects of ten structurally different hydrolysable tannins through binding with the catalytic-closed sites of COVID-19 main protease: An *in-silico* approach. 2020. DOI: 10.20944/preprints202003.0277.v1.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-96-103
УДК 615.1

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Горец щавелелистный (горец развесистый): идентификация, химический состав, фармакологическое действие, перспективы использования в медицинской практике (обзор)

А. А. Гудкова✉, **А. С. Чистякова, А. А. Костылева, А. С. Болгов, А. И. Сливкин**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Гудкова Алевтина Алексеевна. **E-mail:** al.f84@mail.ru

ORCID: А. А. Гудкова – https://orcid.org/0000-0002-1275-5000; А. С. Чистякова – https://orcid.org/0000-0002-8291-9904; А. А. Костылева – https://orcid.org/0000-0002-9917-9244; А. С. Болгов – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953; А. И. Сливкин – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354.

Статья поступила: 11.08.2022 **Статья принята в печать:** 10.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Горец щавелелистный [горец развесистый, curlytop knotweed (кудрявый горох)] – *Persicaria lapathifólia* Delarbre относится к семейству гречиховых *Polygonaceae* Juss., роду горец *Persicaria* Mill. Долгое время горец щавелелистный не существовал в качестве отдельного вида, с 1989 г. горец щавелелистный становится самостоятельным видом. Это однолетнее травянистое растение, повторяющее основные признаки рода горец и в качестве главных отличий имеющее более крупные листья, чаще всего беловато-зеленые цветки, собранные в густые соцветия, цветоносы и околоцветник которых имеют большое количество желтоватых железок и специфический сладковатый запах.

Текст. Цель статьи исследование возможных перспектив использования горца щавелелистного в качестве официнального вида. В настоящее время растение не используется в медицинской практике и считается примесью при сборе фармакопейных видов горцев (горца перечного и горца почечуйного). Растение неприхотливо к экологическим условиям, является сорняком, произрастая абсолютно во всех климатических зонах, что указывает на богатую заготовительную базу. Несмотря на морфологическую схожесть горца щавелелистного с другими видами рода горец, в литературе имеется достаточное количество информации, касающейся идентификации объекта, полученной в результате комплексной морфолого-анатомической оценки микроскопическими методами (стереомикроскопия, люминесцентная микроскопия, классическая анатомия, петиолярная анатомия), что позволяет с высокой степенью достоверности исключить ошибки при заготовке сырья и дальнейшем его использовании. Химический состав горца щавелелистного представлен различными классами биологически активных соединений, среди которых наибольший интерес представляют фенольные соединения (флавоноиды), представленные преимущественно гликозидами кверцетина и кемпферола. Кроме того, растение богато витаминами, является источником холина, органических и незаменимых аминокислот. С учетом особенностей компонентного состава горца щавелелистного растение рассматривается в качестве источника получения фитопрепаратов, обладающих кровоостанавливающим, капилляропротекторным, противоопухолевым, противовоспалительным, противогрибковым действием.

Заключение. В результате обобщения имеющихся в литературе данных выявлена перспективность возможного использования горца щавелелистного в качестве лекарственного растительного сырья и лекарственной растительной субстанции для изготовления фитопрепаратов наряду с фармакопейными видами горцев (горца почечуйного и горца перечного травой).

Ключевые слова: горец щавелелистный, горец развесистый, *Persicaria lapathifólia*, род горец, семейство гречишные, химический состав, фармакологическое действие

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

Вклад авторов. А. А. Гудкова и А. И. Сливкин отвечали за организационную часть исследования, осуществляли планирование эксперимента, постановку целей и задач исследования, участвовали в обсуждении полученных результатов. А. А. Гудкова, А. С. Чистякова, А. А. Костылева выполняли поиск и обработку информации, структурирование материала при подготовке статьи. А. С. Болгов выполнил английский перевод. Все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Гудкова А. А., Чистякова А. С., Костылева А. А., Болгов А. С., Сливкин А. И. Горец щавелелистный (горец развесистый): идентификация, химический состав, фармакологическое действие, перспективы использования в медицинской практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):96–103. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-96-103

Persicaria lapathifólia: Identification, Chemical Composition, Pharmacological Action, Prospects for Use in Medical Practice (Review)

Alevtina A. Gudkova✉, **Anna S. Chistyakova, Anna A. Kostyleva, Aleksei S. Bolgov, Aleksei I. Slivkin**

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394018, Russia

✉ **Corresponding author:** Alevtina A. Gudkova. **E-mail:** al.f84@mail.ru

ORCID: Alevtina A. Gudkova – https://orcid.org/0000-0002-1275-5000; Anna S. Chistyakova – https://orcid.org/0000-0002-8291-9904; Anna A. Kostyleva – https://orcid.org/0000-0002-9917-9244; Aleksei S. Bolgov – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953; Aleksei I. Slivkin – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354.

Received: 11.08.2022 **Revised:** 10.07.2023 **Published:** 25.08.2023

© Гудкова А. А., Чистякова А. С., Костылева А. А., Болгов А. С., Сливкин А. И., 2023
© Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Kostyleva A. A., Bolgov A. S., Slivkin A. I., 2023

Abstract

Introduction. Knotweed (curlytop knotweed (curly pea)) – *Persicaria lapathifólia* Delarbre belongs to the buckwheat family *Polygonaceae* Juss., the genus *Persicaria* Mill. For a long time, the *Persicaria lapathifólia* did not exist as a separate species since 1989, the sorrel-leaved mountaineer has become an independent species. This is an annual herbaceous plant, repeating the main features of the genus *Persicaria*, and, as the main differences, having larger leaves, most often whitish-green flowers collected in dense inflorescences, peduncles and perianth of which have a large number of yellowish glands and a specific sweet smell.

Text. Purpose of the work was to study the possible prospects for using the *Persicaria lapathifólia* as an official species. Currently, the plant is not used in medical practice and is considered an admixture in the collection of pharmacopoeial species of the genus *Persicaria* Mill. The plant is unpretentious to environmental conditions, is a weed, growing in absolutely all climatic zones, which indicates a rich procurement base. Despite the morphological similarity of the mountaineer sorrel with other species of the genus *Persicaria*, there is a sufficient amount of information in the literature regarding the identification of the object obtained as a result of a comprehensive morphological and anatomical assessment by microscopic methods (stereomicroscopy, luminescent microscopy, classical anatomy, petiolar anatomy), which allows a high the degree of reliability to eliminate errors in the procurement of raw materials and their further use. The chemical composition of *Persicaria lapathifólia* is represented by various classes of biologically active compounds, among which the most interesting are phenolic compounds (flavonoids), represented mainly by glycosides of quercetin and kaempferol. In addition, the plant is rich in vitamins, being a source of choline, organic and essential amino acids. Taking into account the peculiarities of the component composition of the mountaineer sorrel, the plant is considered as a source of phytopreparations with hemostatic, capillary-protective, antitumor, anti-inflammatory, antifungal effects.

Conclusion. As a result of the generalization of the data available in the literature, the prospects of *Persicaria lapathifólia* to be introduced as a medicinal plant material and medicinal plant substance for the production of herbal medicines along with *Persicaria maculosa* and *Persicaria hydropiper* herb were revealed.

Keywords: curlytop knotweed, *Persicaria lapathifólia*, genus *Persicaria*, *Polygonaceae*, chemical composition, pharmacological effects

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

Contribution of the authors. Alevtina A. Gudkova and Aleksei I. Slivkin were responsible for the organizational part of the study, carried out the planning of the experiment, setting the goals and objectives of the study, and participated in the discussion of the results. Alevtina A. Gudkova, Anna S. Chistyakova, Anna A. Kostyleva performed the search and processing of information, structuring the material in the preparation of the article. Aleksei S. Bolgov made an English translation. All authors participated in the discussion of the obtained results in the format of a scientific discussion.

For citation: Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Kostyleva A. A., Bolgov A. S., Slivkin A. I. *Persicaria lapathifólia*: identification, chemical composition, pharmacological action, prospects for use in medical practice. *Drug development & registration*. 2023;12(3):96–103. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-96-103

ВВЕДЕНИЕ

Горец щавелелистный (горец развесистый, curlytop knotweed (кудрявый горох) [1]) – *Persicaria lapathifólia* Delarbre относится к семейству гречиховых *Polygonaceae* Juss., роду горец *Persicaria* Mill. [2]. На настоящий момент род горец можно разделить на 4 ряда: ряд *Amphibiae* Kom., куда включены водная и наземная формы горца земноводного, ряд *Hydropiperiformes* Kom., куда отнесены горец перечный, горец малый и др., ряд *Persicariaeformes* Kom., включающий один вид – горец почечуйный, ряд *Lapathiiformes* Worosch., куда отнесены виды горцев щавелелистный, войлочный, Бриттингера, узловатый, тучный, шероховатый и др. [2, 3]. Виды данного ряда похожи по своей ботанической характеристике, способны к образованию полиморфных форм в результате межвидового скрещивания [4–7].

Долгое время горец щавелелистный не существовал в качестве отдельного вида. В ранних публикациях под названием горец щавелелистный выступали три вида – горец войлочный, горец узловатый и горец льняной. С 1953 года виды были разделены и рассматривались как самостоятельные. В 1959 году горец щавелелистный являлся синонимом горца войлочного. С 1964 года горец щавелелистный считался сборным видом, включающим горцы шероховатый, узловатый, войлочный, льняной [3, 4, 8]. С 1989 года горец щавелелистный становится отдельным видом, что отражено в работах Н. Н. Цвелёва, а к 1992 было официализировано существование всех остальных видов данного ряда [3].

Учитывая, что одной из главных задач современной фармакогностической науки является поиск новых видов растений, перспективных к использованию в медицинской практике, что в первую очередь достигается введением в ранг официнальных видов, близкородственных к уже известным, актуальным является рассмотрение возможности использования горца щавелелистного в медицине наряду с горцем почечуйным и горцем перечным.

Целью работы являлось исследование возможных перспектив использования горца щавелелистного в качестве официнального вида.

Распространение в природе и морфологические особенности растения

Горец щавелелистный (рисунок 1)[1] имеет широкий ареал распространения и встречается практически повсеместно. Наиболее часто растение можно встретить вдоль водоемов, в оврагах, канавах, является сорняком на культурных плантациях [2, 9, 10].

Рисунок 1. Внешний вид горца щавелелистного

Горец щавелелистный – это однолетнее растение с высотой стебля 30–60 см. Стебель прямостоячий, распростертый, с утолщением в узлах, голый, иногда красноватый, с наличием железок преимущественно в верхней части. Листья ланцетовидные, удлиненно ланцетовидные, редко широкоэллиптические длиной от 4 до 10 см, иногда наделены темным пятном и не имеют жгучего вкуса. Лист опушен с верхней стороны нитевидными волосками, которые чаще встречаются на молодых листьях, снизу листа имеются многочисленные желтоватые железки, а мелкие пучковые волоски конической формы локализованы по жилке и краю листовой пластины, который завернут на нижнюю сторону.

В узлах стеблей имеются пленчатые раструбы различных оттенков. Раструб отстает от стебля, неплотно облегая его, имеются железистые образования желтого цвета, покрыт очень короткими реснитчатыми волосками, которые могут отсутствовать, и редкими тонкими, длинными пучковыми волосками. Соцветие представлено поникающей колосовидной кистью, цветки мелкие, невзрачные, чаще всего розовато-белого или зеленоватого цветов. На околоцветнике и цветоносах имеются железки.

Плод черный, матовый, плоский, яйцевидной или чечевицеобразной формы, скрыт околоцветником[2] [7, 11–17]. Как уже говорилось выше, ввиду схожести морфологического строения виды ряда *Lapathiiformes* довольно сложно диагностировать. Для определения внутрирядовой принадлежности видов исследователи выделяют ряд идентификационных признаков. Для горца щавелелистного установлено, что он имеет цветоносы с редко расположенными железками. На листьях железки углублены и находятся на нижней поверхности, в то время как у горца узловатого цветоносы густо железистые, а железки на листьях многочисленные, золотистые, выпуклые [7, 18, 19].

При описании автолюминесценции[3] морфологических частей горца щавелелистного отмечается довольно сильное зеленовато-желтое свечение клеточных стенок эпидермиса, замыкающих клеток устьиц, пучковых трихом и проводящей системы по жилкам листа и черешка. Слабой флуоресценцией обладают нитевидные волоски на листьях и раструбах. Железки на листьях, цветоносах и околоцветнике обладают слабой люминесценцией, что отличает данный вид от других, у которых железки имеют сильное характерное свечение. Клетки раструбов и пучковые волоски на них выделяются свечением желтовато-зеленого цвета. Пыльцевые зерна дают яркое зеленое свечение [20].

Анатомические особенности

Анатомически горец щавелелистный повторяет набор признаков, характерных в целом для представителей рода горец.

Эпидермис стебля горца щавелелистного зачастую покрыт редкими пучковыми и пленчатыми трихомами, имеет вытянутые клетки с сильными утолщениями их стенок. В отличие от других представителей рода выделительный аппарат стебля представлен железками, имеющими до 16 выделительных клеток, и схизогенными вместилищами с желтым содержимым. Вдоль проводящих пучков стебля, черешка и жилок находятся друзы оксалата кальция [20, 21].

Главным отличием раструба горца щавелелистного от других похожих видов является или полное отсутствие, или наличие на нем редких реснитчатых волосков, которые у других видов чаще всего многочисленны. Пучковые трихомы редкие, короткие, шириококонические. Пленчатые волоски встречаются нечасто, обламываются. У основания раструба присутствует много друз оксалата кальция [20, 21].

На верхней стороне листовой пластины клетки эпидермиса многоугольные, округлые, крупные, в отличие от вытянутых и извилистых клеток нижнего эпидермиса, где также находятся устьица аномо-

[1] Горец щавелелистный. Доступно по: https://www.plantarium.ru/page/image/id/45336.html. Ссылка активна на 28.11.2022.

[2] The Plant List. Available at: http:// http://www.theplantlist.org. Accessed: 28.11.2022.

[3] Государственная фармакопея Российской Федерации. 2018. Доступно по: https://femb.ru/record/pharmacopea14. Ссылка активна на 28.11.2022.

цитного типа. Пучковые волоски по краю листа длинные, с расходящимися клетками, также они располагаются снизу листа, где наблюдаются нитевидные волоски и желтоватые железки. В мезофилле просматриваются вместилища и многочисленные крупные друзы оксалата кальция [20, 21].

Клетки листочка околоцветника ромбовидные у основания. Одноклеточные волоски многочисленные и локализованы на втутренней поверхности листочка, там же наблюдаются друзы оксалата кальция. На поверхности листочка видны крупные железки, имеющие до 10 выделительных клеток [20, 21].

По частоте встречаемости основных характеристических признаков на листе горца щавелелистного на единицу площади (1 мм^2) авторы [20] отмечают, что количество железок не выделяет растение в пределах рода (10–30 на 1 мм^2), однако количество друз оксалата кальция меньше, чем у ближайших родственных видов (120 ± 45, тогда как войлочного, узловатого и горца Бриттингера по 180–200). Главной отличительной особенностью горца щавелелистного является преобладающее количество вместилищ (130 ± 20), что может быть использовано в качестве маркерного признака в совокупности с другими критериями подлинности.

Форма поперечного среза главной жилки листа горца щавелелистного неправильная, почти овальная. Проводящих пучка четыре, со стороны флоэмы наблюдается склеренхимная обкладка. При этом форма поперечного среза через жилки других видов рода горец трапецевидная или ближе к треугольной.

Поперечный срез черешка горца щавелелистного продолговато-эллиптической формы, асимметричен. На поверхности эпидермиса имеется тонкий слой кутикулы, просматриваются места прикрепления пучковых волосков. Под колленхимой находится хлоренхимный слой, наиболее выраженный на адаксиальной стороне. Колленхима уголкового типа (2–3 на абаксиальной и 4–5 на адаксиальной стороне). Проводящие пучки все открытого типа, коллатеральные, в количестве двенадцати, не различаются по размерам. Расположены по шесть на абаксиальной и адаксиальной сторонах. Склеренхима почти отсутствует. Клетки паренхимы крупные, наблюдаются друзы оксалата кальция [22, 23].

Авторами [24] предложена идентификация горца щавелелистного по строению эпидермиса околоцветника. С помощью сканирующей электронной микроскопии было выявлено, что на эпидермисе листочка околоцветника бороздки тонкие, прямые, редкие и продольные, и на основе данного эксперимента был разработан ключ – идентификатор видов рода горец по строению клеток околоцветника.

Характеристика метаболома

Горец щавелелистный является перспективным источником природных активных соединений. При оценке экстрактивных веществ, извлекаемых из травы растения, авторами работы [25] выявлено, что из десяти видов рода горец наибольшее содержание экстрактивных веществ характерно для горца щавелелистного, а при использовании в качестве экстрагента водно-спиртовых смесей максимум веществ извлекается 40%-м спиртом этиловым, а также раствором хлористоводородной кислоты 1%-й.

Среди соединений первичного синтеза в траве горца щавелелистного присутствуют сахара (сахароза, глюкоза, фруктоза, среди которых превалирует фруктоза) [26], аскорбиновая кислота, рибофлавин. Авторами [27] отмечено, что трава горца щавелелистного является источником холина. Аминокислотный состав горца щавелелистного представлен 11 свободными аминокислотами, среди которых методом ТСХ идентифицированы аргинин, пролин, глицин, метеонин, глутаминовая кислота, треонин, валин, тирозин, фенилаланин. В результате кислотного гидролиза и анализа методом капиллярного электрофореза установлено наличие 17 аминокислот: к уже идентифицированным можно добавить аланин, изолейцин, серин, цистеин, аспарагиновую кислоту, лизин, гистидин. Необходимо отметить, что трава горца щавелелистного среди представителей данного рода наиболее богата незаменимыми аминокислотами [28]. В траве горца щавелелистного установлено также содержание филлохинона, при этом для данного вида отмечено наивысшее его количество (1,01 мг/%) [29, 30]. Кроме того, растение содержит каротиноиды и эфирные масла [31].

Среди компонентов вторичного синтеза отмечается высокое содержание органических кислот в траве горца щавелелистного (4,5 % суммарно). Идентифицированы следующие кислоты, расположенные в порядке убывания их количества: муравьиная (2,8 %), винная (0,5 %), щавелевая (0,35 %), лимонная (0,28 %), пропионовая, фумаровая, сорбиновая, молочная, яблочная, бензойная [20, 32].

Основными компонентами химического состава горца щавелелистного являются фенольные соединения [33, 34]. Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин составляет более 4 % [33]. Г. И. Высочиной было показано наличие таких соединений, как гликозиды кемпферола и кверцетина, которые ацилированы галловой кислотой [3]. Также методом ВЭЖХ идентифицированы ктаксифолин, мирицетин-3-галактозид, мирицетин-3-глюкуронид изорамнетин, рамнетин дигидрокверцетин, кверцетин-глюкуронид, кверцетин-малонин-галактозид, гиперозид, изогкверцетрин, кемпферол-3-галактозид, кемпферол-3-глюкуронид, свободные кверцетин и кемпферол, астрагалин и лютеолин [35–39].

Трава горца щавелелистного характеризуется высоким содержанием суммы дубильных веществ в пересчете на танин (28 %) и в пересчете на галловую кислоту (7,7 %) [40].

Минеральный комплекс травы горца щавелелистного представлен различными элементами, превалирующими из которых являются кальций, магний, калий и фосфор [41].

Фармакологическое действие

Горец щавелелистный наделен весьма ценными целебными свойствами, при этом с лечебной целью рекомендуется использовать траву этого растения. Надземную часть растения часто используют в виде как водных, так и спиртовых извлечений в качестве ранозаживляющего и кровоостанавливающего средства исключительно в народной медицине [42, 43]. Лекарственные растительные препараты на основе горца щавелелистного травы на данный момент ни на территории России, ни в других странах не зарегистрированы. В работе [16] был изучен метанольный экстракт травы горца щавелелистного и установлены его антиоксидантные свойства, противорвотная, противопаразитарная активность, а также выявлено, что он тормозит активность ферментативных систем – ацетилхолинэстеразы и α-глюкозидазы[1]. Извлечения из плодов горца щавелелистного проявляют противогрибковую и антибактериальную активность, ингибируя рост *S. aureus* и *Trichoderma spps* [16, 44, 45, 46]. В работе [20, 47] жидкий экстракт горца щавелелистного в тесте ксилоловых петехий проявлял выраженное капилляропротекторное действие, превосходящее по силе жидкие экстракты из травы горца перечного и горца почечуйного.

Гликозиды кверцетина и кемпферола, выделенные из травы горца щавелелистного, оказывали ингибирующее действие на образование супероксида в неопсонизированных, стимулированных зимозаном моноцитах человека [48].

Также для растения отмечено наличие противоопухолевого, диуретического и противодиабетического действия [49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ доступных отечественных и зарубежных научных публикаций показал, что проблема идентификации вида среди других близкородственных освещена довольно полно. Также была установлена некая ограниченность и разрозненность информации, касающейся метаболомического анализа горца щавелелистного, а также практически отсутствие результатов доклинических исследований извлечений из травы изучаемого растения.

Однако уже имеющиеся сведения о химическом составе растения указывают на актуальность дальнейшего изучения горца щавелелистного с последующим внедрением его в ранг официнальных растений наряду с горца почечуйного и горца перечного травой, а также необходимость разработки нормативной документации на данный вид сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yasmin G., Khan M. A., Shaheen N., Hayat M. Q., Zafar M., Ahmad M. Pollen morphological diversity in selected species of *Persicaria* Mill. (Family; Polygonaceae). *Medicinal Plants Research*. 2010;4(10):862–870.
2. Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е испр. и доп. изд. Москва: КМК; 2014. 635 с.
3. Высочина Г. И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишные (*Polygonaceae* juss.). Сообщ. III. Род горец – *Persicaria* Mill. *Turczaninowia.* 2008;11(4):129–137.
4. Высочина Г. И. Флавоноиды сибирских видов рода *Polygonum* L. в связи с систематикой рода. Дис. … канд. биол. наук. Томск; 1969. 23 с.
5. Тахтаджян А. Л. Система магнолиофитов. Ленинград: Наука; 1987. 439 с.
6. Хромых Е. Г., Гудкова А. А., Чистякова А. С., Щепилова О. Н., редакторы. Теоретический подход к идентификации представителей рода *Persicaria* Mill. по морфологическим признакам. В сб.: Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств. Материалы 7-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2018». 28–30 марта 2018 г. Воронеж.
7. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Сорокина А. А., Кузнецов А. Ю., Хромых Е. Г. Идентификация представителей рода *Persicaria* Mill. по морфологическим признакам. *Фармация.* 2019;68(1):10–19. DOI: 10.29296/25419218-2019-01-02.
8. Ворошилов В. Н. О принципах классификации полезных растений. *Бюллетень Главного ботанического сада АН СССР.* 1953;16:42–51.
9. Тупицына Н. Н. Ревизия семейства Polygonaceae Juss. во флоре южной части Красноярского края. *Turczaninowia.* 2012;15(2): 44–48.
10. Keskin M., Severoğlu Z. The genus *Persicaria (Polygonaceae)* in Turkey with a new taxon record. *EMU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;3(2):97–105.
11. Алявдина К. П., Виноградова В. П. Определитель растений. Ярославль: Верхне-Волжское книжное издательство; 1972. 399 с.
12. Губанов И. А., Киселёва К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н., Октябрёва Н. Б. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. Москва: КМК; 2003. 665 с.
13. Acheroyd J. R. New nomenclatural combinations in *Persicari*a Miller and a new hybrid name in Rumex L. (Polygonaceae). *Contribuţii Botanice.* 2013;48:15–21.
14. Allen L., Kershaw L. An illustrated key to the *Polygonaceae* of Alberta. Alberta Native Plant Counci; 2019. 14 p.
15. Kubinova R., Porizkova R., Bartl T., Navratilova A., Cizek A., Valentova M. Biological activities of polyphenols from *Polygonum lapathifolium*. *Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants*. 2014;13(6):506–516.
16. Bomble F. W. Persicaria-Arten der Waldwege im Aachener Raum. *Jahrbuch des Bochumer Botanischen Verein.* 2016;7:267–281.
17. Timson J. The taxonomy of *Polygonum lapathifolium* L., *P. nodosum* Pers., and *P. tomentosum* Schrank. Watsollia. 1963;5(6):386–395.
18. Harold R. H., Craig C. F. Hinds *Persicaria lapathifolia* (Linnaeus) Gray. *Journal Flora of North America.* 2015;5:302.

[1] Spotted ladysthumb *Persicaria maculosa* Gray or *Polygonum persicaria* L. curlytop knotweed *Persicaria lapathifolia* (L.) Gray or *Polygonum lapathifolium* L. Available at: https://accs.uaa.alaska.edu/wp-content/uploads/Persicaria_maculosa_BIO_PEMA24.pdf. Accessed: 28.11.2022.

19. Wilcox M., Yorkshire W. Recording Persicaria maculosa and P. lapathifolia (Polygonaceae). *UK: British & Irish Botany*; 2021;3(3): 349–361.
20. Гудкова А. А. Фармакогностическое изучение представителей рода горец (*Persicaria* Mill.) как перспективного источника получения лекарственных препаратов. Дис. … канд. фарм. наук. Москва; 2020. 450 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-predstavitelei-roda-gorets-persicaria-mill-kak-perspektivnogo. Ссылка активна на 28.11.2022.
21. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Сорокина А. А., Щепилова О. Н., Коренская И. М., Сливкин А. И. Анатомо-диагностические маркеры в определении подлинности представителей рядов *Persicariaeformes* Kom. и *Lapathiiformes* Worosch. семейства Polygonaceae lindl. *Фармация.* 2019;68(8):15–21. DOI: 10.29296/25419218-2019-08-03.
22. Гудкова А. А., Агафонов В. А., Негробов В. В., Щепилова О. Н., Чистякова А. С., Сорокина А. А., Сливкин А. И. Изучение подлинности растительного сырья методом петиолярной анатомии на примере некоторых видов рода горец *Persicária* Mill. *Биофармацевтический журнал*. 2020;12(6):75–80. DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-6-75-80.
23. Keshavarzi M., Mosaferi S., Shojaii M. Leaf anatomical studies of the annual species of *Polygonum s.l. (Polygonaceae*) in Iran. *Phytologia Balcanica*. 2012;18(2):127–133.
24. Shiha M. A. Tepal surface micromorphology and its taxonomic implications in some species of *Polygonaceae* in Egypt. *Journal of Experimental Biology (Botany).* 2019;5(2):261–268.
25. Чистякова А. С., Гудкова А. А., Кузнецов А. Ю., Васильева С. А. Количественное определение простых сахаров в траве некоторых видов рода *Persicaria* Mill. В сб.: IV Гаммермановские чтения: Сборник научных трудов. 30–31 января 2019. Санкт-Петербург: ООО «РУСАЙНС». 345–348 с.
26. Кузнецов А. Ю., Хромых Е. Г., Гудкова А. А., Чистякова А. С., Васильева С. А. Количественное определение аскорбиновой кислоты в некоторых представителях рода *Persicariae* Mill. В сб.: IV Гаммермановские чтения: Сборник научных трудов. 30–31 января 2019. Санкт-Петербург: ООО «РУСАЙНС». 171–175 с.
27. Чистякова А. С., Гудкова А. А. Сравнительное изучение водорастворимых витаминов в растительном сырье (на примере травы горца почечуйного (*Polygonum Persicaria* L.) и горца щавелелистного *Polygonum lapathifolium* L.). В сб.: Перспективы лекарственного растениеведения: Материалы Международной научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Алексея Ивановича Шретера. 01–02 ноября 2018. Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений». 348–352 с.
28. Чистякова А. С., Гудкова А. А., Сорокина А. А., Сливкин А. И. Сравнительное изучение аминокислотного состава представителей рядов *Persicariaeformes* Kom. и *Lapathiiformes* Worosch. *Химия растительного сырья*. 2019;4:157–162. DOI: 10.14258/jcprm.2019044347.
29. Лукша Е. А., Погодин И. С., Иванова Е. В. Оценка содержания фитоменадиона в надземной части растений семейства гречишные флоры Сибири. *Бутлеровские сообщения*. 2015;41(3):103–108.
30. Редкокашин Д. Е. Фитохимическое исследование сырья фармакопейных растений рода *Polygonum*. *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов*. 2010;65:102–104.
31. Abd-ElGawad A. M., Bonanomi G., Al-Rashed S. A., Elshamy A. I. *Persicaria lapathifolia* Essential Oil: Chemical Constituents, Antioxidant Activity, and Allelopathic Effect on the Weed Echinochloa colona. *Plants*. 2021;10(9):1798. DOI: 10.3390/ plants10091798.
32. Чистякова А. С., Гудкова А. А., Сливкин А. И., Чупандина Е. Е. Изучение профиля органических кислот видов рода горец (*Persicaria* mill.). *Фармация и фармакология*. 2022;10(1):44–54. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-44-54.
33. Пименова И. А., Гудкова А. А., Чистякова А. С. Количественное содержание суммы флавоноидов в некоторых представителях рода *Polygonum* L. В сб.: Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Материалы 7-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2018». 28–30 марта 2018. Воронеж*:* Воронежский государственный университет. 287–290 с.
34. Grudzinskaya L., Gemejiyeva N., Karzhaubekova Zh., Nelina N. Botanical coverage of the leading families of medicinal flora of Kazakhstan. *BIO Web Conf.* 2021;31:00007. DOI: 10.1051/bioconf/20213100007.
35. Smolarz H. D. Chromatographical analysis of phenolic acids in some species of *Polygonum* L. genus. Quantitative determination of the major components by high performance liquid chromatography (HPLC). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2000;69(1):21–23.
36. Smolarz H. D. Comparative study on the free flavonoid aglycones in herbs of different species of *Polygonum* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Rescarch*. 2002;59:145–148.
37. Smolarz H. D. Flavonoids from *Polygonum lapathifolium* ssp. *tomentosum*. *Pharmaceutical Biology*. 2002;40(5):390–394.
38. Smolarz H. D. Chromatographical analysis of phenolic acids in some species of *Polygonum* L. Genus part 1 qualitative analysis by Two-Dimensional Thin Layer Chromatography (TLC). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 1999;68(4):287–290.
39. Гудкова А. А., Перова И. Б., Эллер К. И., Чистякова А. С., Сливкин А. И., Сорокина А. А. Фенольные соединения в траве горца почечуйного, произрастающего в Воронежской области. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(3):37–41. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-3-37-41.
40. Чистякова А. С., Гудкова А. А. Содержание дубильных веществ в представителях рода Persicaria mill. В сб.: От растения до лекарственного препарата: Материалы международной научной конференции. 04–05 июня 2020. Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений». 281–285 с.
41. Лукша Е. А., Корнеева И. Н., Савченко И. А., Иванова Е. В., Калинкина Г. И., Коломиец Н. Э. Минеральный состав некоторых видов семейства *Polygonaceae* флоры Сибири. *Растительный мир Азиатской России*. 2018;3(31):102–106. DOI: 10.21782/RMAR1995-2449-2018-3(102-106).
42. Лазарев А. В., Недопекина С. В. Обзор рода *Polygonum* L. *Региональные геосистемы*. 2009;11(66):18–24.
43. Muatasim J., Tawseef A. M., Rakesh K. K. Traditional use of medicinal plants among the indigenous communities in Baramulla district, Jammu and Kashmir, India. *Nordic Journal of Botany*. 2022;2022(6):e03387. DOI: 10.1111/njb.03387.
44. Husain F., Ahmad B., Hameed I., Dastagir G., Sanaullah P., Azam S. Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of *Polygonaceae*. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(31):5032–5036.
45. Hailemariam A., Feyera M., Deyou T., Abdissa N. Antimicrobial Chalcones from the Seeds of Persicaria lapathifolia. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*. 2018;7(1):1000237. DOI: 10.4172/2167-0501.1000237.
46. Bulbul L. Phytochemical and pharmacological evaluations of *Polygonum lapathifolium* stem extract for anthelmintic and antiemetic activity. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2013;2(3):57–62.
47. Gudkova A. A., Buzlama A. V., Slivkin A. I. Preclinical studies of pharmacological activity of *Persicaria maculosa* herb extract. *Reviews on clinical pharmacology and drug therapy*. 2019. 25 p.
48. Kim Y., Jang D.-S., Park S.-H., Yun J., Min B. K., Min K.-R., Min K., Lee H.-K. Flavonol glycoside gallate and ferulate esters from *Persicaria lapathifolia* as inhibitors of superoxide production in human monocytes stimulated by unopsonized zymosan. *Planta Medica*. 2009;6(01):72–74. DOI: 10.1055/s-0029-1243112.

49. Seimandi G., Alvarez N., Stegmayer M. I., Fernandez L., Ruiz V., Favaro M. A., Derita M. An Update on Phytochemicals and Pharmacological Activities of the Genus *Persicaria* and *Polygonum*. *Molecules*. 2021;26(19):5956. DOI: 10.3390/molecules26195956.

REFERENCES

1. Yasmin G., Khan M. A., Shaheen N., Hayat M. Q., Zafar M., Ahmad M. Pollen morphological diversity in selected species of *Persicaria* Mill. (Family; Polygonaceae). *Medicinal Plants Research*. 2010;4(10):862–870.
2. Maevskiy P. F. Flora of the middle zone of the European part of Russia. 11th rev. and additional ed. Moscow: KMK; 2014. 635 p. (In Russ.)
3. Vysochina G. I. Phenolic compounds in the systematics and phylogeny of the buckwheat family (*Polygonaceae* juss.). Message III. Genus mountaineer – *Persicaria* Mill. *Turczaninowia*. 2008;11(4):129–137. (In Russ.)
4. Vysochina G. I. Flavonoids of Siberian species of the genus *Polygonum* L. in connection with the taxonomy of the genus. [Dissertation]. Tomsk; 1969. 23 p. (In Russ.)
5. Takhtadzhyan A. L. Magnoliophyte system. Leningrad: Nauka; 1987. 439 p. (In Russ.)
6. Khromykh E. G., Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Shchepilova O. N., editors. Theoretical approach to the identification of representatives of the genus *Persicaria* Mill. by morphological features. In: Ways and forms of improving pharmaceutical education. Topical issues of development and research of new drugs. Materials of the 7th International Scientific and Methodological Conference "Pharmaceutical Education-2018". March 28–30, 2018. Voronezh. (In Russ.)
7. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sorokina A. A., Kuznetsov A. Yu., Khromykh E. G. Identification of representatives of the genus *Persicaria* Mill. according to morphological characteristics. *Pharmacy*. 2019;68(1):10–19. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2019-01-02.
8. Voroshilov V. N. On the principles of classification of useful plants. *Bulletin of the Main Botanical Garden of the USSR Academy of Sciences*. 1953;16:42–51. (In Russ.)
9. Tupitsyna N. N. Revision of the family *Polygonaceae* Juss. in the flora of the southern part of the Krasnoyarsk territory. *Turczaninowia*. 2012;15(2):44–48. (In Russ.)
10. Keskin M., Severoğlu Z. The genus *Persicaria (Polygonaceae)* in Turkey with a new taxon record. *EMU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;3(2):97–105.
11. Alyavdina K. P., Vinogradova V. P. Plant identification. Yaroslavl: Upper Volga book publishing house; 1972. 399 p. (In Russ.)
12. Gubanov I. A., Kiseleva K. V., Novikov V. S., Tihomirov V. N., Oktyabreva N. B. Illustrated guide to plants of Central Russia. Moscow: KMK; 2003. 665 p. (In Russ.)
13. Acheroyd J. R. New nomenclatural combinations in *Persicari*a Miller and a new hybrid name in Rumex L. (Polygonaceae). *Contribuţii Botanice*. 2013;48:15–21.
14. Allen L., Kershaw L. An illustrated key to the *Polygonaceae* of Alberta. Alberta Native Plant Counci; 2019. 14 p.
15. Kubinova R., Porizkova R., Bartl T., Navratilova A., Cizek A., Valentova M. Biological activities of polyphenols from *Polygonum lapathifolium*. *Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants*. 2014;13(6):506–516.
16. Bomble F. W. Persicaria-Arten der Waldwege im Aachener Raum. *Jahrbuch des Bochumer Botanischen Verein*. 2016;7:267–281.
17. Timson J. The taxonomy of *Polygonum lapathifolium* L., *P. nodosum* Pers., and *P. tomentosum* Schrank. Watsollia. 1963;5(6):386–395.
18. Harold R. H., Craig C. F. Hinds *Persicaria lapathifolia* (Linnaeus) Gray. *Journal Flora of North America*. 2015;5:302.
19. Wilcox M., Yorkshire W. Recording Persicaria maculosa and P. lapathifolia (Polygonaceae). *UK: British & Irish Botany*; 2021;3(3): 349–361.
20. Gudkova A. A. Pharmacognostic study of representatives of the mountaineer genus (*Persicaria* Mill.) as a promising source of drugs: avtoref. [Dissertation]. Moscow; 2020. 450 p. Available at: https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-predstavitelei-roda-gorets-persicaria-mill-kak-perspektivnogo. Accessed: 28.11.2022. (In Russ.)
21. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sorokina A. A., Shchepilova O. N., Korenskaya I. M., Slivkin A. I. Anatomical and diagnostic markers for determining the identity of the representatives of the series *Persicariaeformes* Kom. and *Lapathiiformes* Worosch. of the family *Polygonaceae* lindl. *Pharmacy*. 2019;68(8):15–21. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2019-08-03.
22. Gudkova A. A., Agafonov V. A., Negrobov V. V., Shchepilova O. N., Chistyakova A. S., Sorokina A. A., Slivkin A. I. The study of the authenticity of plant materials by the method of petiolar anatomy on the example of some species of the genus *Persicaria* Mill. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2020;12(6):75–80. (In Russ.). DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-6-75-80.
23. Keshavarzi M., Mosaferi S., Shojaii M. Leaf anatomical studies of the annual species of *Polygonum s.l. (Polygonaceae*) in Iran. *Phytologia Balcanica*. 2012;18(2):127–133.
24. Shiha M. A. Tepal surface micromorphology and its taxonomic implications in some species of *Polygonaceae* in Egypt. *Journal of Experimental Biology (Botany)*. 2019;5(2):261–268.
25. Chistyakova A. S., Gudkova A. A., Kuznetsov A. Yu., Vasilyeva S. A. Quantification of simple sugars in the grass of some species of the genus *Persicaria* Mill. In: IV Hammerman readings: Collection of scientific papers. January 30–31, 2019. St. Petersburg: LLC "RUSSIGN". 345–348 p. (In Russ.)
26. Kuznecov A. Ju., Hromyh E. G., Gudkova A. A., Chistjakova A. S., Vasil'eva S. A. Quantitative determination of ascorbic acid in some representatives of the genus *Persicariae* Mill. In: IV Hammerman readings: Collection of scientific papers. January 30–31, 2019. St. Petersburg: LLC "RUSSIGNS". 171–175 p. (In Russ.)
27. Chistyakova A. S., Gudkova A. A. Comparative study of water-soluble vitamins in vegetable raw materials (on the example of the herb knotweed (*Polygonum Persicaria* L.) and knotweed sorrel *Polygonum lapathifolium* L.). In: Perspectives of medicinal plant science: Proceedings of the International scientific conference dedicated to the 100th anniversary of the birth of Professor Alexei Ivanovich Schreter. November 01-02, 2018. Moscow: Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants". 348–352 p. (In Russ.)
28. Chistyakova A. S., Gudkova A. A., Sorokina A. A., Slivkin A. I. Comparative study of the amino acid composition of representatives of the *Persicariaeformes* Kom. and *Lapathiiformes* Worosch. *Himija rastitel'nogo syr'ja*. 2019;4:157–162. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019044347.
29. Luksha E. A., Pogodin I. S., Ivanova E. V. Estimation of phytomenadione content in the aerial parts of plants of the buckwheat flora family of Siberia. *Butler messages*. 2015;41;3:103–108. (In Russ.)
30. Redkokashin D. E. Phytochemical study of raw materials of pharmacopoeial plants of the genus *Polygonum*. *Development, research and marketing of new pharmaceutical products: a collection of scientific papers*. 2010;65:102–104. (In Russ.)
31. Abd-ElGawad A. M., Bonanomi G., Al-Rashed S. A., Elshamy A. I. *Persicaria lapathifolia* Essential Oil: Chemical Constituents, Antioxidant Activity, and Allelopathic Effect on the Weed Echinochloa colona. *Plants*. 2021;10(9):1798. DOI: 10.3390/ plants10091798.
32. Chistjakova A. S., Gudkova A. A., Slivkin A. I., Chupandina E. E. Study of the profile of organic acids in species of the genus Knotweed *(Persicaria* mill.). *Pharmacy and pharmacology*. 2022;10(1): 44–54. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-44-54.
33. Pimenova I. A., Gudkova A. A., Chistyakova A. S. Quantitative content of total flavonoids in some representatives of the genus *Polygonum* L. In: Ways and forms of improving pharmaceutical education. Topical issues of development and research of new medicines: Proceedings of the 7th International Scientific and

Methodological Conference "Pharmaceutical Education-2018". March 28–30, 2018. Voronezh: Voronezh State University. 287–290 p. (In Russ.)

34. Grudzinskaya L., Gemejiyeva N., Karzhaubekova Zh., Nelina N. Botanical coverage of the leading families of medicinal flora of Kazakhstan. *BIO Web Conf*. 2021;31:00007. DOI: 10.1051/bioconf/20213100007.
35. Smolarz H. D. Chromatographical analysis of phenolic acids in some species of *Polygonum* L. genus. Quantitative determination of the major components by high performance liquid chromatography (HPLC). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2000;69(1):21–23.
36. Smolarz H. D. Comparative study on the free flavonoid aglycones in herbs of different species of *Polygonum* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Rescarch*. 2002;59:145–148.
37. Smolarz H. D. Flavonoids from *Polygonum lapathifolium* ssp. *tomentosum*. *Pharmaceutical Biology*. 2002;40(5):390–394.
38. Smolarz H. D. Chromatographical analysis of phenolic acids in some species of *Polygonum* L. Genus part 1 qualitative analysis by Two-Dimensional Thin Layer Chromatography (TLC). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 1999;68(4):287–290.
39. Gudkova A. A., Perova I. B., Jeller K. I., Chistjakova A. S., Slivkin A. I., Sorokina A. A. Phenolic compounds in the herb Knotweed, growing in the Voronezh region. *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2020;54(3): 37–41. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-3-37-41.
40. Chistyakova A. S., Gudkova A. A. The content of tannins in representatives of the genus *Persicaria* mill. In: From Plant to medicinal product: Proceedings of the international scientific conference. June 04–05, 2020. Moscow: Federal state budgetary scientific institution "All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants". 281–285 p. (In Russ.)
41. Luksha E. A., Korneeva I. N., Savchenko I. A., Ivanova E. V., Kalinkina G. I., Kolomiec N. E. Mineral composition of *Polygonaceae* family plants flora of Siberia. *Rastitel'nyj mir Aziatskoj Rossii*. 2018;3(31): 102–106. (In Russ.) DOI: 10.21782/RMAR1995-2449-2018-3(102-106).
42. Lazarev A. V., Nedopekina C. V. Overview of the genus *Polygonum* L. *Regional'nye geosistemy*. 2009;11(66):18–24. (In Russ.)
43. Muatasim J., Tawseef A. M., Rakesh K. K. Traditional use of medicinal plants among the indigenous communities in Baramulla district, Jammu and Kashmir, India. *Nordic Journal of Botany*. 2022;2022(6):e03387. DOI: 10.1111/njb.03387.
44. Husain F., Ahmad B., Hameed I., Dastagir G., Sanaullah P., Azam S. Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of *Polygonaceae*. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(31):5032–5036.
45. Hailemariam A., Feyera M., Deyou T., Abdissa N. Antimicrobial Chalcones from the Seeds of Persicaria lapathifolia. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*. 2018;7(1):1000237. DOI: 10.4172/2167-0501.1000237.
46. Bulbul L. Phytochemical and pharmacological evaluations of *Polygonum lapathifolium* stem extract for anthelmintic and antiemetic activity. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2013;2(3):57–62.
47. Gudkova A. A., Buzlama A. V., Slivkin A. I. Preclinical studies of pharmacological activity of *Persicaria maculosa* herb extract. *Reviews on clinical pharmacology and drug therapy*. 2019. 25 p.
48. Kim Y., Jang D.-S., Park S.-H., Yun J., Min B. K., Min K.-R., Min K., Lee H.-K. Flavonol glycoside gallate and ferulate esters from *Persicaria lapathifolia* as inhibitors of superoxide production in human monocytes stimulated by unopsonized zymosan. *Planta Medica*. 2009;6(01):72–74. DOI: 10.1055/s-0029-1243112.
49. Seimandi G., Alvarez N., Stegmayer M. I., Fernandez L., Ruiz V., Favaro M. A., Derita M. An Update on Phytochemicals and Pharmacological Activities of the Genus *Persicaria* and *Polygonum*. *Molecules*. 2021;26(19):5956. DOI: 10.3390/molecules26195956.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-104-110
УДК 61:615.014

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Оценка подлинности клеточных линий с помощью RTCA-профилирования для экспертизы качества препаратов на основе жизнеспособных клеток человека

М. А. Водякова✉, О. А. Рачинская, Н. С. Покровский, И. С. Семенова, Е. В. Мельникова, В.А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Водякова Марина Андреевна. **E-mail:** vod-marina@mail.ru

ORCID: М. А. Водякова – http://orcid.org/0000-0002-6008-0554; О. А. Рачинская – http://orcid.org/0000-0001-8377-9205; Н. С. Покровский – http://orcid.org/0000-0002-2355-0879; И. С. Семенова – http://orcid.org/0000-0001-9026-0508; Е. В. Мельникова – http://orcid.org/0000-0002-9585-3545; В. А. Меркулов – http://orcid.org/0000-0003-4891-973X.

Статья поступила: 06.04.2022 **Статья принята в печать:** 10.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Одним из важных показателей качества препаратов на основе жизнеспособных клеток человека, определяемых в рамках экспертизы качества, является подлинность. Характеристика подлинности включает в том числе определение пролиферативной активности клеточной линии, входящей в состав таких препаратов. Для оценки пролиферативной активности клеток может быть использован прибор xCELLigence RTCA DP (Agilent Technologies, США), который представляет собой клеточный анализатор в режиме реального времени (RTCA), позволяющий проводить непрерывный анализ *in vitro* без использования меток.

Цель. Показать воспроизводимость методики RTCA-профилирования в качестве метода первичной оценки подлинности клеточных линий.

Материалы и методы. Получали RTCA-профили клеточных линий дермальных фибробластов DF-2 и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани МСК ЖТ_D122 с помощью клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP (Agilent Technologies, США). Эксперимент проводили после размораживания трех разных флаконов одной партии каждой клеточной линии в трех повторах.

Результаты и обсуждение. Получены RTCA-профили для клеточных линий DF-2 и МСК ЖТ_D122. Статистическая обработка результатов анализа проведена при использовании критерия Фридмана, доверительных интервалов и параметров кривых роста, полученных с помощью прибора (время удвоения, скорость пролиферации и максимальный клеточный индекс). На основании полученных данных было показано отсутствие различий RTCA-профилей для каждой клеточной линии при параллельном взятии материала из трех флаконов.

Заключение. Обоснована и показана воспроизводимость методики RTCA-профилирования для оценки применимости клеточного анализатора при подтверждении подлинности клеточных линий.

Ключевые слова: клеточная линия, подлинность, экспертиза качества, биомедицинский клеточный продукт, высокотехнологический лекарственный препарат

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

Вклад авторов. М. А. Водякова и Е. В. Мельникова придумали, разработали эксперимент и написали текст статьи. М. А. Водякова, О. А. Рачинская и И. С. Семенова провели исследование. М. А. Водякова и Н. С. Покровский участвовали в обработке данных. В. А. Меркулов консультировал по полученным результатам. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и внесли вклад в окончательный текст рукописи.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Для цитирования: Водякова М. А., Рачинская О. А., Покровский Н. С., Семенова И. С., Мельникова Е. В., Меркулов В. А. Оценка подлинности клеточных линий с помощью RTCA-профилирования для экспертизы качества препаратов на основе жизнеспособных клеток человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):104–110. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-104-110

Evaluation of Cell Line Identity Using RTCA Profiling for Quality Control of Products Containing Viable Human Cells

Marina A. Vodyakova✉, Olga A. Rachinskaya, Nikita S. Pokrovsky, Irina S. Semenova, Ekaterina V. Melnikova, Vadim A. Merkulov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2, Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russia

✉ **Corresponding author:** Marina A. Vodyakova. **E-mail:** vod-marina@mail.ru

ORCID: Marina A. Vodyakova – http://orcid.org/0000-0002-6008-0554; Olga A. Rachinskaya – http://orcid.org/0000-0001-8377-9205; Nikita S. Pokrovsky – http://orcid.org/0000-0002-2355-0879; Irina S. Semenova – http://orcid.org/0000-0001-9026-0508; Ekaterina V. Melnikova – http://orcid.org/0000-0002-9585-3545; Vadim A. Merkulov – http://orcid.org/0000-0003-4891-973X.

Received: 06.04.2022 **Revised:** 10.07.2023 **Published:** 25.08.2023

© Водякова М. А., Рачинская О. А., Покровский Н. С., Семенова И. С., Мельникова Е. В., Меркулов В. А., 2023
© Vodyakova M. A., Rachinskaya O. A., Pokrovsky N. S., Semenova I. S., Melnikova E. V., Merkulov V. A., 2023

Abstract
Introduction. Identity is an important quality attribute of products containing viable human cells, to be tested during the quality control. The verification of identity includes, among other things, determination of the proliferative activity of the cell lines included in such products. The Agilent xCELLigence real-time cell analysis (RTCA) DP (dual purpose) instrument (USA) for continuous, label-free *in vitro* analysis can be used to assess the cell proliferative activity.
Aim. Demonstration of reproducibility of the RTCA profiling technique as a test method for primary verification of the cell line identity.
Materials and methods. An xCELLigence RTCA DP cell analyzer (Agilent Technologies, USA) was used to obtain RTCA profiles of dermal fibroblast (DF-2) and adipose tissue-derived mesenchymal stromal (MSC AT_D122) cell lines. The experiment was carried out in triplicate after thawing three different vials from the same batch for each cell line.
Results and discussion. The RTCA profiles were obtained for DF-2 and MSC AT_D122 cell lines. The statistical processing of the results was carried out using the Friedman test, confidence intervals, and growth curve parameters obtained by the instrument (doubling time, proliferation rate, and maximum cell index). The obtained data demonstrate no differences in the RTCA profiles after parallel sampling of the contents from three vials for each cell line.
Conclusion. The RTCA profiling reproducibility was confirmed in order to assess the cell analyzer's applicability to cell line identity.

Keywords: cell line, identity, quality control, biomedical cell product, high-tech drug

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

Contribution of the authors. Marina A. Vodyakova and Ekaterina V. Melnikova elaborated and designed the experiment and wrote the text of the article. Marina A. Vodyakova, Olga A. Rachinskaya, and Irina S. Semenova performed the experiment. Marina A. Vodyakova and Nikita S. Pokrovsky took part in the data processing. Vadim A. Merkulov provided advice on the results obtained. All the authors took part in the discussions of the article and contributed to the final text of the article.

Acknowledgment. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

For citation: Vodyakova M. A., Rachinskaya O. A., Pokrovsky N. S., Semenova I. S., Melnikova E. V., Merkulov V. A. Evaluation of cell line identity using RTCA profiling for quality control of products containing viable human cells. *Drug development & registration*. 2023;12(3):104–110. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-104-110

ВВЕДЕНИЕ

Строгий контроль качества необходим для получения клеточных линий (КЛ) с постоянными характеристиками во всех сериях препаратов на основе жизнеспособных клеток человека (биомедицинские клеточные продукты[1] и высокотехнологичные лекарственные препараты[2]) при производстве, в ходе проведения экспертизы качества, а также на стадии проведения доклинических и клинических исследований.

Сложный состав препаратов на основе жизнеспособных клеток человека предписывает необходимость особых подходов к определению характеристик качества КЛ, поэтому актуальным является внедрение новых методик, позволяющих определить тот или иной показатель (или комплекс показателей) при минимальной обработке КЛ.

Одной из таких методик может быть RTCA-профилирование (real-time cell analysis), выполненное с помощью клеточного анализатора в режиме реального времени xCELLigence. Принцип работы прибора заключается в измерении клеточного индекса (CI), пропорционального прикреплению клеток к поверхности электродов. Преимуществами методики являются неинвазивность измерений, возможность получать RTCA-профиль практически любой КЛ и фиксировать любые его изменения (например, при возникновении микробиологической, вирусной контаминации) [1–3].

В настоящее время публикации о применении RTCA-профилирования для контроля качества представлены в ограниченном количестве [4, 5], а для оценки подлинности КЛ не представлены вовсе. Таким образом, RTCA-анализ можно предложить в качестве метода первичной оценки подлинности КЛ при контроле качества препаратов на основе жизнеспособных клеток человека, позволяющего провести

[1] В соответствии с Федеральным законом от 23.06.2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Доступно по: https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/23/stranitsa-967/federalnyy-zakon-ot-23-iyunya-2016-g-180-fz-o-biomeditsinskih-kletochnyh-produktah. Ссылка активна на 08.06.2022.

[2] В соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 (ред. от 17.03.2022) «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01431480/err_18032022_36. Ссылка активна на 08.06.2022.

анализ подлинности КЛ на основе сравнения их RTCA-профилей.

Цель работы – показать воспроизводимость методики RTCA-профилирования в качестве метода первичной оценки подлинности КЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеточных линий

Клеточная линия DF-2 (дермальные фибробласты человека) была получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККПК) – Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН. Клеточная линия МСК ЖТ_D122 (мезенхимальные стромальные клетки из жировой ткани) была получена из «Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» (уникальная научная установка) Института биологии развития им. Н. К. Кольцова Российской академии наук (ККК УНУ ИБР РАН).

Клетки DF-2 культивировали в среде DMEM/F-12 (Gibco, США) с содержанием 10%-й эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), 1%-го пенициллин-стрептомицина (Gibco, США). Культивирование МСК ЖТ_D122 осуществляли в среде DMEM/F-12 (Gibco, США) с содержанием 10%-го FBS (HyClone, США) и 2 мМоль L-аланин-L-глутамина (Gibco, США), 1% пенициллин-стрептомицина (Gibco, США). Клетки культивировали в условиях 5,0%-го CO_2 при 37 °C и влажности 90 %. Работа с клеточными линиями осуществлялась на 12 пассаже.

RTCA-профилирование

Определение пролиферативной активности проводили с помощью клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP (Agilent Technologies, США), который был помещен в CO_2-инкубатор (NuAire, Inc., США). Анализ выполнялся с использованием 16-луночных планшетов E-Plate (Agilent Technologies, США). Для получения фоновых показаний в каждую лунку вносили 100 мкл среды и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Далее на первом этапе вносили 100 мкл DF-2 и МСК ЖТ_D122 в диапазоне от 2500 до 20000 клеток/лунка, на втором этапе – 100 мкл каждой клеточной линии в концентрации 2500 клеток/лунка. В качестве контроля в лунки вносили среду с 10%-го FBS. Оставляли E-plate при комнатной температуре, затем загружали в анализатор и фиксировали CI на протяжении 120 ч следующим образом: каждые 15 мин – первые 4 ч, каждые 30 мин – все остальное время. Каждую концентрацию клеток измеряли в трех повторах. Эксперимент был проведен после размораживания трех разных флаконов одной партии каждой КЛ в трех повторах.

CI, время удвоения (DT), рассчитываемое исходя из логарифмической фазы роста (ЛОГ), и параметр Slope рассчитывали автоматически с помощью программного обеспечения для клеточного анализатора.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с использованием программы OriginPro (v. 2021) (OriginLab Corporation, США). Проверку гипотезы о нормальности распределения проводили с помощью критерия Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для оценки статистической значимости различий выборок количественных данных использовали непараметрический аналог ANOVA – ранговый дисперсионный анализ Фридмана и анализ доверительных интервалов. Все различия считали статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$. Все данные были представлены в виде среднего значения (mean) ± стандартное отклонение (SD), $n = 3$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку на сегодняшний день на территории Российской Федерации не зарегистрировано ни одного препарата на основе жизнеспособных клеток человека, для проведения исследования в качестве модельных были выбраны две КЛ, которые применялись в медицинской практике в рамках новых медицинских технологий или входят в состав ранее зарегистрированных препаратов за рубежом[1, 2, 3] [6, 7].

Для оценки воспроизводимости методики были проанализированы RTCA-профили двух КЛ после размораживания трех разных флаконов одной партии на 12 пассаже. Данные представлены на рисунке 1.

На первом этапе (рисунок 1, А) получали RTCA-профили для каждой КЛ в диапазоне различных концентраций. Можно отметить, что обе КЛ имеют характерный профиль в период лаг-фазы (ЛАГ), особенно заметный на больших концентрациях и в случае DF-2 показывающий CI_{max} при концентрации 20 000 клеток/лунка. CI_{max} представляет собой CI, при котором клетки достигают полного монослоя и максимального прикрепления. Можно предположить, что такой эффект в фазе прикрепления обусловлен бо-

[1] Apligraf. Available at: http://www.apligraf.com/. Accessed: 01.10.2021.

[2] LAVIV. Highlights of prescribing information. Available at: https://www.fda.gov/media/80838/download. Accessed: 01.10.2021.

[3] EMA/1380/2018. Alofisel (darvadstrocel). European Medicines Agency, 2017. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/alofisel-epar-summary-public_en.pdf. Accessed: 01.10.2021.

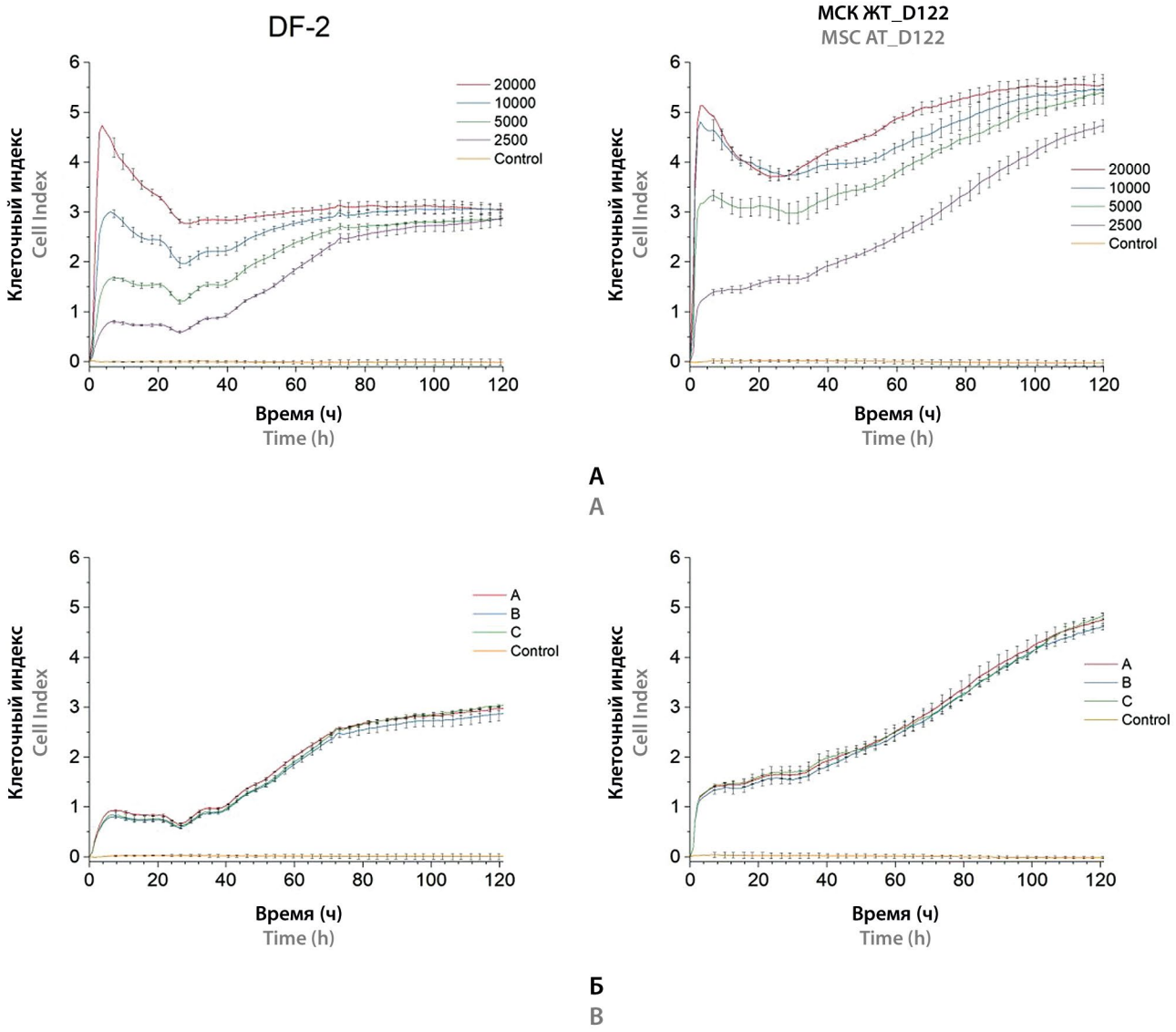


Рисунок 1. **RTCA-профилирование клеточных линий DF-2 (слева) и МСК ЖТ_D122 (справа).**

А – RTCA-профили каждой клеточной линии в диапазоне различных концентраций; Б – RTCA-профили клеточных линий в концентрации 2500 клеток/лунка для флаконов A, B и C. Данные представлены в виде mean ± SD, *n* = 3

Figure 1. **RTCA profiling of DF-2 (left) and MSC AT_D122 (right) cell lines.**

A – RTCA profiles of each cell line in a range of different concentrations; B – RTCA profiles of cell lines at 2500 cells/well for vials A, B and C. Data are presented as mean ± SD, *n* = 3

лее крупными размерами клеток в неприкрепленном состоянии по сравнению с прикрепленными и снижается по мере прикрепления.

Для дальнейшей оценки воспроизводимости методики была выбрана концентрация 2500 клеток/лунка для обеих КЛ. На втором этапе в данной концентрации в E-plate засевали каждую КЛ из трех разных флаконов (рисунок 1, Б). Полученные RTCA-профили были количественно проанализированы при помощи критерия Фридмана, который показал различия ($p < 0,05$). При этом полученный результат не подтверждается при анализе доверительных интервалов, которые совпадают при построении как для всей кривой (рисунок 2, А), так и конкретно для лаг- и лог-фаз (рисунок 2, Б). Различия, полученные на основании критерия Фридмана, могут быть обусловлены малым количеством RTCA-профилей. Для более достоверной количественной оценки в будущем необходимо провести сравнение с кривыми роста, полученными на другом пассаже.

Кроме того, RTCA-профили для каждого флакона у одной КЛ были схожи по следующим параметрам: DT (интервал 39–73 ч – для DF-2 и 54–108 ч – для МСК ЖТ_D122) (рисунок 3, А), CI_{max} (рисунок 3, Б)

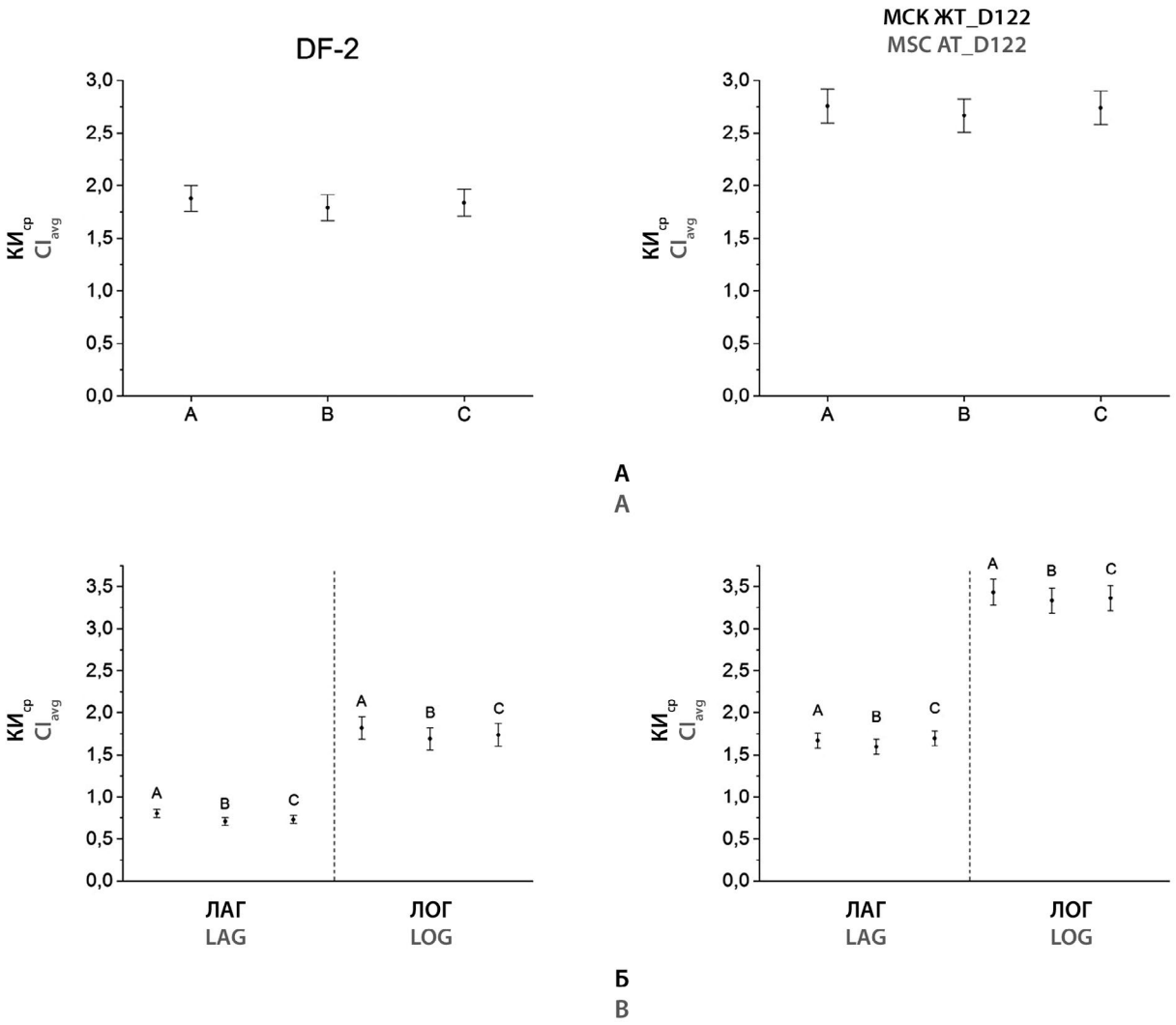


Рисунок 2. Доверительные интервалы для клеточного индекса, рассчитанные:
А – за весь промежуток времени (120 ч); Б – для лаг- и лог-фаз для флаконов A, B и C

Figure 2. Confidence intervals for cell index calculated:
A – for the entire time interval (120 h); B – for lag and log phases for vials A, B and C

и Slope (рисунок 3, В). DT в среднем для всех трех флаконов для DF-2 составляло около 24,5 ч, для МСК ЖТ_D122 – в 2,2 раза больше (54,2 ч). Параметр Slope представляет собой тангенс угла наклона кривой изменения CI и характеризует скорость пролиферации клеток. Для DF-2 усредненный Slope был равен 0,025, а для МСК ЖТ_D122 – 0,032. Несмотря на то, что DT у МСК ЖТ_D122 дольше, скорость пролиферации выше. CI_{max} для DF-2 в среднем достигал 3, для МСК ЖТ_D122 – 4,7, что примерно в 1,5 раза больше, чем у DF-2.

Таким образом, совпадение доверительных интервалов, оценка параметров (DT, Slope и CI_{max}) и визуальная оценка RTCA-профилей для трех параллелей одной и той же КЛ позволяют утверждать, что достоверные различия отсутствуют. Кроме того, несмотря на то, что дермальные фибробласты по своим характеристикам близки к МСК [8], необходимо отметить, что их RTCA-профили и оцененные параметры значительно различаются, что подтверждает возможность использования методики для первичной оценки подлинности КЛ в составе препаратов на основе жизнеспособных клеток человека при экспертизе качества. Совместно с фенотипическим или генотипическим тестированием данная методика может быть использована для подтверждения подлинности и качества КЛ в составе таких препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обоснована и показана воспроизводимость методики RTCA-профилирования для оценки применимости клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP (Agilent Technologies, США) при подтверждении под-

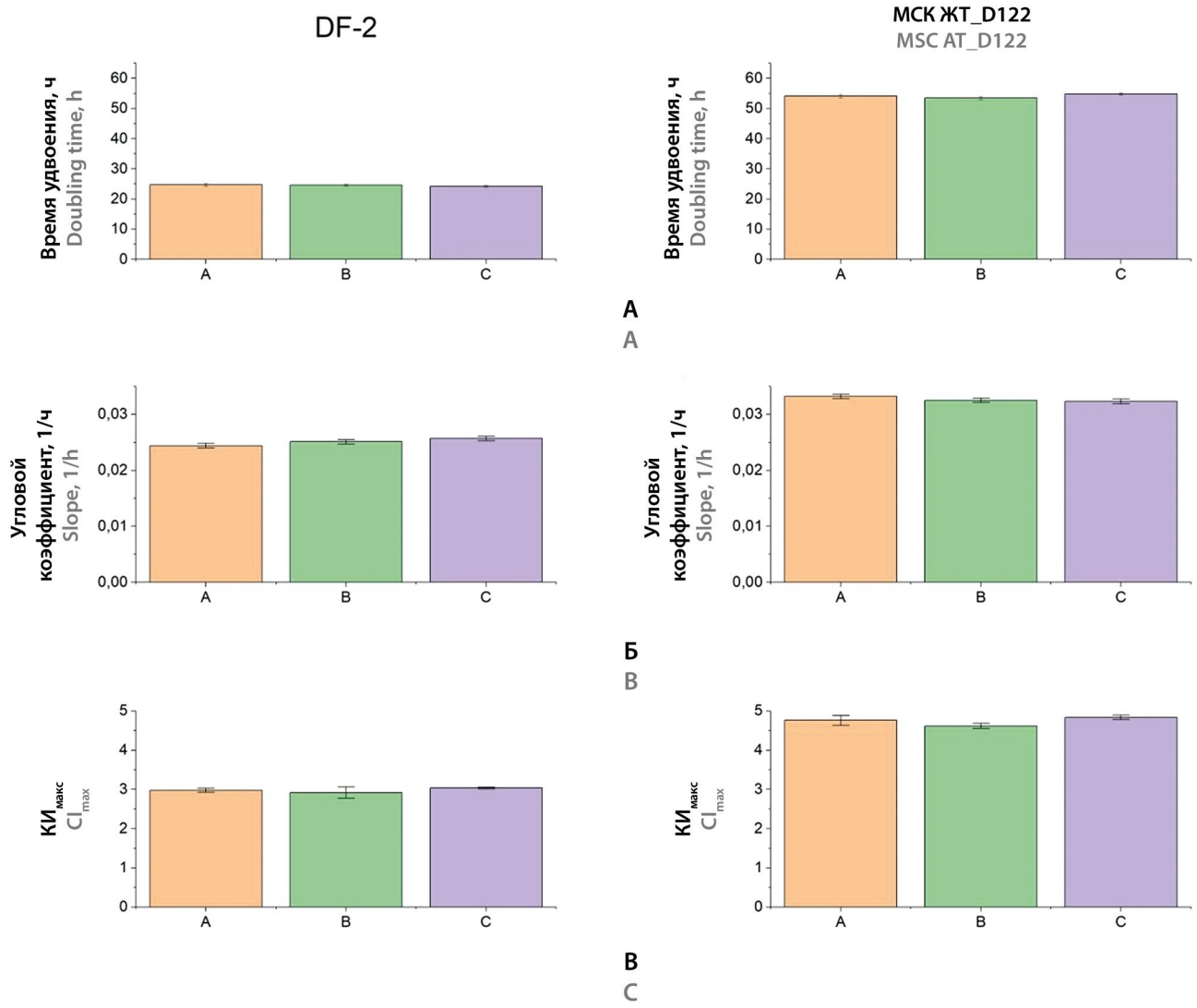


Рисунок 3. Параметры RTCA-профилей

А – время удвоения, рассчитанное за период логарифмической фазы (39–73 ч для DF-2 и 54–108 ч для МСК ЖТ_D122); Б –угловой коэффициент, рассчитанный за 120 ч, для флаконов A, B и C; В – максимальный клеточный индекс за 120 ч для флаконов A, B и C. Данные представлены в виде mean ± SD, *n* = 3

Figure 3. RTCA profiles parameters

A – Doubling time calculated over the period of the logarithmic phase (39–73 h for DF-2 and 54–108 h for MSC AT_D122); B – Slope calculated over 120 h for vials A, B, and C; C – maximum cell index over 120 h for vials A, B and C. Data are presented as mean ± SD, *n* = 3

линности КЛ. Получены уникальные кинетические профили КЛ DF-2 и МСК ЖТ_D122 после размораживания разных флаконов одной партии на 12 пассаже в концентрации 2500 клеток/лунка на протяжении 120 ч. Показано отсутствие различий между RTCA-профилями для каждой КЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xi B., Yu N., Wang X., Xu X., Abassi Y. A. The application of cell-based label-free technology in drug discovery. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*. 2008;3(4):484–495. DOI: 10.1002/biot.200800020.
2. Langenbach K. ATCC technology assessment of Roche xCELLigence System: an electronic impedance-based cell sensing unit. *BioTechniques*. 2010;49(6):905–906. DOI: 10.2144/000113575.
3. Hillger J. M., Lieuw W. L., Heitman L. H., IJzerman A. P. Label-free technology and patient cells: from early drug development to precision medicine. *Drug discovery today*. 2017;22(12):1808–1815. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.07.015.
4. Irelan J. T., Wu M.-J., Morgan J., Ke N., Xi B., Wang X., Xu X., Abassi Y. A. Rapid and quantitative assessment of cell quality, identity, and functionality for cell-based assays using real-time cellular analysis. *Journal of biomolecular screening*. 2011;16(3):313–322. DOI: 10.1177/1087057110397359.
5. Guimet D., Jin C., Abassi Y. A. Real-Time Quality Control and Functional Assessment of Mesenchymal Stem Cells for Cellular Therapies. Santa Clara: Agilent Technologies, Inc.; 2019. Available

at: https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-mesenchymal-stem-cells-xcelligence-5994-1067en-agilent.pdf.
6. Петручук Е. М., Шалунова Н. В., Олефир Ю. В., Борисевич И. В., Перекрест В. В., Шевцов В. А., Рукавишников А. В., Хантимирова Л. М. Культуры клеток в заместительной терапии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2017;17(4):197–206.
7. Мельникова Е. В., Меркулова О. В., Борисевич И. В., Меркулов В. А. От клеточных технологий к биомедицинским клеточным продуктам: опыт использования препаратов на основе жизнеспособных клеток человека в Российской Федерации. *Цитология*. 2018;60(4):231–240. DOI: 10.31116/tsitol.2018.04.01.
8. Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Кольцова А. М., Кропачева И. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. Получение и характеристика неиммортализованных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста. *Цитология.* 2016;58(11):850–864.

REFERENCES

1. Xi B., Yu N., Wang X., Xu X., Abassi Y. A. The application of cell-based label-free technology in drug discovery. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology.* 2008;3(4):484–495. DOI: 10.1002/biot.200800020.
2. Langenbach K. ATCC technology assessment of Roche xCELLigence System: an electronic impedance-based cell sensing unit. *BioTechniques*. 2010;49(6):905–906. DOI: 10.2144/000113575.
3. Hillger J. M., Lieuw W. L., Heitman L. H., IJzerman A. P. Label-free technology and patient cells: from early drug development to precision medicine. *Drug discovery today.* 2017;22(12):1808–1815. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.07.015.
4. Irelan J. T., Wu M.-J., Morgan J., Ke N., Xi B., Wang X., Xu X., Abassi Y. A. Rapid and quantitative assessment of cell quality, identity, and functionality for cell-based assays using real-time cellular analysis. *Journal of biomolecular screening.* 2011;16(3):313–322. DOI: 10.1177/1087057110397359.
5. Guimet D., Jin C., Abassi Y. A. Real-Time Quality Control and Functional Assessment of Mesenchymal Stem Cells for Cellular Therapies. Santa Clara: Agilent Technologies, Inc.; 2019. Available at: https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-mesenchymal-stem-cells-xcelligence-5994-1067en-agilent.pdf.
6. Petruchuk E. M., Shalunova N. V., Olefir Yu. V., Borisevich I. V., Perekrest V. V., Shevtsov V. A., Rukavishnikov A. V., Khantimirova L. M. Cell cultures in replacement therapy. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):197–206. (In Russ.)
7. Melnikova E. V., Merkulova O. V., Borisevich I. V., Merkulov V. A. From cellular technologies to biomedical cell products: practice in the use of drugs based on viable human cells in the russian federation. *Citologija*. 2018;60(4):231–240. (In Russ.) DOI: 10.31116/tsitol.2018.04.01.
8. Krylova T. A., Musorina A. S., Zenin V. V., Koltsova A. M., Kropacheva I. V., Turilova V. I., Yakovleva T. K., Poljanskaya G. G. Derivation and characteristic of a non-immortalized cell lines of human dermal fibroblasts, generated from skin of the eyelids of adult donors of different age. *Citologija.* 2016;58(11):850–864. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-111-117
УДК 581.45 + 615.322

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Сравнительное изучение анатомо-диагностических признаков листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.), ежевики аллеганской (*R. allegheniensis* Porter) и ежевики несской (*R. nessensis* Hall)

М. Б. Ильина[1]✉, Е. В. Сергунова[1], Н. В. Бобкова[1, 2]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). Факультет фундаментальной медицины. 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1

✉ **Контактное лицо:** Ильина Маргарита Борисовна. **E-mail:** rita221096@yandex.ru

ORCID: М. Б. Ильина – http://orcid.org/0000-0003-1989-4545; Е. В. Сергунова – http://orcid.org/0000-0002-7194-5525; Н. В. Бобкова – http://orcid.org/0000-0003-1591-4019.

Статья поступила: 01.03.2023 **Статья принята в печать:** 14.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Расширение номенклатуры фармацевтических субстанций, в том числе растительного происхождения, является одной из задач развития фармацевтической отрасли. Примером перспективного и доступного лекарственного растительного сырья могут служить листья ежевики сизой, обладающие доказанной противовоспалительной, гипогликемической, антимикробной активностью. Производящее растение – ежевика сизая (*Rubus caesius*) относится к роду *Rubus*, включающему множество видов, зачастую трудноразличимых между собой. Для полной фармакогностической характеристики лекарственного растительного сырья необходимо проведение микроскопического исследования.

Цель. провести сравнительный микроскопический анализ листьев ежевики сизой (*R. caesius* L.), ежевики аллеганской (*R. allegheniensis* Porter) и ежевики несской (*R. nessensis* Hall) для установления анатомо-диагностических признаков.

Материалы и методы. Образцы листьев собраны на территории Москвы и Московской области в 2021–2022 гг. Анализ микроскопических структур проводился на световом микроскопе Leica DM1000 (Германия) с окуляром 10x/20 и объективами 10x/0,25 и 40x/0,65.

Результаты и обсуждение. Проведен сравнительный анализ анатомо-диагностических структур листьев ежевики сизой и близких ей видов. Были исследованы размер и частота встречаемости на 1 мм^2 простых и железистых волосков и устьиц, установлен тип устьичного аппарата, рассмотрены форма клеток эпидермы и кристаллические включения в мезофилле.

Заключение. В результате проведенного исследования были выявлены различия в анатомических структурах листьев трех видов ежевики. Установлены анатомо-диагностические признаки листьев ежевики сизой, являющиеся показателями подлинности данного сырья, среди которых: наличие простых одноклеточных, сросшихся у основания волосков, обильное опушение листьев (особенно на нижней эпидерме), большое количество устьиц (106 ± 37 на 1 мм^2), извилистая форма эпидермальных клеток, кубические кристаллы оксалата кальция в мезофилле.

Ключевые слова: *Rubus caesius* L., *R. allegheniensis* Porter, *R. nessensis* Hall, ежевика сизая, ежевика аллеганская, ежевика несская, листья ежевики, микроскопический анализ

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

Вклад авторов. М. Б. Ильина и Н. В. Бобкова осуществляли заготовку и сушку сырья. М. Б. Ильина провела сравнительный микроскопический анализ, статистическую обработку данных, подготовила текст статьи. Е. В. Сергунова и Н. В. Бобкова приняли участие в обсуждении результатов, предоставили консультативную помощь в подготовке окончательной версии рукописи.

Для цитирования: Ильина М. Б., Сергунова Е. В., Бобкова Н. В. Сравнительное изучение анатомо-диагностических признаков листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.), ежевики аллеганской (*R. allegheniensis* Porter) и ежевики несской (*R. nessensis* Hall). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):111–117. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-111-117

Comparative Study of Anatomical and Diagnostic Features of the Leaves of the European Dewberry (*Rubus caesius* L.), Allegheny Blackberry (*R. allegheniensis* Porter) and European Blackberry (*R. nessensis* Hall)

Margarita B. Ilina[1]✉, Ekaterina V. Sergunova[1], Natalia V. Bobkova[1, 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] Lomonosov Moscow State University. Faculty of Fundamental Medicine. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia

✉ **Corresponding author:** Margarita B. Ilina. **E-mail:** rita221096@yandex.ru

ORCID: Margarita B. Ilina – http://orcid.org/0000-0003-1989-4545; Ekaterina V. Sergunova – http://orcid.org/0000-0002-7194-5525; Natalia V. Bobkova – http://orcid.org/0000-0003-1591-4019.

Received: 01.03.2023 **Revised:** 14.08.2023 **Published:** 25.08.2023

© Ильина М. Б., Сергунова Е. В., Бобкова Н. В., 2023
© Ilina M. B., Sergunova E. V., Bobkova N. V., 2023

Abstract
Introduction. Expansion of the nomenclature of raw materials, including herbal substances, is one of the tasks of the development of the pharmaceutical industry. As an example of a potential and affordable medicinal plant raw material, we can offer the leaves of European dewberry with a proven anti-inflammatory, hypoglycemic, antimicrobial activity. Medicinal plant – European dewberry (*Rubus caesius* L.) belongs to the genus *Rubus* L., which includes many species, often difficult to distinguish between each other. For complete pharmacognostic characteristics of medicinal plant raw materials, microscopic examination is necessary.
Aim. To carry out a comparative microscopic analysis of the leaves of *R. caesius* L., *R. allegheniensis* Porter and *R. nessensis* Hall to establish anatomical and diagnostic characters.
Materials and methods. Leaf samples were collected on the territory of Moscow and the Moscow region in 2021-2022. Microscopic structures were analyzed using a Leica DM1000 light microscope (Germany) with a 10x/20 eyepiece and 10x/0.25 and 40x/0.65 lenses.
Results and discussion. A comparative analysis of the anatomical and diagnostic structures of the leaves of the *Rubus caesius* L. (European dewberry) and its related species has been carried out. The size and frequency of occurrence per 1 mm^2 of simple and glandular hairs and stomata were investigated, the type of stomatal apparatus was established, the shape of epidermal cells and crystalline inclusions in the mesophyll were considered.
Conclusion. As a result of the study, differences in the anatomical structures of the leaves of three types of blackberries were revealed. Anatomical and diagnostic characters of *Rubus caesius* L. leaves have been established, which are indicators of the identification of this raw material, including: the presence of simple one-celled fused at the base trichomes, abundant leaf pubescence (especially on the abaxial epiderm), a large number of stomata (106 ± 37 per 1 mm^2), the sinuous shape of epidermal cells, cubic crystals of calcium oxalate in the mesophyll.

Keywords: *Rubus caesius* L., *R. allegheniensis* Porter, *R. nessensis* Hall, European dewberry, Allegheny blackberry, European blackberry, blackberry leaves, microscopic 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. Margarita B. Ilina and Natalia V. Bobkova carried out the harvesting and drying of raw materials. Margarita B. Ilina conducted a comparative microscopic analysis, statistical data processing, prepared the text of the article. Ekaterina V. Sergunova and Natalia V. Bobkova participated in the discussion of the results, provided advisory assistance in preparing the final version of the manuscript.

For citation: Ilina M. B., Sergunova E. V., Bobkova N. V. Comparative study of anatomical and diagnostic features of the leaves of the European dewberry (*Rubus caesius* L.), Allegheny blackberry (*R. allegheniensis* Porter) and European blackberry (*R. nessensis* Hall). *Drug development & registration*. 2023;12(3):111–117. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-111-117

ВВЕДЕНИЕ

Род *Rubus* L. – один из многочисленных в семействе розоцветных (Rosaceae), включает 12 подродов, из которых наиболее крупным, насчитывающим 132 вида, является ежевика *Rubus* (= *Eubatus* Focke)[1] [1, 2].

В средней полосе России в естественных условиях встречаются 2 аборигенных вида ежевики – сизая и несская, а также заносные – одичавшие культурные формы ежевики аллеганской и канадской[2, 3, 4] [3].

Общеизвестно пищевое использование плодов ежевики. Вместе с тем вызывает интерес лекарственное использование различных частей этого растения.

Имеются исследования, доказывающие антиоксидантную активность плодов [4], листьев [5–7], почек [8] ежевики. За счет этого сырье ежевики проявляет цитопротекторную, в частности нейропротекторную, активность. Показано, что прием плодов ежевики снижает маниакальные эпизоды [4], улучшает когнитивные функции [9]. Галловая кислота, содержащаяся в плодах, обуславливает противоопухолевую активность сырья [10]. Также плоды и листья ежевики проявляют противовоспалительную активность [4, 5, 9]. Изучение химического состава показало наличие в листьях ежевики веществ флавоноидной природы – гиперозида, изокверцетина, астрагалина, рутина [7, 11]. Плоды богаты антоцианами, в частности цианидин-3-0-гликозидом. Выделенные в чистом виде из плодов ежевики антоцианы способствовали снижению развития ожирения [16]. Была исследована и доказана антимикробная активность сырья ежевики в отношении *Lactobacillus* spp., *Candida* spp. [5], *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sporogenes*[5], *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis* [8]. Помимо прочего, имеются сведения о способности плодов и листьев ежевики снижать резистентность клеток к инсулину и проявлять гипогликемическую активность [9, 11]. Показана также

[1] *Rubus caesius* L. Plants of the World Online. Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Available at: https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:735608-1. Accessed: 22.11.2022.

[2] *Rubus caesius* L. Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. Доступно по: https://www.plantarium.ru/page/view/item/32580.html. Ссылка активна на 12.10.2022.

[3] *Rubus nessensis* Hall. Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. Доступно по: https://www.plantarium.ru/page/view/item/32642.html. Ссылка активна на 05.11.2022.

[4] *Rubus allegheniensis* Porter. Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. Доступно по: https://www.plantarium.ru/page/view/item/60360.html. Ссылка активна на 05.11.2022.

[5] *Rubus nessensis* Hall. Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. Доступно по: https://www.plantarium.ru/page/view/item/32642.html. Ссылка активна на 05.11.2022.

противодиарейная активность за счет содержания в сырье дубильных веществ [9].

Таким образом, изучение листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) как нового перспективного источника фармацевтических субстанций является весьма актуальным.

Всестороннее фармакогностическое исследование лекарственного растительного сырья предполагает проведение микроскопического анализа как исследуемого вида, так и родственных видов в сравнительном аспекте для решения вопросов идентификации и установления характеристик подлинности.

Целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ анатомо-диагностических признаков листьев ежевики сизой (*R. caesius* L.), ежевики несской (*R. nessensis* Hall) и ежевики аллеганской (*R. allegheniensis* Porter).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили листья ежевики трех видов: *Rubus caesius* L. (ежевика сизая), *Rubus nessensis* Hall (ежевика несская), *Rubus allegheniensis* Porter (ежевика аллеганкая), – собранные с побегов первого и второго года в 2021–2022 гг. Заготовка листьев ежевики сизой и ежевики несской производилась на территории Московской области, г. Химки, 55,96852° с.ш. 37,28119° в.д. и 55,96457° с.ш. 37,28181° в.д. соответственно. Листья ежевики аллеганской заготавливались на территории г. Москвы, поселение Роговское, 55,237761° с.ш. 37,036856° в.д. Листья подвергались воздушно-теневой сушке.

Микроскопический анализ проводился согласно ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XIV издания [14]. Исследовались микропрепараты листа с поверхности. В качестве просветляющей жидкости использовался 2,5%-й раствор NaOH. Анатомо-диагностические признаки листьев изучались с помощью микроскопа Leica DM1000 (Германия) с окуляром 10x/20 и объективами 10x/0,25 и 40x/0,65. Вывод изображения на экран осуществлялся через программу Leica LAS v4.13 Software.

Статистическая обработка полученных данных проводилась в программе Excel (ver. 2016, Microsoft, США). Данные в таблицах представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Данные на рисунках представлены в виде медианы, среднего значения и процентилей (25 %, 75 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При исследовании микропрепарата листа с поверхности были рассмотрены следующие анатомо-диагностические структуры:

- трихомы, включающие простые и железистые (головчатые) волоски;
- устьичный комплекс;
- клетки эпидермы;
- кристаллические включения мезофилла.

Для листьев всех трех видов ежевики характерно наличие простых одноклеточных волосков, среди которых на листьях ежевики сизой (*R. caesius* L.) и ежевики несской (*R. nessensis* Hall) можно выделить более длинные (до 1 мм) с округлым основанием и меньшего размера (до 500 мкм) с расширенным, почти треугольным по форме основанием (рисунок 1). На нижней эпидерме листьев ежевики сизой присутствуют простые одноклеточные, сросшиеся по 2 или 4 у основания волоски (рисунок 2), что является отличительной чертой данного вида.

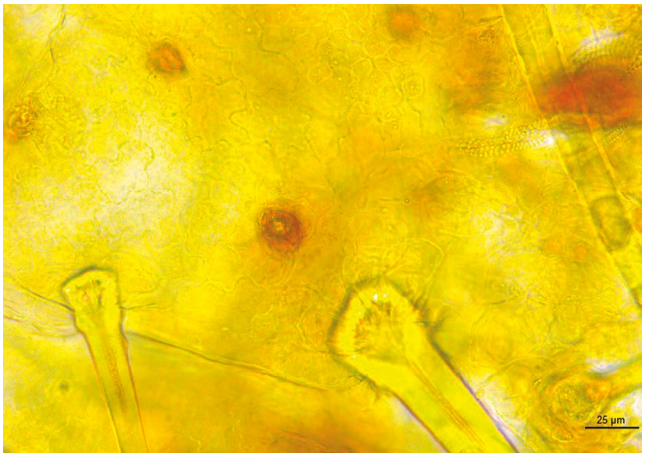


Рисунок 1. *R. caesius* L. Разные основания простых одноклеточных волосков листьев (окуляр x40)

Figure 1. *R. caesius* L. Different bases of simple one-celled trichomes of the leaves (40x lense)

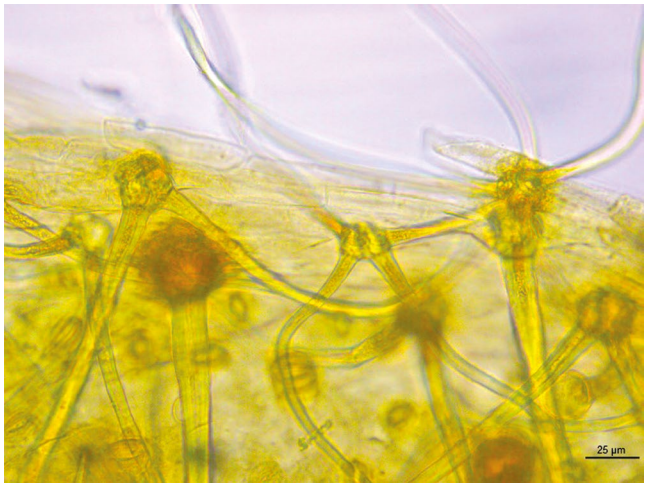


Рисунок 2. *R. caesius* L. Эпидермис нижней стороны листа. Простые, сросшиеся у основания волоски (окуляр x40)

Figure 2. *R. caesius* L. Abaxial epiderm of the leaf. Simple, fused at the base trichomes (40x lense)

При рассмотрении микропрепаратов также обнаружены железистые (головчатые) волоски (рисунок 3), располагающиеся преимущественно по жилке. Для листьев ежевики сизой характерно наличие небольших железистых волосков с широкой округлой прозрачной головкой, с многоклеточной одно- или двурядной ножкой. Головчатые волоски листьев ежевики аллеганской и несской более разнообразны по форме и размеру. Среди них можно выделить окрашенные длинные прямые или извилистые с маловыраженной головкой, короткие с широкой прозрачной головкой, однорядные, двухрядные. Самые крупные железистые волоски присущи листьям ежевики аллеганской, однако встречаются они с меньшей частотой, чем на листьях других видов.

Полученные данные относительно размеров простых и железистых волосков и частоты их встречаемости на 1 мм^2 нижней и верхней эпидермы листьев представлены в таблицах 1 и 2.

Устьичный комплекс листьев ежевики рассмотренных видов определен как аномоцитный. Устьица располагаются на нижней эпидерме, с большей частотой встречаемости на 1 мм^2 у листьев ежевики сизой и ежевики аллеганской. Самые крупные устьица присущи листьям ежевики несской (таблица 3).

Для листьев ежевики сизой, ежевики несской и ежевики аллеганской характерна извилистая форма клеток эпидермы, однако у последней извилистость выражена в меньшей степени и форма эпидермальных клеток более округлая (рисунок 4).

В мезофилле листьев обнаружены кристаллические включения оксалата кальция (рисунок 5), которые представлены в виде призматических кристаллов (листья ежевики сизой) или в виде друз, расположенных чаще вдоль жилок (листья ежевики несской и ежевики аллеганской).

Исходя из данных проведенного микроскопического анализа можно выделить схожесть и различия анатомо-диагностических признаков ежевики сизой и ее родственных видов.

При рассмотрении эпидермы листьев с нижней и верхней стороны видно, что для нижней эпидермы характерно большее количество волосков и устьичного аппарата аномоцитного типа. Данные признаки являются общими для трех видов ежевики.

Для листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) выявлены следующие отличительные микроскопические признаки:

- наличие простых одноклеточных, сросшихся у основания волосков на нижней эпидерме в количестве 10 ± 7 на 1 мм^2;

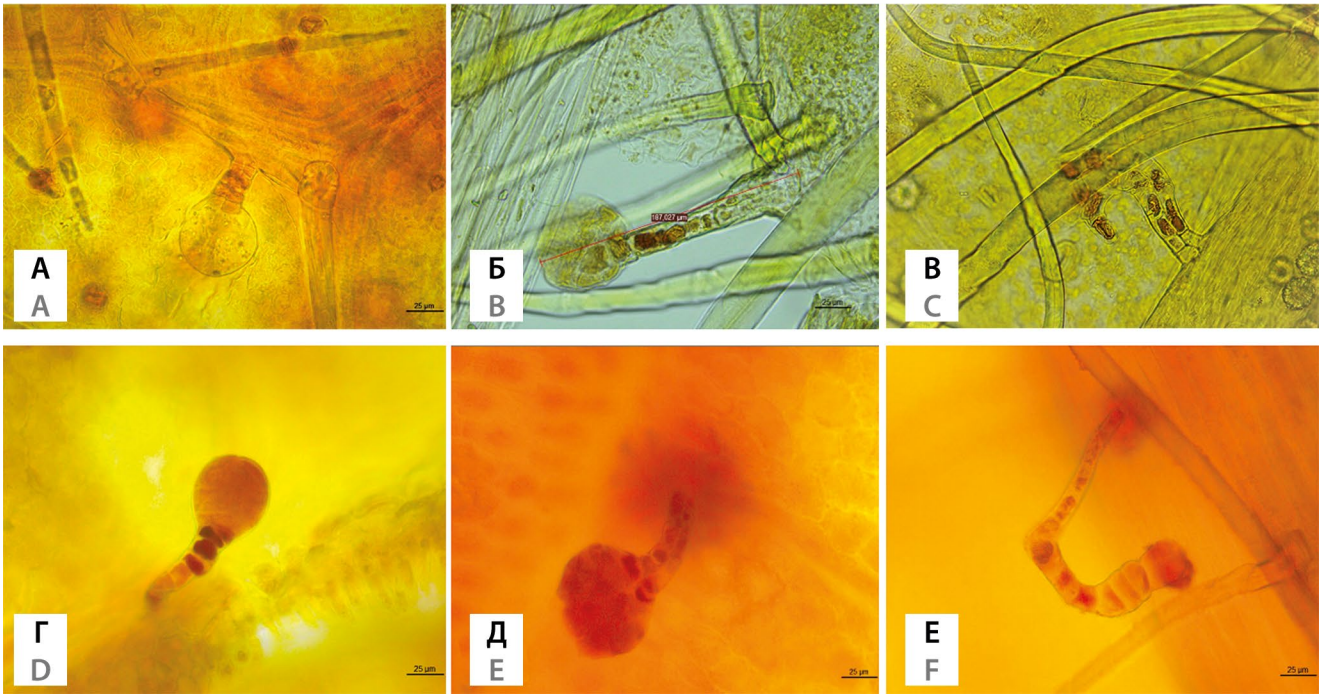


Рисунок 3. Железистые (головчатые) волоски.

А – *R. caesius* L. Железистый волосок листьев; Б – *R. nessensis* Hall. Железистый волосок листьев; В – *R. nessensis* Hall. Двурядный железистый волосок листьев; Г – *R. allegheniensis* Porter. Железистый волосок листьев с однорядной ножкой; Д – *R. allegheniensis* Porter. Железистый волосок листьев с двухрядной ножкой; Е – *R. allegheniensis* Porter. Длинный железистый волосок листьев. Окуляр х40

Figure 3. Glandular (capitate) hairs.

A – *R. caesius* L. Glandular hair of the leaves; B – *R. nessensis* Hall. Glandular hair of the leaves; C – *R. nessensis* Hall. Double-row hair of the leaves; D – *R. allegheniensis* Porter. Glandular hair of the leaves with a single-row pedicle; E – *R. allegheniensis* Porter. Glandular hair of the leaves with a double-row pedicle; F – R. allegheniensis Porter. Long glandular hair of the leave. 40x lense

Таблица 1. **Числовые характеристики полученных данных относительно простых одноклеточных волосков**

Table 1. **Numerical characteristics of the data obtained with respect to simple one-celled trichomes**

	Простые одноклеточные волоски Simple one-celled trichomes		**Простые, сросшиеся у основания волоски** Simple, fused at the base trichomes
Верхняя эпидерма листьев Adaxial epiderm of leaves			
	Размер, мкм Size, μm	**Частота встречаемости на 1 мм²** Frequency of occurrence per 1 mm²	**Частота встречаемости на 1 мм²** Frequency of occurrence per 1 mm²
Rubus caesius L.	359 ± 213	22 ± 8	Не встречаются Do not occur
Rubus allegheniensis Porter	660 ± 395	2 ± 1	Не встречаются Do not occur
Rubus nessensis Hall	604 ± 234	14 ± 5	Не встречаются Do not occur
Нижняя эпидерма листьев Abaxial epiderm of leaves			
	Размер, мкм Size, μm	**Частота встречаемости на 1 мм²** Frequency of occurrence per 1 mm²	**Частота встречаемости на 1 мм²** Frequency of occurrence per 1 mm²
Rubus caesius L.	546 ± 248	19 ± 5	10 ± 7
Rubus allegheniensis Porter	649 ± 142	13 ± 6	Не встречаются Do not occur
Rubus nessensis Hall	594 ± 206	12 ± 4	Не встречаются Do not occur

- волоски листьев всех типов небольшие по размеру (простые одноклеточные волоски на верхней эпидерме в 1,8 раза меньше, чем у ежевики аллеганской, и в 1,7 раза меньше волосков ежевики несской. На нижней эпидерме простые волоски несколько крупнее: в 1,2 раз меньше, чем у ежевики аллеганской, и в среднем на 48 мкм короче, чем волоски ежевики несской. Железистые волоски на верхней эпидерме в 1,5 и 1,6 раза меньше, чем у листьев ежевики аллеганской и ежевики несской соответственно, однако встречаются с большей частотой. На нижней эпидерме данный тип волосков по сравнению с таковыми на листьях ежевики несской остается почти неизменным, тогда как железистые волоски листьев ежевики аллеганской уже в 3,2 раза крупнее);
- наиболее опушенные листья среди изучаемых в настоящем исследовании видов (частота встречаемости простых волосков, включая сросшиеся у основания, в 11 и в 2,2 раза больше, чем на листьях ежевики аллеганской на верхней и нижней эпидерме соответственно. Разница с частотой встречаемости простых волосков на листьях ежевики несской менее значительна: в 1,6 раза больше на верхней и в 2,4 раза больше на нижней эпидерме);
- многочисленность устьиц на 1 мм² нижней эпидермы (в 2,2 раза больше, чем у ежевики несской, и в среднем на 5 больше, чем у ежевики аллеганской. По размеру устьиц листья ежевики сизой занимают промежуточное место среди листьев исследованных видов);
- форма клеток эпидермы – извилистая (что отличает их от клеток эпидермы листьев ежевики аллеганской);
- кристаллические включения оксалата кальция в виде кубических кристаллов, расположенных хаотично в мезофилле (листья ежевики несской и ежевики аллеганской отличаются наличием более концентрированных по жилкам друз).

Таблица 2. **Числовые характеристики полученных данных относительно железистых волосков**

Table 2. **Numerical characteristics of the data obtained with respect to glandular trichomes**

Железистые (головчатые) волоски Glandular (capitate) trichomes		
Верхняя эпидерма листьев Adaxial epiderm of leaves		
	Размер, мкм Size, μm	**Частота встречаемости на 1 мм²** Frequency of occurrence per 1 mm²
Rubus caesius L.	74 ± 9	6 ± 1
Rubus allegheniensis Porter	115 ± 20	2 ± 1
Rubus nessensis Hall	124 ± 37	4 ± 1
Нижняя эпидерма листьев Abaxial epiderm of leaves		
	Размер, мкм Size, μm	**Частота встречаемости на 1 мм²** Frequency of occurrence per 1 mm²
Rubus caesius L.	66 ± 8	2 ± 1
Rubus allegheniensis Porter	215 ± 64	6 ± 2
Rubus nessensis Hall	100 ± 29	4 ± 1

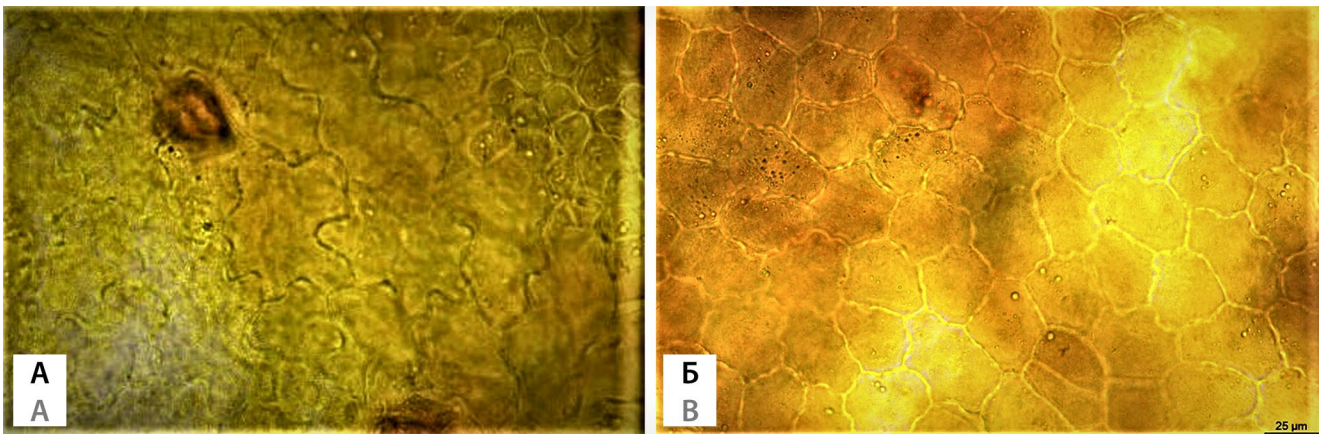


Рисунок 4. **Клетки эпидермы листьев:**
А – *Rubus caesius* L.; Б – *Rubus allegheniensis* Porter (окуляр х40)

Figure 4. **Epiderm cells of the leaves:**
A – *Rubus caesius* L.; B – *Rubus allegheniensis* Porter (40x lense)

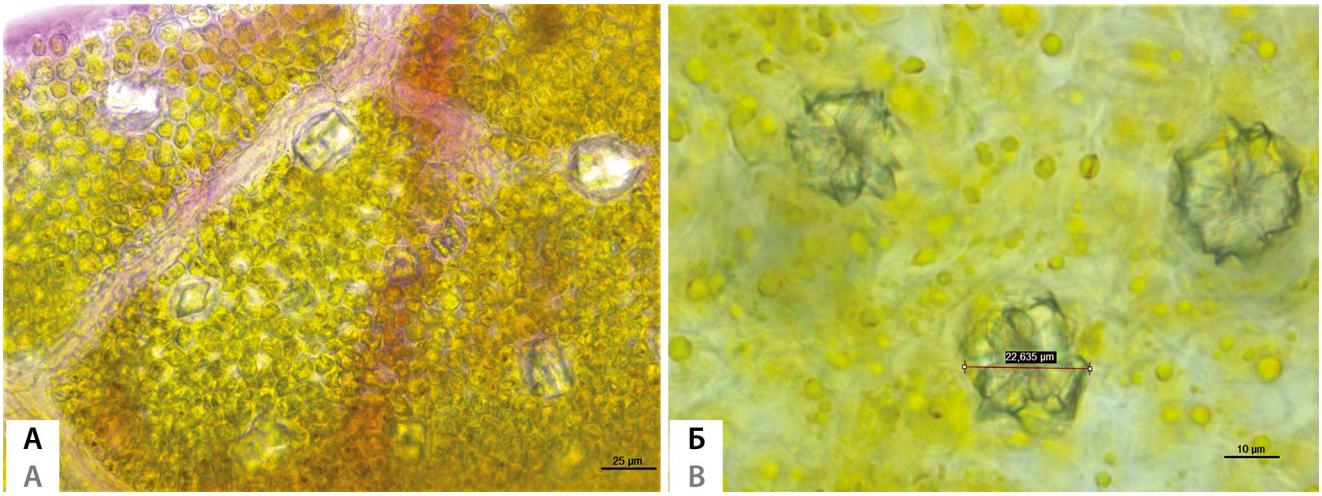


Рисунок 5. **Кристаллические включения оксалата кальция.**
А – *R. caesius* L. Кубические кристаллы в мезофилле листьев (окуляр х40). В – R. nessensis Hall. Друзы в мезофилле листьев (окуляр х100)

Figure 5. **Crystal inclusions of calcium oxalate.**
A – *R. caesius* L. Cubic crystals in the mesophyll of the leaves (40x lense). B – R. nessensis Hall. Druses in the mesophyll of the leaves (100x lense)

Таблица 3. **Метрологические характеристики устьиц**

Table 3. **Metrological characteristics of stomata**

	Размер устьиц листьев, мкм Leaf stomata size, µm		Частота встречаемости устьиц на 1 мм^2 Frequency of occurrence of stomata per 1 mm^2
	Длина Length	Ширина Width	
Rubus caesius L.	19,9 ± 3,2	15,5 ± 2,5	106 ± 37
Rubus allegheniensis Porter	17,2 ± 3,3	12,3 ± 2,2	101 ± 23
Rubus nessensis Hall	24 ± 2,3	15,9 ± 1,3	48 ± 13

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнительного микроскопического анализа листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.), ежевики аллеганской (*Rubus allegheniensis* Porter) и ежевики несской (*Rubus nessensis* Hall) были установлены анатомо-диагностические признаки, позволяющие идентифицировать сырье ежевики сизой и сырье близкородственных, схожих по внешним признакам видов. Были доказаны отличительные микроскопические признаки листьев ежевики сизой, заключающиеся в наличии простых одноклеточных, сросшихся у основания волосков, в меньшем размере и большей частоте встречаемости простых во-

лосков как на верхней, так и на нижней эпидерме, в форме железистых волосков и их небольшом размере, в характере формы клеток эпидермы и кристаллических включений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дунаева С. Е., Красовская Л. С., Гавриленко Т. А. Сохранение генетических ресурсов рода *Rubus* (*Rosaceae*) ex situ (обзор). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(1):236–253.
2. Серегин А. П., ред. Цифровой гербарий МГУ. М.: МГУ; 2022.
3. Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е изд. Москва: Товарищество научных изданий КМК; 2006. 600 с.
4. Chaves V. C., Soares M. S., Spohr L., Teixeira F., Vieira A., Constantino L. S., Dal Pizzol F., Lencina C. L., Spanevello R. M., Freitas M. P., Simões C. M. O., Reginatto F. H., Stefanello F. M. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. *Neuroscience Letters*. 2020;714:134566. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134566.
5. Paczkowska-Walendowska M., Gościniak A., Szymanowska D., Szwajgier D., Baranowska-Wójcik E., Szulc P., Dreczka D., Simon M., Cielecka-Piontek, J. Blackberry Leaves as New Functional Food? Screening Antioxidant, Anti-Inflammatory and Microbiological Activities in Correlation with Phytochemical Analysis. *Antioxidants*. 2021;10(12):1945. DOI: 10.3390/antiox10121945.
6. Veličković I., Grujić S., Džamić A., Krivošej Z., Marin P. In vitro antioxidant activity of dewberry (*Rubus caesius* L. var. aquáticus Weihe. & Nees.) leaf extracts. *Archives of Biological Sciences*. 2015;67(4):1323–1330. DOI: 10.2298/ABS150414109V.
7. Hering A., Stefanowicz-Hajduk J., Hałasa R., Olech M., Nowak R., Kosiński P., Ochocka J. R. Polyphenolic Characterization, Antioxidant, Antihyaluronidase and Antimicrobial Activity of Young Leaves and Stem Extracts from *Rubus caesius* L. *Molecules*. 2022;27(19):6181. DOI: 10.3390/molecules27196181.
8. Krzepiłko A., Prażak R., Święciło A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of raspberry, blackberry and raspberry-blackberry hybrid leaf buds. *Molecules*. 2021;26(2):327. DOI: 10.3390/molecules26020327.
9. Robinson J. A., Bierwirth J. E., Greenspan P., Pegg R. B. Blackberry polyphenols: Composition, quantity, and health impacts from in vitro and in vivo studies. *Journal of Food Bioactives*. 2020;9. DOI: 10.31665/JFB.2020.9217.
10. Sultana N. Plants of genus *Rubus* as a source of pharmaceuticals. *CPQ Nutrition*. 2018;3(1):1–71.
11. Schädler V., Dergatschewa S. *Rubus caesius* L. Leaves: Pharmacognostic analysis and the study of hypoglycemic activity. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 2017;7(5):501. DOI: 10.5455/njppp.2017.7.1234224012017.
12. Wu T., Gao Y., Guo X., Zhang M., Gong L. Blackberry and blueberry anthocyanin supplementation counteract high-fat-diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and inflammation and accelerating energy expenditure. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:1–9. DOI: 10.1155/2018/4051232.
13. Муллажонова М. Т., Исматуллаева Ю. А., Имамалиев Б. А., Рахимова Г. К. Изучение противодиарейной активности плодов ежевики сизой, произрастающей на территории узбекистана. *Farmatsevtika jurnali*. 2017;4:83.
14. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд., Т. 2. Москва: Министерства здравоохранения Российской Федерации; 2018.
15. Попова М. В., Брежнева Т. А., Сливкин А. И., Шестакова Г. Ю. Сравнительное изучение морфолого-анатомических признаков листьев ежевики разных сортов. *Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения*. 2019;277–284.
16. Koczka N., Stefanovits-Banyai E., Prokaj E. Element composition, total phenolics and antioxidant activity of wild and cultivated blackberry (*Rubus fruticosus* L.) fruits and leaves during the harvest time. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2018;46(2):563–569. DOI: 10.15835/nbha46210993.

REFERENCES

1. Dunaeva S. E., Krasovskaya L. S., Gavrilenko T. A. Conservation of genetic resources of the genus *Rubus* (*Rosaceae*) ex situ (review). *Works on applied botany, genetics and breeding*, 2022;183(1):236–253. (In Russ.)
2. Seregin A. P., editor. Digital Herbarium of Moscow State University. Moscow: Moscow State University; 2022. (In Russ.)
3. Mayevsky P. F. Flora of the middle zone of the European part of Russia. 10th ed. Moscow: KMK Scientific Press; 2006. 600 p. (In Russ.)
4. Chaves V. C., Soares M. S., Spohr L., Teixeira F., Vieira A., Constantino L. S., Dal Pizzol F., Lencina C. L., Spanevello R. M., Freitas M. P., Simões C. M. O., Reginatto F. H., Stefanello F. M. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. *Neuroscience Letters*. 2020;714:134566. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134566.
5. Paczkowska-Walendowska M., Gościniak A., Szymanowska D., Szwajgier D., Baranowska-Wójcik E., Szulc P., Dreczka D., Simon M., Cielecka-Piontek, J. Blackberry Leaves as New Functional Food? Screening Antioxidant, Anti-Inflammatory and Microbiological Activities in Correlation with Phytochemical Analysis. *Antioxidants*. 2021;10(12):1945. DOI: 10.3390/antiox10121945.
6. Veličković I., Grujić S., Džamić A., Krivošej Z., Marin P. In vitro antioxidant activity of dewberry (*Rubus caesius* L. var. aquáticus Weihe. & Nees.) leaf extracts. *Archives of Biological Sciences*. 2015;67(4):1323–1330. DOI: 10.2298/ABS150414109V.
7. Hering A., Stefanowicz-Hajduk J., Hałasa R., Olech M., Nowak R., Kosiński P., Ochocka J. R. Polyphenolic Characterization, Antioxidant, Antihyaluronidase and Antimicrobial Activity of Young Leaves and Stem Extracts from *Rubus caesius* L. *Molecules*. 2022;27(19):6181. DOI: 10.3390/molecules27196181.
8. Krzepiłko A., Prażak R., Święciło A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of raspberry, blackberry and raspberry-blackberry hybrid leaf buds. *Molecules*. 2021;26(2):327. DOI: 10.3390/molecules26020327.
9. Robinson J. A., Bierwirth J. E., Greenspan P., Pegg R. B. Blackberry polyphenols: Composition, quantity, and health impacts from in vitro and in vivo studies. *Journal of Food Bioactives*. 2020;9. DOI: 10.31665/JFB.2020.9217.
10. Sultana N. Plants of genus *Rubus* as a source of pharmaceuticals. *CPQ Nutrition*. 2018;3(1):1–71.
11. Schädler V., Dergatschewa S. *Rubus caesius* L. Leaves: Pharmacognostic analysis and the study of hypoglycemic activity. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 2017;7(5):501. DOI: 10.5455/njppp.2017.7.1234224012017.
12. Wu T., Gao Y., Guo X., Zhang M., Gong L. Blackberry and blueberry anthocyanin supplementation counteract high-fat-diet-induced obesity by alleviating oxidative stress and inflammation and accelerating energy expenditure. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:1–9. DOI: 10.1155/2018/4051232.
13. Mullazhonova M. T., Ismatullayeva Yu. A., Imamaliev B. A., Rakhimova G. K. Study of antidiarrheal activity of blackberry fruits growing in the territory of uzbekistan. *Farmatsevtika jurnali*. 2017;4:83. (In Russ.)
14. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. V. 2. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.)
15. Popova M. V., Brezhnev T. A., Slivkin A. I., Shestakova G. Yu. Comparative study of morphological and anatomical features of blackberry leaves of different varieties. *Sovremennye tendencii razvitija tehnologij zdorov'esberezheniya*. 2019;277–284. (In Russ.)
16. Koczka N., Stefanovits-Banyai E., Prokaj E. Element composition, total phenolics and antioxidant activity of wild and cultivated blackberry (*Rubus fruticosus* L.) fruits and leaves during the harvest time. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2018;46(2):563–569. DOI: 10.15835/nbha46210993.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-118-123
УДК 615.072

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Стандартизация фармацевтической субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля

В. В. Пермикин✉, Е. Ю. Никитина, Е. В. Шадрина, Т. Г. Хонина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (ИОС УрО РАН). 620137, Россия, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской, д. 22/20

✉ **Контактное лицо:** Пермикин Василий Викторович. **E-mail:** vasiliy_permikin@mail.ru

ORCID: В. В. Пермикин – https://orcid.org/0000-0002-8821-0920; Е. Ю. Никитина – https://orcid.org/0000-0002-3098-6267;
Е. В. Шадрина – https://orcid.org/0000-0002-2102-316X; Т. Г. Хонина – https://orcid.org/0000-0002-8746-7046.

Статья поступила: 25.01.2023 **Статья принята в печать:** 15.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Субстанция кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля рассматривается как фармацевтическая субстанция для создания новых лекарственных средств с антимикробным действием для местного, наружного и интравагинального применения. Одной из стадий внедрения в практику новых фармакологически активных соединений является стандартизация и валидационная оценка методик, определяющих показатели качества соответствующих веществ.

Цель. Определить показатели качества кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля, провести их апробацию. Разработать методику количественного определения кремния, цинка и бора. Провести статистическую обработку результатов количественного определения и дать валидационную оценку выбранной методике.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали субстанцию кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля, синтезированную в ИОС УрО РАН. Исследования проводили на спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, США) и оптическом эмиссионном спектрометре с индуктивно свя-занной плазмой OPTIMA 4300 DV (PerkinElmer, США).

Результаты и обсуждение. В работе отражены результаты испытаний качественной и количественной оценки новой фармакологически активной субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля. Приведены данные статистической обработки и валидационной оценки методики количественного определения кремния, цинка и бора.

Заключение. Определены показатели качества кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля. Разработана методика количественного определения кремния, цинка и бора. Проведена стандартизация исследуемой фармакологически активной субстанции в соответствии с действующими требованиями к фармацевтическим субстанциям в Российской Федерации.

Ключевые слова: глицерогидрогели, глицеролат, глицеролат кремния, глицеролат цинка, глицеролат бора, кремнийцинкборсодержащий глицерогидрогель, стандартизация

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

Вклад авторов. В. В. Пермикин апробировал методику качественного определения, провел обработку данных, осуществил статистическую обработку и валидационную оценку количественного определения. Е. Ю. Никитина осуществляла наработку субстанции. Е. В. Шадрина производила приготовление модельных смесей для статистических и валидационных испытаний. Т. Г. Хонина координировала действия исследования. Все авторы участвовал в обсуждении результатов и написании статьи.

Благодарность. Работа выполнена в соответствии с планами НИР и государствен-ным заданием на 2022 г. (государственная регистрация № АААА-А19-119011790134-1).

Для цитирования: Пермикин В. В., Никитина Е. Ю., Шадрина Е. В., Хонина Т. Г. Стандартизация фармацевтической субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(3):118–123. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-118-123

Standardization of the Pharmaceutical Substance of the Silicon-zinc-boron-containing Glycerohydrogel

Vasiliy V. Permikin✉, Elena Yu. Nikitina, Elena V. Shadrina, Tat'yana G. Khonina

I. Ya. Postovsky Insititute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (IOS UB RAS). 22/20, Sof'i Kovalevskoy str., Yekaterinburg, 620137, Russia

✉ **Corresponding author:** Vasiliy V. Permikin. **E-mail:** vasiliy_permikin@mail.ru

ORCID: Vasiliy V. Permikin – https://orcid.org/0000-0002-8821-0920; Elena Yu. Nikitina – https://orcid.org/0000-0002-3098-6267;
Elena V. Shadrina – https://orcid.org/0000-0002-2102-316X; Tat`yana G. Khonina – https://orcid.org/0000-0002-8746-7046.

Received: 25.01.2023 **Revised:** 15.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Silicon-zinc-boron-containing glycerohydrogel substance is considered as a pharmaceutical substance for the new drugs creation with antimicrobial action for local, external and intravaginal use. Standardization and validation of the methods determining the quality parameters of the corresponding substances is one of the stages of introducing new pharmacologically active compounds into practice.

© Пермикин В. В., Никитина Е. Ю., Шадрина Е. В., Хонина Т. Г., 2023
© Permikin V. V., Nikitina E. Yu., Shadrina E. V., Khonina T. G., 2023

Aim. Determine the quality parameters of silicon-zinc-boron-containing glycerohydrogel, conduct their approbation. Develop a method for quantitative determination of silicon, zinc and boron. Perform statistical results processing of quantitative determination and provide a validation assessment of the chosen method.
Materials and methods. A silicon-zinc-boron-containing glycerohydrogel sub-stance was synthesized at the Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences and was used as the studying object. The stud-ies were performed using a Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, USA) spectrometer and an OPTIMA 4300 DV (PerkinElmer, США) optical emission spectrometer with inductively coupled plasma.
Results and discussion. The paper describes the results of new pharmacologically active silicon-zinc-boron-containing glycerohydrogel substance qualitative and quantitative tests. The data of statistical processing and validation assessment of the quantitative determination of silicon, zinc, and boron are presented.
Conclusion. The quality parameters of silicon-zinc-boron-containing glycerohydrogel were determined. A method of silicon, zinc and boron quantitative determination was developed. Standardization of the investigated pharmacologically active substance was carried out in accordance with the current requirements for pharmaceutical substances in the Russian Federation.

Keywords: glycerohydrogels, glycerolate, silicon glycerolate, zinc glycerolate, boron glycer-olate, silicon-zinc-boron-containing glycerohydrogel, standardization

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

Contribution of the authors. Vasiliy V. Permikin approbated methods of qualitative determination, performed data processing, statistical processing and validation assessment of quantitative determination. Elena Yu. Nikitina performed substance preparation. Elena V Shadrina performed model mixtures preparation for statistical and validation tests. Tat'yana G. Khonina coordinated the study. All authors participated in the discussion of the results and writing the article.

Acknowledgment. The work was carried out in accordance with the research plans and the state task for 2022 (state registration No. AAAA-A19-119011790134-1).

For citation: Permikin V. V., Nikitina E. Yu., Shadrina E. V., Khonina T. G. Standardization of the pharmaceutical substance of the silicon-zinc-boron-containing glycerohydrogel. *Drug development & registration*. 2023;12(3):118–123. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-118-123

ВВЕДЕНИЕ

Основной проблемой в области антимикробной терапии является нарастающая устойчивость микроорганизмов к терапевтическим препаратам, используемых в современном мире. Таким образом, актуальной задачей химической и фармацевтической отрасли является разработка новых антимикробных агентов с низкими показателями токсичности и высокой доказанной эффективностью. Руководствуясь данными принципами, мы разработали фармацевтические субстанции, обладающие антимикробным действием, на основе полиолатов кремния, цинка и бора. Наиболее ярко выраженным антибактериальным и антимикотическим действиям по результатам исследования обладает субстанция кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля оптимального формального состава $3Si(C_3H_7O_3)_4 : ZnC_3H_6O_3 : 2HB(C_3H_6O_3)_2 : 15C_3H_8O_3 : 70H_2O$ [1]. Соответствующий гель за счет входящих в его состав активных ингредиентов обладает антимикробным, репаративным, регенерирующим и иммунотропным действием [2–5].

Фармакологические свойства полученного глицерогидрогеля определяют возможность применения субстанции в медицинской и ветеринарной практике в качестве средства для местного, наружного и интравагинального применения.

В свою очередь, структурные особенности кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля позволяют применять данную субстанцию в форме монопрепарата, в комбинации с другими фармакологически активными ингредиентами без добавления вспомогательных веществ.

Цель работы – определить показатели качества кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля, провести их апробацию. Предложить методику совместного количественного определения входящих в состав элементов – кремния, цинка и бора. На основании полученных данных количественного определения осуществить статистическую обработку результатов и произвести валидационную оценку выбранной методики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Разработку и валидацию методики проводили на пяти опытных образцах одной серии субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля формального состава $3Si(C_3H_7O_3)_4 : ZnC_3H_6O_3 : 2HB(C_3H_6O_3)_2 : 15C_3H_8O_3 : 70H_2O$.

Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы:

- ✓ кислота азотная (ос.ч. 27-5, ГОСТ 11125-84, ООО «Сигма Тек», Россия);
- ✓ кислота фтористоводородная (ос.ч. 27-5, ТУ 2612-007-56853252-2010, ООО «Сигма Тек», Россия);

- ✓ кислота серная [ос.ч. 11-15, ГОСТ 14262-78 (с изменениями №1, 2), ООО «Сигма Тек», Россия];
- ✓ МЭС-1 (СОП 15608-2014, ООО НПО «Скат», Россия);
- ✓ МЭС-2 (СОП 15615-2014, ООО НПО «Скат», Россия);
- ✓ МЭС-3 (СОП 15616-2014, ООО НПО «Скат», Россия);
- ✓ спирт этиловый 95 % (ФС.2.1.0036.15, ООО «Константа-Фарм М», Россия);
- ✓ натрия гидроокись (ч.д.а., ГОСТ 4328-77, ОАО «Реахим», Россия);
- ✓ натрий сернистый 9-водный (ч.д.а., ГОСТ 2053-77, ОАО «Реахим», Россия);
- ✓ медь (II) сернокислая 5-водная (ч.д.а., ГОСТ 4165-78 (с изменениями №1, 2, 3), ОАО «Реахим», Россия).

Оборудование

Для определения ИК-спектра использовали спектрометр Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, США). Качественное и количественное определение целевых элементов, родственных примесей и определение тяжелых металлов проводили совместно на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой OPTIMA 4300 DV (PerkinElmer, США).

Подготовка проб испытуемых растворов

1,000 г кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля растворяли в 5 мл разбавленной азотной кислоты и 5 мл фтористоводородной кислоты, объем раствора доводили до метки водой деионизированной в мерной колбе на 100 мл.

Холостой опыт

Холостой опыт выполняли согласно п. 7.2 ГОСТ Р ИСО 7530-8-2017.

Приготовление градуировочных растворов

Приготовление градуировочных растворов осуществляли согласно п. 7.3 ГОСТ Р ИСО 7530-8-2017, в качестве стандартных растворов использовали стандартные многоэлементные растворы МЭС-1,2,3 фирмы ООО НПО «Скат», Россия.

Градуировочный график и определение

Измерения выполняли на длинах волн, исключающих наличие линий поглощения сторонних элементов: Si – 251,61 нм; Zn – 481,05 нм; B – 208,96 нм, следуя описаниям п. 7.4.1 ГОСТ ИСО 7530-1.

Предварительную очистку горелки проводили согласно п. 7.4.1 ГОСТ Р ИСО 7530-8-2017.

Операционные параметры и условия анализа АЭС-ИСП

В ходе работы использовали распылительную камеру Скотта, необходимую для минимизации пульсации перистальтического насоса. Атомизатор – индуктивно связанная плазма. Мощность ВЧ-генератора отрегулировали на уровне 1150 Вт. Скорость потока пробоподающего газа составляла 0,5 л/мин, охлаждающего газа – 12 л/мин. Скорость дополнительного газового потока – 0,5 л/мин. Режим наблюдения плазмы – радиальный, при разрешении 0,007 нм. Время интегрирования сигнала – 20 с в диапазоне 180–265 нм и 30 с в диапазоне 266–800 нм. Пробу вводили посредством перистальтического насоса со скоростью 2,5 мл/мин.

Модельные смеси готовили из глицерина, глицеролатов кремния состава $Si(C_3H_7O_3)_4 : 2C_3H_8O_3$, глицеролата цинка $ZnC_3H_6O_3$ и глицеролата бора $HB(C_3H_6O_3)_2$ с установленным содержанием кремния, цинка, бора. Данные прекурсоры синтезированы в лаборатории. В качестве растворителя выступала вода деионизированная (таблица 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Совокупные полученные данные позволили сформировать требования к качеству фармацевтической субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля формального состава $3Si(C_3H_7O_3)_4 : ZnC_3H_6O_3 : 2HB(C_3H_6O3)_2 : 15C_3H_8O_3 : 70H_2O$. Данная субстанция характеризуется повышенной стабильностью, устойчивостью к синерезису и представляет собой однородную гелеобразную массу белого цвета.

Согласно ОФС.1.1.0006.15. «Фармацевтические субстанции» к субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля были подобраны показатели качества, наиболее полно описывающие его физико-химические свойства с учетом способа терапевтического применения.

Растворимость субстанции устанавливали по методике ОФС.1.2.1.0005.15. «Растворимость» – субстанция практически нерастворима в воде, этиловом спирте 95 % и хлороформе.

Для определения подлинности субстанции использовали ИК-спектрометрию. Инфракрасный спектр субстанции в области от 4000 до 400 $см^{-1}$ по положению полос поглощения соответствует спектру стандартного образца предприятия кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля (рисунок 1).

Качественное и количественное определение кремния, цинка и бора, определение содержания тяжелых металлов и родственных примесей в исследуемом геле проводили совместно методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, в качестве стандарта элементов и тяжелых металлов использовали многокомпонентные стандартные растворы МЭС-1, МЭС-2, МЭС-3. Нормы, определенные в ходе соответствующего исследования, представлены в таблице 2.

Таблица 1. **Используемые модельные смеси для определения валидационных характеристик**

Table 1. **Model mixtures used to determine validation characteristics**

Наименование характеристики Name, characteristics		Содержание кремния, цинка и бора по отношению к их содержанию в разработанном глицерогидрогеле, % The content of silicon, zinc and boron in relation to the content of the developed glycerohydrogel, %				
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
		80	90	100	110	120
Специфичность Specificity		+	+	+	–	–
Аналитическая область Analytical area		+	–	–	–	+
Линейность Linearity		+	+	+	+	+
Правильность Accuracy		+	+	+	–	–
Прецизионность Precision	Повторяемость Repeatability	–	–	+	–	–
	Внутрилабораторная In – lab	+	–	+	–	+

Таблица 2. **Показатели качества фармацевтической субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля**

Table 2. **Quality indicators of the pharmaceutical substance silicon-zinc-boron-containing glycerohydrogel**

Показатель Parameter	Норма Norm	
Подлинность Authenticity	Характерные линии поглощения Characteristic absorption lines	Кремний – 251,61 нм Silicon – 251.61 nm
		Цинк – 481,05 нм Zinc – 481.05 nm
		Бор – 208,96 нм Boron – 208.96 nm
Родственные примеси Related impurities	Не более 0,15 % Not more than 0,15 %	
Тяжелые металлы Heavy metals	Не более 10 ppm Not more than 10 ppm	
Количественное определение, % Quantitative determination, %	Кремний Silicon	1,84–2,0
	Цинк Zinc	1,43–1,59
	Бор Boron	0,48–0,53

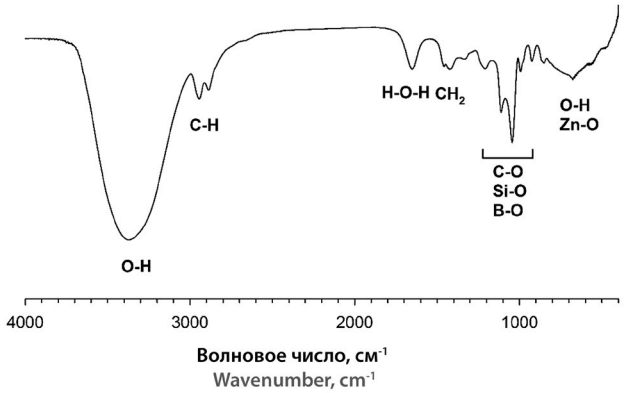


Рисунок 1. **ИК-спектр кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля состава $3Si(C_3H_7O_3)_4 : ZnC_3H_6O_3 : 2HB(C_3H_6O_3)_2 : 15C_3H_8O_3 : 70H_2O$**

Figure 1. **IR spectrum of silicon zinc boron containing glycerohydrogel composition $3Si(C_3H_7O_3)_4 : ZnC_3H_6O_3 : 2HB(C_3H_6O_3)_2 : 15C_3H_8O_3 : 70H_2O$**

Подлинность входящего в состав глицерина подтверждали качественной цветной реакцией с раствором меди сульфата в щелочной среде. Раствор приобрел сине-фиолетовое окрашивание, что свидетельствует об образовании глицератов меди.

Согласно ОФС.1.2.4.0002.18. «Микробиологическая чистота» субстанция кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля должна выдерживать испытания, которым подвергаются препараты для местного, наружного и интравагинального применения категории 2.

Для подтверждения специфичности, аналитической области и предела количественного определения, а также наличия линейной зависимости аналитического сигнала методики совместного количественного определения кремния, цинка и бора были взяты три образца модельной смеси в пяти параллельных определениях. Полученные экспериментальные данные обработали статистически и провели валидационную оценку.

В качестве модельных смесей были предложены следующие составы, состоящие из $3Si(C_3H_7O_3)_4 : ZnC_3H_6O_3 : 2HB(C_3H_6O_3)_2 : 15C_3H8O_3$ и воды очищенной, из расчета 80 % (№ 1), 100 % (№ 3) и 120 % (№ 5) целевых компонентов – кремния, цинка и бора – по отношению к их содержанию в разработанном глицерогидрогеле. Статистические данные эксперимента представлены в таблице 3.

Таблица 3. **Данные статистической обработки количественного определения кремния, цинка и бора**

Table 3. **Data of statistical processing of quantitative determination of silicon, zinc and boron**

Метрологические характеристики Metrological characteristics	Модельная смесь Model combination								
	№ 1			№ 3			№ 5		
	Si	Zn	B	Si	Zn	B	Si	Zn	B
μ, масс.% μ, wt.%	1,55	1,21	0,40	1,94	1,51	0,5	2,33	1,81	0,6
$\bar{x}$, масс.% $\bar{x}$, wt.%	1,63	1,26	0,417	1,99	1,57	0,52	2,37	1,87	0,57
S^2	0,0082	0,0063	0,0004	0,0100	0,0079	0,0013	0,0238	0,0094	0,0014
S, масс.% S, wt.%	0,0906	0,0794	0,0200	0,1000	0,0889	0,0361	0,1543	0,0970	0,0374
$\bar{S}_{\bar{x}}$, масс.% $\bar{S}_{\bar{x}}$, wt.%	0,0405	0,0355	0,0089	0,0447	0,0397	0,0161	0,0690	0,0434	0,0167
$\bar{S}_{\bar{x}}$, %	2,484	2,817	2,145	2,247	2,532	3,101	2,911	2,319	2,936
x, %	0,233	0,204	0,051	0,257	0,228	0,093	0,396	0,249	0,096
$\Delta\bar{x}$, масс.% $\Delta\bar{x}$, wt.%	0,113	0,099	0,025	0,124	0,111	0,045	0,192	0,121	0,047
ε, %	14,28	16,19	12,33	12,91	14,55	17,82	16,73	13,32	16,87
$\bar{\varepsilon}$, масс.% $\bar{\varepsilon}$, wt.%	6,39	7,24	5,51	5,78	6,51	7,97	7,48	6,45	7,54
$t_{выч.}$ (95 %, 4)	1,98	1,41	1,90	1,12	1,51	1,24	0,58	1,38	1,8

Специфичность методики проверяли путем анализа смесей плацебо составов:

- на кремний – $ZnC_3H_6O_3$: $2HB(C_3H_6O_3)_2$: $15C_3H_8O_3$ и вода очищенная до 100 %;
- на цинк – $3Si(C_3H_7O_3)_4$: $2HB(C_3H_6O_3)_2$: $15C_3H_8O_3$ и вода очищенная до 100 %;
- на бор – $3Si(C_3H_7O_3)_4$: $ZnC_3H_6O_3$: $15C_3H_8O_3$ и вода очищенная до 100 %.

Концентрацию целевых ионов определяли по наиболее чувствительным линиям, исключающим наличие линий поглощения сторонних элементов: Si – 251,61 нм; Zn – 481,05 нм; B – 208,96 нм. В результатах испытаний отсутствовала полоса поглощения в области, характерной для не входящего в состав плацебо элемента.

Для получения представления о линейной зависимости методики количественного определения дополнительно использовали модельные смеси, содержащие 90 % (№ 2) и 110 % (№ 4) целевых компонентов. Подтверждено наличие линейной зависимости аналитического сигнала методики в аналитической области количественного определения кремния, цинка и бора. Диаграммы рассеяния и уравнения линейности совместного количественного определения элементов в субстанции представлены на рисунке 2.

Линейность методик оценивали по диаграмме рассеяния. Коэффициент корреляции рассчитывали по уравнению линейности, для каждого целевого элемента выполнялось условие $|r| \geq 0{,}95$; доверительный интервал находится в пределах 2 % определяемой величины.

С вероятностью 95 % в методике отсутствует значимая систематическая ошибка при выполнении условия $t_{выч.} < t_{табл.}$ (2,13 при $P = 95$ %, $f = 15$) (таблица 3).

Достоверность методики подтверждали путем анализа модельной смеси № 3. По предложенной методике в пяти измерениях количественного содержания кремния, цинка и бора получили результаты в области доверительных интервалов.

Испытания по оценке прецизионности валидируемой методики проводились на модельных смесях № 1, № 3, № 5, каждое измерение проводили в трех параллелях. Промежуток между исследованиями повторяемости и внутрилабораторной прецизионности составлял 2 недели со сменой исполнителя – результаты испытаний находятся в доверительном интервале.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках исследования проведена стандартизация субстанции кремнийцинкборсодержащего глицерогидрогеля в соответствии с действующими требованиями к фармацевтическим субстанциям, определяемыми Государственной фармакопеей (ГФ) РФ XIV издания.

Проведена статистическая обработка и оценка массива полученных данных совместного количественного определения кремния, цинка и бора в кремнийцинкборсодержащем глицерогидрогеле. На основании расчетов проведена валидационная оценка методики по критериям: специфичность, линейность, аналитическая область, прецизионность.

Представленная методика совместного определения кремния, цинка и бора может быть рекомендована для стандартизации готовых лекарственных форм на основе субстанции состава $3Si(C_3H_7O_3)_4$: $ZnC_3H_6O_3$: $2HB(C_3H_6O_3)_2$: $15C_3H_8O_3$.

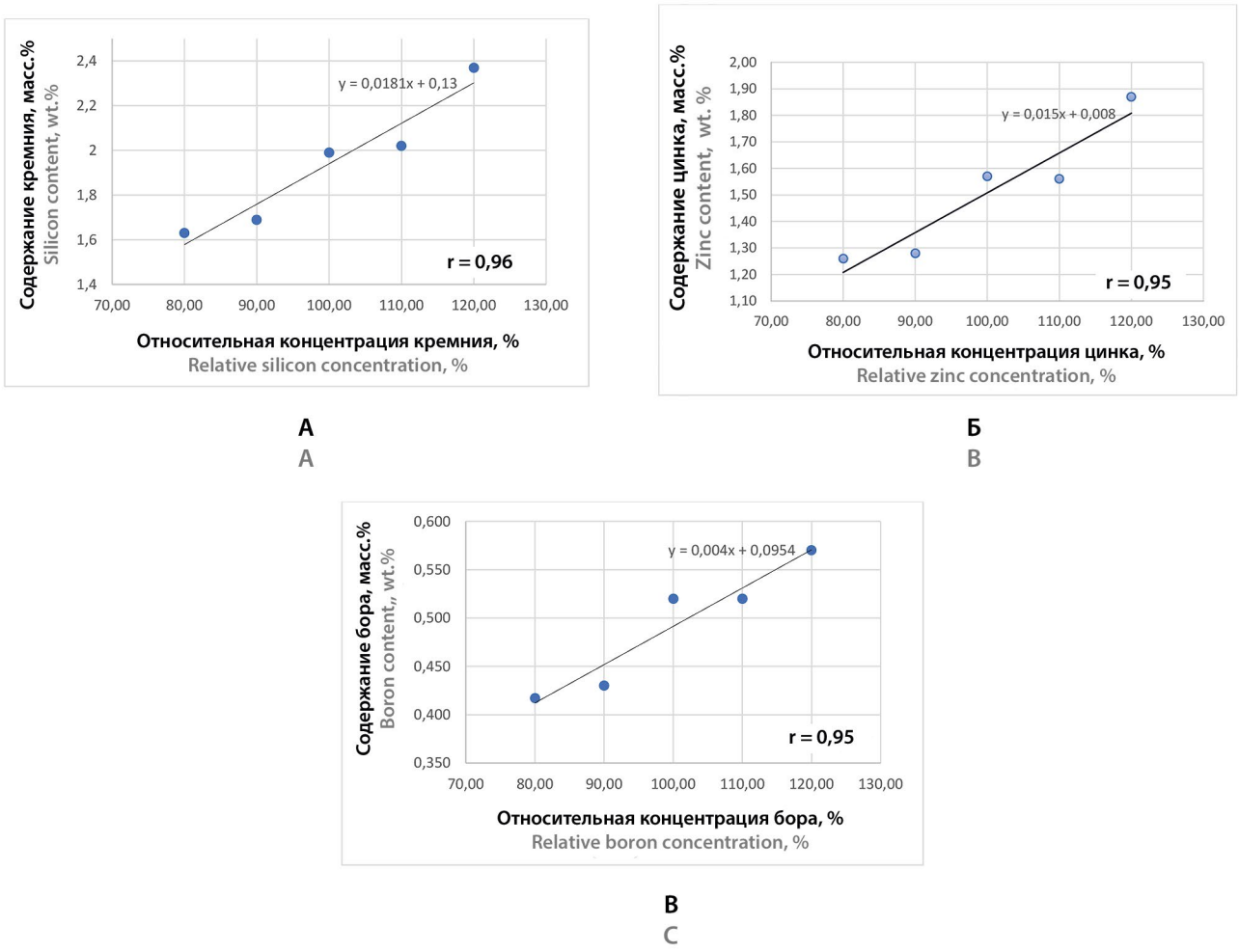


Рисунок 2. Диаграммы рассеяния и уравнения линейности совместного количественного определения элементов:
А – кремния; Б – цинка; В – бора

Figure 2. Scattering diagrams and linearity equations for the joint quantitative determination of elements:
A – silicon; B – zinc; C – boron

ЛИТЕРАТУРА

1. Khonina T. G., Kungurov N. V., Zilberberg N. V., Evstigneeva N. P., Kokhan M. M., Polishchuk A. I., Shadrina E. V., Nikitina E. Yu., Permikin V. V., Chupakhin O. N. Structural features and antimicrobial activity of hydrogels obtained by the sol–gel method from silicon, zinc, and boron glycerolizes. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2020;95(3):682–692. DOI: 10.1007/s10971-020-05328-6.
2. Khonina T. G., Ivanenko M. V., Chupakhin O. N., Safronov A. P., Bogdanova E. A., Karabanalov M. S., Permikin V. V., Larionov L. P., Drozdova L. I. Silicon-zinc-glycerol hydrogel, a potential immunotropic agent for topical application. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;107:197–202. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.07.012.
3. Cheong M. Y., Hazimah A. H., Zafarizal A. H., Rosnah I. Zinc glycerolate: potential active for topical application. *Journal of Oil Palm Research*. 2012;24:1287–1295.
4. Ларченко Е. Ю., Хонина Т. Г., Шадрина Е. В., Пестов А. В., Чупахин О. Н., Меньшутина Н. В., Лебедев А. Е., Ловская Д. Д., Ларионов Л. П., Чигвинцев С. А. Фармакологически активные гидрогели на основе глицеролатов кремния и хитозана. *Известия академии наук. Серия химическая*. 2014;5:1225–1231.
5. Чупахин О. Н., Бондарев А. Н., Штанько И. Н., Хонина Т. Г., Шадрина Е. В., Богданова Е. А., Ларионов Л. П. Синтез и свойства биологически активного кремний, цинк–глицерогидрогеля. *Известия академии наук. Серия химическая*. 2014;5:1219–1224.

REFERENCES

1. Khonina T. G., Kungurov N. V., Zilberberg N. V., Evstigneeva N. P., Kokhan M. M., Polishchuk A. I., Shadrina E. V., Nikitina E. Yu., Permikin V. V., Chupakhin O. N. Structural features and antimicrobial activity of hydrogels obtained by the sol–gel method from silicon, zinc, and boron glycerolizes. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2020;95(3):682–692. DOI: 10.1007/s10971-020-05328-6.
2. Khonina T. G., Ivanenko M. V., Chupakhin O. N., Safronov A. P., Bogdanova E. A., Karabanalov M. S., Permikin V. V., Larionov L. P., Drozdova L. I. Silicon-zinc-glycerol hydrogel, a potential immunotropic agent for topical application. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;107:197–202. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.07.012.
3. Cheong M. Y., Hazimah A. H., Zafarizal A. H., Rosnah I. Zinc glycerolate: potential active for topical application. *Journal of Oil Palm Research*. 2012;24:1287–1295.
4. Larchenko E. Yu, Khonina T. G., Shadrina E. V., Chupakhin O. N., Men'shutina N. V., Lebedev A. E., Lovskaya D. D., Larionov L. P., Chigvintsev S. A. Pharmacologically active hydrogels based on silicon and chitosan glycerolates. *Russian Chemical Bulletin*. 2014;5:1225–1231.
5. Chupakhin O. N., Bondarev A. N., Shtan'ko I. N., Khonina T. G., Shadrina E. V., Bogdanova E. A., Larionov L. P. Synthesis and properties of biologically active silicon, zinc-glycerohydrogel. *Russian Chemical Bulletin*. 2014;5:1219–1224.

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/10.33380/2305-2066-2023-12-3-125-133
УДК 615.072

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Стандартизация фармсубстанции литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-l-гулоновой кислоты как радиосенсибилизирующего агента

М. С. Третьякова[1], С. В. Кривощеков[2], Е. В. Плотников[1, 3]✉, Е. В. Дорожко[1], О. А. Воронова[1], М. С. Ларькина[1, 2], К. С. Бразовский[1, 2], М. В. Белоусов[1, 2]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет». 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 30
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 634050, Россия, 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

✉ **Контактное лицо:** Плотников Евгений Владимирович. **E-mail:** plotnikovev@tpu.ru

ORCID: М. С. Третьякова – https://orcid.org/0000-0002-5040-931X; С. В. Кривощеков – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141;
Е. В. Плотников – https://orcid.org/0000-0002-4374-6422; Е. В. Дорожко – https://orcid.org/0000-0002-8574-0045;
О. А. Воронова – https://orcid.org/0000-0001-6760-7796; М. С. Ларькина – https://orcid.org/0000-0003-1176-2441;
К. С. Бразовский – https://orcid.org/0000-0002-4779-9820; М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Статья поступила: 11.07.2023 **Статья принята в печать:** 16.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Установлено, что в сочетании с лучевым воздействием высокие дозы солей лития оказывают угнетающее действие на опухолевые лейкозные клетки. Подбор соответствующего анионного компонента позволяют получить выраженные радиосенсибилизирующие свойства. Литиевая соль гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты рассматривается как имеющая хороший химический и биологический потенциал для создания радиосенсибилизирующих препаратов. Было установлено, что данное соединение проявляет высокую антиоксидантную активность среди других солей лития, при этом проявляет выраженный радиосенсибилизирующий эффект. Данное радиосенсибилизирующее действие является дозозависимым и проявляется в высоких концентрациях в сочетании с фотонным или нейтронным облучением. Потенциальное противоопухолевое действие, вследствие радиосенсибилизации, реализуется через индукцию окислительного стресса, что предполагает, в первую очередь, усиление цитотоксического воздействия на быстро пролиферирующие клетки – опухолевые. Полученные результаты создают необходимую основу для создания препаратов с радиосенсибилизирующей активностью.

Цель. Провести аналитическую оценку содержания активной субстанции и установить основные показатели качества субстанции, регламентируемые Государственной фармакопеей РФ.

Материалы и методы. В ходе исследования определены параметры: растворимость, подлинность, температура плавления, показатель преломления, удельное вращение, прозрачность и цветность раствора, pH раствора, сульфатная зола, тяжелые металлы, посторонние примеси, вода и несколько других параметров.

Результаты и обсуждение. Разработан проект спецификации на фармацевтическую субстанцию литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты. Определены оптимальные параметры контроля состава и физико-химических характеристик и количественного определения фармацевтической субстанции, что является основной задачей для создания нового радиосенсибилизатора. Проведенные исследования дают полную характеристику фармсубстанции и устанавливают основные показатели качества ФС, что создает необходимую базу для создания лекарственной формы и изучения свойств in vivo для разработки лекарственного препарата с радиосенсибилизирующим действием.

Заключение. В ходе работы синтезированы опытные образцы литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты и проведена ее стандартизация в качестве фармацевтической субстанции в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ.

Ключевые слова: литиевая соль гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты, стандартизация, фармацевтическая субстанция, радиосенсибилизатор

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

Вклад авторов. М. В. Белоусов, Е. В. Плотников – составление плана исследований, общее руководство и постановка задач, обсуждение результатов, написание статьи. М. С. Третьякова, К. С. Бразовский, М. С. Ларькина, С. В. Кривощеков – проводили химический синтез, стандартизацию препарата. Е. В. Дорожко и О. А. Воронова – выполнили расчеты доз и отработали методику количественного определения. Все авторы участвовали в дискуссии результатов и составлении манускрипта.

Для цитирования: Третьякова М.С., Кривощеков С.В., Плотников Е.В., Дорожко Е.В., Воронова О.А., Ларькина М.С., Бразовский К.С., Белоусов М.В. Стандартизация фармсубстанции литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-l-гулоновой кислоты как радиосенсибилизирующего агента. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):125–133. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-125-133

© Третьякова М.С., Кривощеков С.В., Плотников Е.В., Дорожко Е.В., Воронова О.А., Ларькина М.С., Бразовский К.С., Белоусов М.В., 2023
© Tretyakova M. S., Krivoshchekov S. V., Plotnikov E. V., Dorozhko E. V., Voronova O. A., Larkina M. S., Brazovskiy K. S., Belousov M. V., 2023

Standardization of the Pharmaceutical Substance of Lithium Salt Gamma-lactone of 2,3-dehydro-l-gulonic Acid as a Radio-sensitizing Agent

Maria S. Tretyakova[1], Sergei V. Krivoshchekov[2], Evgenii V. Plotnikov[1, 3] ✉, Elena V. Dorozhko[1], Olesya A. Voronova[1], Maria S. Larkina[1, 2], Konstantin S. Brazovskiy[1], Mikhail V. Belousov[1, 2]

[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

✉ **Corresponding author:** Evgenii Plotnikov. **E-mail:** plotnikovev@tpu.ru

ORCID: Maria Tretyakova – https://orcid.org/0000-0002-5040-931X; Sergei Krivoshchekov – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141; Evgenii Plotnikov – https://orcid.org/0000-0002-4374-6422; Elena Dorozhko – https://orcid.org/0000-0002-8574-0045; Olesya Voronova – https://orcid.org/0000-0001-6760-7796; Maria Larkina – https://orcid.org/0000-0003-1176-2441; Konstantin Brazovskiy – https://orcid.org/0000-0002-4779-9820; Mikhail Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Received: 11.07.2023 **Revised:** 16.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. It was found that in combination with radiation exposure, high doses of lithium salts have a depressing effect on tumor leukemia cells. The selection of the appropriate anionic component makes it possible to obtain pronounced radiosensitizing properties. The lithium salt of gamma-lactone 2,3-dehydro-L-gulonic acid is a promising compound for the creation of radiosensitizing drugs. It was found that this compound exhibits high antioxidant activity among other lithium salts, while showing a pronounced radiosensitizing effect. This radiosensitizing effect is dose-dependent and manifests itself in high concentrations in combination with photon or neutron irradiation. The potential antitumor effect, due to radiosensitization, is realized through the induction of oxidative stress, which implies, first of all, an increase in cytotoxic effects on rapidly proliferating tumor cells. The obtained results provide the necessary basis for the creation of drugs with radiosensitizing activity.

Aim. The aim of this work is to conduct an analytical assessment of the content of the active substance and establish the main indicators of the quality of the substance, regulated by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Materials and methods. During the study, the following parameters were determined: solubility, authenticity, melting point, refractive index, specific rotation, transparency of the solution, color of the solution, pH of the solution, sulfate ash, heavy metals, impurities, water content, residual organic solvents, microbiological purity and a number of others.

Results and discussion. A draft specification for the pharmaceutical substance of the lithium salt gamma-lactone 2,3-dehydro-L-gulonic acid has been developed. The optimal parameters for the control of the composition and physico-chemical characteristics and quantitative determination of the pharmaceutical substance have been determined, which is the main task for the pharmaceutical development of the drug. The results obtained make it possible to conduct a comprehensive characterization of the FS and evaluate the quality parameters of the product, which creates the basis for obtaining a dosage form and further studying the properties for creating a drug with a radiosensitizing effect.

Conclusion. In the course of the work, experimental samples of the lithium salt gamma-lactone 2,3-dehydro-L-gulonic acid were synthesized and its standardization as a pharmaceutical substance was carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Keywords: lithium salt of gamma-lactone 2,3-dehydro-L-gulonic acid, standardization, pharmaceutical substance, radiosensitizer

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

Contribution of the authors. Mikhail V. Belousov, Evgenii V. Plotnikov – drawing up a research plan, general guidance and formulation of tasks, discussion of results, writing an article. Maria S. Tretyakova, Konstantin S. Brazovsky, Maria S. Larkina, Sergei V. Krivoshchekov – carried out chemical synthesis, standardization of the drug. Elena V. Dorozhko and Olesya A. Voronova – performed dose calculations and worked out the method of quantitative determination. All authors took part in the discussion of the results and the preparation of the manuscript.

For citation: Tretyakova M. S., Krivoshchekov S. V., Plotnikov E. V., Dorozhko E. V., Voronova O. A., Larkina M. S., Brazovskiy K. S., Belousov M. V. Standardization of the pharmaceutical substance of lithium salt gamma-lactone of 2,3-dehydro-l-gulonic acid as a radio-sensitizing agent. *Drug development & registration*. 2023;12(3):125–133. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-125-133

ВВЕДЕНИЕ

Основным применением препаратов лития в медицине является терапия биполярного расстройства [1]. В последние годы появилось много исследований, подтверждающих наличие у солей лития широкого спектра биологической активности и возможности их применения в других сферах, в том числе как антиоксидантов, иммуномодуляторов и др. [2–5].

В наших предыдущих исследованиях показано высокое радиосенсибилизирующее действие некоторых солей лития в сочетании с лучевым воздействием [6]. Соли лития обладают способностью стимулировать гемопоэз, что особенно важно при восстановлении после лучевой терапии при онкологических заболеваниях, при этом стабилизируя психоэмоциональный фон пациента [7]. Установлено, что в сочетании с лучевым воздействием высокие дозы аскорбата лития оказывают угнетающее действие на опухолевые лейкозные клетки и нормальные мононуклеарные клетки крови [8]. Важно отметить, что это вещество продемонстрировало наибольшую относительную антиоксидантную активность среди других

солей лития [2]. Было установлено, что наблюдаемый радиосенсибилизирующий эффект является дозозависимым и проявляется в высоких концентрациях, превышающих физиологические концентрации в 5–10 раз. В этом случае антиоксидантное соединение проявляет про-оксидантный эффект. Ранее этот эффект доказан для аскорбиновой кислоты [9, 10]. В физиологических концентрациях аскорбаты оказывают противовоспалительное действие и могут проявлять антикоагуляционный, антигиперлипидемический эффекты, однако, потенциальное противоопухолевое действие реализуется через индукцию окислительного стресса, что предполагает в первую очередь усиление цитотоксического воздействия на быстро пролиферирующие клетки, а в отдельных исследованиях определенные позитивные эффекты показаны в терапии онкобольных [11]. Полученные результаты создают необходимую основу для создания препаратов с радиосенсибилизирующей активностью.

В данной работе проведены исследования по стандартизации и разработке параметров качества для фармацевтической субстанции литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты для использования в качестве препарата радиосенсибилизатора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для синтеза объекта исследования использовали гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновую кислоту (аскорбиновую кислоту (ООО «ХИМСНАБ-СПБ», Россия) и карбонат лития (ACS, Sigma-Aldrich, Германия). Реакцию получения соли проводили при нагревании до 40 °С в деионизированной воде при перемешивании. Продукт реакции промывали изопропанолом, затем сушили. Выход продукта составлял 80 % от теоретического. При определении параметров качества использовали 6 лабораторных серий вещества. В качестве образца сравнения для спектральных методов анализа использовали стандартный образец предприятия (ЦВТ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты (СО-ЦВТ-006-01-2023), аттестованного в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы» ГФ РФ.

В соответствии с правилами, установленными Государственной фармакопеей РФ (ГФ РФ), устанавливается ряд параметров для характеристики ФС, в том числе количественное определение, родственные примеси, подлинность, прозрачность раствора, тяжелые металлы и другие [12].

В ходе исследования определено с помощью визуального метода, что фармацевтическая субстанция (ФС) на основе литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты представляет собой белый порошок без запаха.

В ходе работы выявлено, что субстанция легко растворима в воде, но очень мало растворима в этиловом спирте и ацетонитриле. Для дальнейших испытаний в качестве растворителя использовалась вода очищенная.

Согласно ГФ РФ 14 для установления подлинности вещества применяются различные методы, в том числе ЯМР-спектроскопия, хроматография (ТСХ, ГХ и ВЭЖХ) и другие [12]. Одним из основных рекомендуемых методов является инфракрасная спектроскопия. Для записи ИК-спектров образцов использовали ИК-фурье-спектрометр ФСМ 2201 (ООО "ИНФРАСПЕК", Россия) с таблеточным прессом. Спектры записывали при стандартных условиях в таблетках с калия бромидом (рисунок 1).

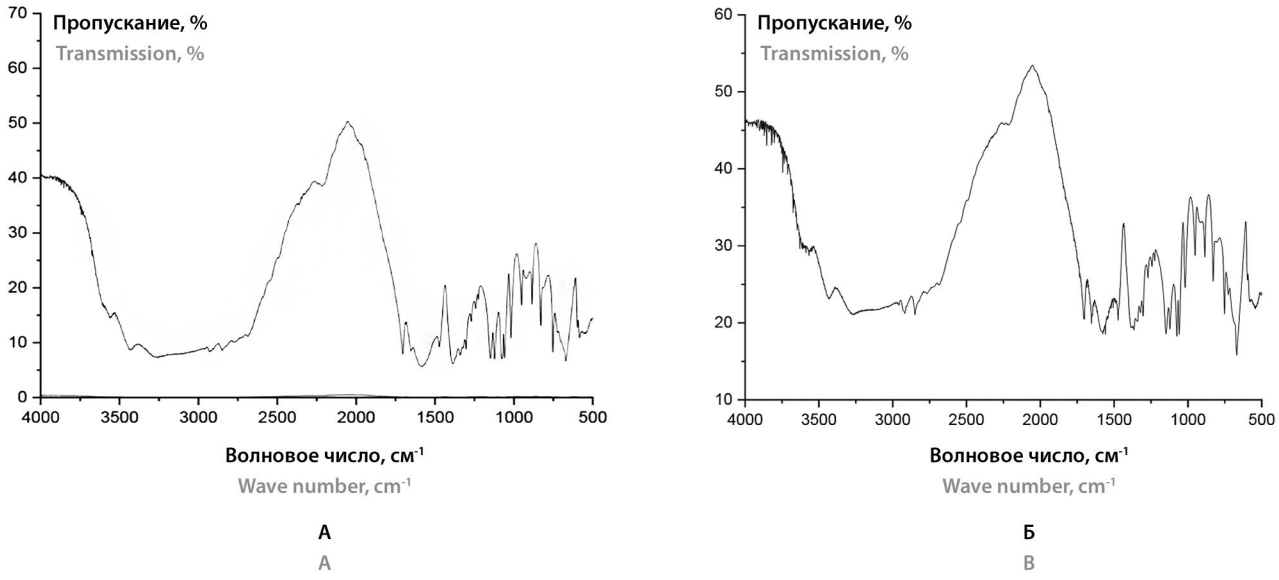


Рисунок 1. Репрезентативный ИК-спектр образца субстанции (А) и стандартного образца (Б)

Figure 1. Representative IR spectrum of the substance sample (A) and the reference sample (B)

Поскольку исследуемые образцы являются кристаллогидратом, область волновых чисел до 2500 $см^{-1}$ оказалась не информативной, в структуре спектра установлены характеристичные полосы поглощения валентных колебаний карбонильной группы (1704 $см^{-1}$), валентные симметричные и антисимметричные колебания О—С—О на 1019 и 1303 $см^{-1}$ [13]. В качестве критерия пригодности субстанции по данному показателю предложено сравнение со спектром стандартного образца.

Температура плавления оценивается для характеристики твердых веществ и является физической постоянной величиной при определенных условиях и служит критерием как подлинности, так и чистоты испытуемых вещества. Температуру плавления стандартизуемой ФС определяли по ОФС.1.2.1.0011.15 «Температура плавления». Использовали капиллярный метод (по ОФС.1.2.1.0011.15 метод 1) и аналитический прибор, используемый для определения температуры плавления с электрическим обогревом и диапазоном измерений в пределах от 20 до 360 °С (Mettler Toledo, США). Для этого применяли стеклянные капилляры длиной 10 см. Исследуемую ФС предварительно высушивали и помещали в капилляр. Скорость нагрева капилляров составила 1 °С в минуту. Измеренная температура плавления ФС составила 126–128 °С.

Удельное вращение раствора ФС определяли методом поляриметрии по ОФС.1.2.1.0018.15. Исследования проводили на автоматическом поляриметре АР-300. Для этого готовили 5%-й водный раствор ФС, заполняли кювету поляриметра и проводили измерение. Характеристику ФС оценивали путем вычисления показателя удельного вращении [α]. Данный параметр $[\alpha]_D^{20}$ для водных растворов ФС составил (+10,1)–(+10,3) °С, таким образом, субстанция обладает способностью вращать плоскость поляризации света и является правовращающим оптически активным веществом.

Одними из параметров стандартизации являются рефрактометрические показатели раствора ФС. В данной работе определены показатели преломления и факторы преломления водных растворов ФС методом рефрактометрии.

Определение рефрактометрических показателей проводили при температуре (20 ± 0,5) °С и длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм) на рефрактометрах Аббе. Для этого готовили 1–5 % водные растворы ФС. После проведения измерений рассчитывали рефрактометрический фактор (таблица 1).

Таким образом, данные таблицы с рефрактометрическими факторами и показателями преломления являются характеристичными параметрами для ФС.

Определение прозрачности или степени мутности растворов ФС, могут быть включены в перечень методов контроля качества субстанций. Данный параметр позволяет оценить прозрачность и содержание механических примесей в испытуемых растворах ФС.

Таблица 1. Результаты определения рефрактометрических факторов и показателей преломления ФС соли лития (n_0 = 1,3330)

Table 1. Results of determination of refractometric factors and refractive indices of lithium salt PS (n_0 = 1,3330)

C, %	***n*** **– среднее** ***n*** **– arithmetic mean**	*F*
1	1,3340	0,00200
2	1,3356	0,00130
3	1,3365	0,00116
4	1,3369	0,00097
5	1,3372	0,00084

Измерение проводили путем сопоставления параметров раствора ФС с растворителем или эталонами сравнения визуально. В результате сравнения прозрачности выявлено, что 5%-й водный раствор ФС прозрачен и по данному показателю соответствует растворителю «вода».

Спектрофотометрия в УФ и видимой областях для водного раствора ФС выполнена согласно ГФ РФ на спектрофотометре Agilent Cary 60 (Agilent Technologies, США). Растворы прозрачны в видимом диапазоне. Характерный пик вещества получен в УФ-области, максимум поглощения наблюдается при длине волны 265 нм.

Определение показателя pH раствора ФС выполнено потенциометрическим методом согласно ГФ РФ при температуре 25 °С с использованием лабораторного иономера ИТАН (ООО «НПП «Томьаналит», Россия). Показатель pH для 1%-го водного раствора ФС составляет 7,8–8,4.

Сульфатную золу определяли в соответствии с ГФ РФ, расчетное значение показателя из образующейся гравиметрической формы лития (Li2SO4) составляет 25,21 %, поэтому с учетом возможной ошибки эксперимента предложено значение норматива содержания сульфатной золы в субстанции 28 % (таблица 2).

Таблица 2. Результаты определения сульфатной золы в образце ФС

Table 2. Results of the determination of sulfate ash in a PS sample

Номер образца Sample Number	1	2	3
Содержание сульфатной золы, % Sulphate ash content, %	25,41	25,30	24,99

Тяжелые металлы определяли методом 2 в соответствии с ГФ РФ, содержание тяжелых металлов не должно превышать 0,0005 %. Во всех проанализированных образцах окрашивание испытуемого раствора не превышало окраску стандартного раствора.

Источником родственных примесей может являться только исходная аскорбиновая кислота, в которой, в соответствии с ФС, нормируется содержание оксалатов. Поэтому для стандартизации субстанции литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты по этому показателю предложено использовать методику из ФС.2.1.0058.18 по определению предельного содержания оксалатов.

Поскольку показатель потери в массе при высушивании превышает 0,5 %, определение примесей остаточных органических растворителей (пропанол-2) должно быть включено в стандартизацию субстанции. Определение выполняли методом газовой хроматографии с вводом равновесного пара (headspace) с использованием газового хроматографа Agilent 7890A с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке DB-624, 30 м × 0,53 мм. Условия проведения анализа: температура детектора 250 °С, температура инжектора 150 °С, температура колонки 40 °С, газ-носитель – азот, скорость потока 6,85 мл/мин, скорость поддувочного газа 20 мл/мин, скорость подачи водорода 30 мл/мин, подачи воздуха 300 мл/мин при делении потока в соотношении 20:1. Условия Headspace: температура уравновешивания 90 °С, время уравновешивания 20 мин, температура петли 100 °С, температура линии 110 °С, вводимый объем 1 мл.

Валидацию методики определения остаточных органических растворителей (изопропиловый спирт) проводили по алгоритму валидации методик предельного содержания, для которых требуется изучение диапазона 80–120 % от максимально допустимого содержания (МДС) контролируемой примеси. МДС, в соответствии с ОФС.1.1.0008.15, для изопропилового спирта составляет 0,5 % (или 5000 ppm), поэтому в валидационных мероприятиях исследовали диапазон от 4000 до 6000 ppm (таблица 3).

Таким образом, показана пригодность предложенной методики газохроматографического определения изопропилового спирта в субстанции литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты. Содержание изопропилового спирта во всех исследованных образцах не превышало 0,5 %.

Содержание лития в молекуле ФС определено методом атомно-эмиссионной спектрометрии с ИСП на приборе iCAP 6300 Duo (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). Испытуемый раствор готовили растворением точной навески образца субстанции 0,1500 г в мерной колбе вместимостью 100 мл. Результаты валидации методики показаны в таблице 4. Установленное содержание лития в ФС составило 3,289 ± 0,003 %. Расчетное содержание лития в ФС составляет 3,18 %. Предложено нормативное значение этого показателя в диапазоне 2,89–3,53 %.

Следующим важным параметром стандартизации ФС является содержание воды. Данный показатель определили термогравиметрическим методом. Совмещенный анализ термогравиметрия с дифференциально-сканирующей калориметрией (ТГ-ДСК) проводили на анализаторе Q600 (TA Instruments, США). Анализ проводили в корундовых открытых тиглях, от комнатной температуры до 600 С, со скоростью нагрева 10 С/минуту, в динамической среде воздуха или аргона (100 мл в минуту). Масса образца ФС составляла 3 мг. Установлено потеря массы 35,2 а.е./моль при повышении температуры в диапазоне 100–119 °С, что соответствует содержанию 2 молекул воды (рисунок 2).

В качестве основного метода для определения содержания воды в субстанции предложено использовать метод Фишера с использованием титратор 915 KF Ti-Touch (Metrohm, Швейцария). Расчетное значение содержания воды в субстанции – 16,51 %, поэтому, с учетом допустимой ошибки эксперимента, предложен норматив содержания воды от 14,9 до 18,1 %.

Количественное определение стандартизуемого образца выполняли вольтамперометрическим методом на рабочем стекло-углеродном электроде при +0,5 (В) в буферном растворе KCl 0,1 моль/дм^3. Для определения концентрации ФС готовили водный раствор ФС, для чего 100 мг (точная навеска) образца ФС помещали в мерную колбу и добавляли 100 см^3 буферного раствора хлористого калия 0,1 моль/дм^3 до метки. Далее соответствующие измеряемые объемы помещали в электрохимическую ячейку вольтамперометрического анализатора ТА-2 (ООО НПП «Техноаналит», Россия). Регистрацию вольтампе-

Таблица 3. Результаты валидации методики определения остаточного количества изопропилового спирта в субстанции

Table 3. Results of the validation of the method for determining the residual amount of isopropyl alcohol in the substance

№	Показатель Indicator	Критерий пригодности методики Criteria for the suitability of the methodology	Уровень содержания, % Content level, %	Фактическое значение СКО, % The actual value of the SD, %
1	Повторяемость Repeatability	Относительное СКО повторяемости не более 2,0 % The relative frequency of repeatability is not more than 2.0 %	80	1,79
			100	1,75
			120	1,67
2	Промежуточная прецизионность Intermediate precision	Относительное СКО промежуточной прецизионности не более 2,5 % The relative SD of intermediate precision is not more than 2.5 %	80	1,78
			100	1,68
			120	1,60
3	Правильность Accuracy	% восстановления от 95,0 до 105,0 % % recovery from 95.0 to 105.0 %	80	99,84
			100	99,62
			120	99,21

Таблица 4. Результаты валидации методики определения лития в субстанции

Table 4. Results of the validation of the method for determining lithium in the substance

№	Показатель Indicator	Критерий пригодности методики Criteria for the suitability of the methodology	Уровень содержания, % Content level, %	Фактическое значение СКО, % The actual value of the SD, %
1	Повторяемость Repeatability	Относительное СКО повторяемости не более 5,0 % The relative frequency of repeatability is not more than 5.0 %	80	2,13
			100	2,01
			120	1,85
2	Промежуточная прецизионность Intermediate precision	Относительное СКО промежуточной прецизионности не более 10 % The relative SD of intermediate precision is not more than 10 %	80	2,25
			100	2,21
			120	2,11
3	Правильность Accuracy	% восстановления от 95,0 до 105,0 % % recovery from 95.0 to 105.0 %	80	99,18
			100	99,37
			120	99,42

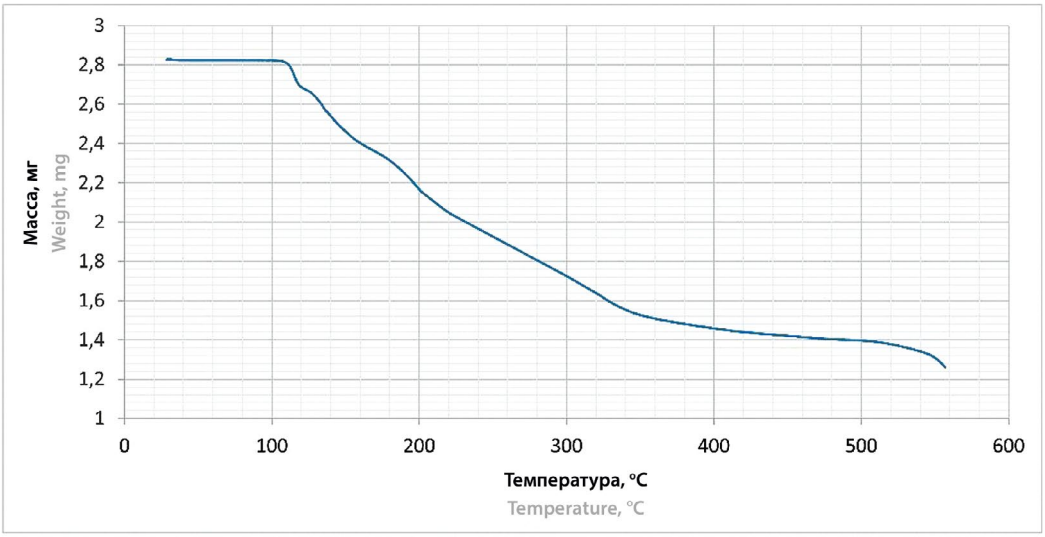


Рисунок 2. Термограмма ФС термогравиметрическим методом

Figure 2. Thermogram of the PS by the thermogravimetric method

грам проводили в постояннотоковом режиме съемки при линейной скорости развертки потенциала 30 мВ/с. После записи стабильных вольамперограмм фона вносили аликвоту раствора ФС объемом 0,1 мл и снимали вольтамперограмму в тех же условиях. Концентрацию субстанции оценивали по пиковым значениям анодного тока электроокисления при потенциале +0,5 В методом добавок ФС. Далее вносили добавку с ФС известной концентрации с расчетом на удвоение высоты пика тока электроокисления вещества. Далее проводили измерение в аналогичных параметрах системы.

Обработка результатов измерений. Среднеарифметическое значение тока вычисляли из не менее чем двух значений результатов измерений.

Массовую концентрацию X, мг/дм^3 ФС в анализируемой пробе вычисляли по формуле:

$$X = (I_1 \times C_{доб.} \times V_{доб.} \times V_1)/((I_2 - I_1) \times m \times V_2),$$

где I_1 – максимальный анодный ток электровосстановления вещества на вольтамперограмме для анализируемой пробы, мкА; $C_{доб.}$ – содержание вещества в добавке, мг/дм^3; $V_{доб.}$ – вносимый объем, см^3; V_1 – объем пробы, равный 100 см^3; I_2 – значение пикового тока для пробы с добавкой вещества, мкА; m – навеска пробы для анализа, г (или см^3); V_2 – объем взятой для измерения аликвоты, см^3.

Выполняли параллельные измерения проб X_1 и X_2. Расхождение между полученными результатами двух параллельных определений анализируемой пробы не должно превышать предела повторяемости (сходимости), приведенного в таблице 1, по формуле:

$$|X_1 - X_2| \le r.$$

Абсолютное значение предела повторяемости (сходимости) рассчитывали для среднеарифметического значения результатов двух параллельных определений по формуле:

$$X = (X_1 + X_2)/2, r \le 0{,}15X.$$

При выполнении данных условий значение X принимается за окончательный результат измерения. Испытуемый образец должен содержать от 95 до 105 % в пересчете на чистое вещество. Предел обнаружения субстанции составил 4,7 мкмоль/дм^3. Основные показатели валидации методики количественного определения ФС представлены в таблице 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка перспективных радиосенсибилизаторов является важным и необходимым этапом повышения эффективности лучевой терапии и в конечном итоге улучшении прогноза лечения онкологических заболеваний. В ходе работы исследован ряд параметров, регламентируемых Государственной фармакопеей РФ для стандартизации ФС, в том числе описание, растворимость, подлинность, температура плавления, количественное определение и другие. По каждому параметру получены экспериментальные числовые значения, на основании которых разработан проект спецификации на ФС литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты (таблица 6). Полученные результаты позволяют провести всестороннюю характеристику ФС и оценить параметры качества продукта, что создает основу для получения лекарственной формы и дальнейшего изучения свойств для создания лекарственного препарата с радиосенсибилизирующим действием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы синтезированы опытные образцы литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты и проведена ее стандартизация в качестве фармацевтической субстанции в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ.

Таблица 5. Результаты валидации методики количественного определения субстанции

Table 5. Results of the validation of the method for the quantitative

№	Показатель Indicator	Критерий пригодности методики Criteria for the suitability of the methodology	Уровень содержания, % Content level, %	Фактическое значение СКО, % The actual value of the SD, %
1	Повторяемость Repeatability	Относительное СКО повторяемости не более 5,0 % The relative frequency of repeatability is not more than 5.0 %	80	3,42
			100	3,25
			120	2,77
2	Промежуточная прецизионность Intermediate precision	относительное СКО промежуточной прецизионности не более 10 % The relative SD of intermediate precision is not more than 10 %	80	4,22
			100	4,16
			120	3,96
3	Правильность Accuracy	% восстановления от 95,0 до 105,0 % % recovery from 95.0 to 105.0 %	80	97,37
			100	97,69
			120	97,83

Таблица 6. Проект спецификации на ФС литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты

Table 6. Draft specification for PS of the lithium salt of 2,3-dehydro-L-gulonic acid gamma-lactone

Показатель Indicator	Методы Methods	Нормы Norms
1	2	3
Описание: Description:	Визуально Visually	Белый или почти белый порошок, без запаха White or almost white powder, odorless
Растворимость Solubility	ГФ РФ SP RF	Легко растворим в воде, не растворим в спирте этиловом и ацетонитриле It is easily soluble in water, insoluble in ethyl alcohol and acetonitrile
Подлинность ИК Authenticity of the IR spectrum	ГФ РФ SP RF	ИК-спектр исследуемого вещества должен совпадать со спектром стандартного образца и иметь характеристичные максимумы: 1586, 1387, 1149, 1122, 1076 и 1059 см$^{-1}$ The IR spectrum of the test substance must coincide with the spectrum of the standard sample and have characteristic maxima: 1586, 1387, 1149, 1122, 1076 and 1059 cm^{-1}
УФ UV	ГФ РФ SP RF	В УФ-спектре исследуемого вещества должен наблюдаться максимум поглощения при длине волны 265 нм In the UV spectrum of the substance under study, an absorption maximum should be observed at a wavelength of 265 nm

Окончание таблицы 6

Показатель **Indicator**	**Методы** **Methods**	**Нормы** **Norms**
1	**2**	**3**
Качественная реакция на литий Qualitative reaction to lithium	ГФ РФ SP RF	Препарат должен окрашивать пламя горелки в интенсивный темно-красный цвет The preparation should color the flame of the burner in an intense dark red color
Качественная реакция на аскорбат Qualitative reaction to ascorbate	ГФ РФ SP RF	1 мл 5%-го раствора субстанции должен обесцвечивать 2 мл 0,1 М раствора йода 1 ml of 5 % solution of the substance should discolor 2 ml of 0.1 M iodine solution
Температура плавления Melting point	ГФ РФ, метод 1 SP RF, method 1	126–128 °С
Показатель преломления Refractive index	ГФ РФ SP RF	Показатель преломления 5%-го раствора должен быть 1,3370–1,3374 The refractive index of the 5 % solution should be 1,3370–1,3374
Удельное вращение Specific rotation	ГФ РФ SP RF	+10,1 – +10,5
Прозрачность раствора Transparency of the solution	ГФ РФ SP RF	5%-й раствор субстанции должен выдерживать сравнение с водой очищенной A 5 % solution of the substance should be compared with purified water
Цветность раствора The color of the solution	ГФ РФ SP RF	5%-й раствор субстанции должен выдерживать сравнение с водой очищенной A 5 % solution of the substance should be compared with purified water
pH	ГФ РФ SP RF	7,8–8,4
Сульфатная зола Sulphate ash	ГФ РФ SP RF	Не более 28 % No more than 28 %
Тяжелые металлы Heavy metals	ГФ РФ, метод 2 SP RF, method 2	Не более 0,0005 % Not more than 0,0005 %
Посторонние примеси (оксалаты) Foreign impurities (oxalates)	ГФ РФ SP RF	Должно выдерживать испытание Must stand the test
Литий Lithium	ГФ РФ SP RF	2,89–3,53 %
Вода Water	ГФ РФ, метод Фишера SP RF, Fischer 's method	16,5 % (дигидрат) 16,5 % (dihydrate)
Остаточные органические растворители Residual organic solvents	ГФ РФ, ГХ SP RF, GC	Изопропиловый спирт – не более 5 мг/г Isopropyl alcohol – no more than 5 mg/g
Количественное определение Quantitative determination	В соответствии с НД In accordance with the ND	От 95,0 до 105,0 % From 95,0 to 105,0 %
Микробиологическая чистота Microbiological purity	ГФ РФ SP RF	Общее число аэробных микроорганизмов не более 10^4 КОЕ в 1 г Общее число дрожжевых и плесневых грибов не более 10^2 КОЕ в 1 г Энтеробактерий, устойчивых к желчи, – не более 10^2 КОЕ в 1 г Отсутствие *E.coli, S. aureus, P. aeruginosa* в 1 г Отсутствие *Salmonella spp.*в 25 г The total number of aerobic microorganisms is not more than 10^4 CFU in 1 g The total number of yeast and mold fungi is not more than 10^2 CFU in 1 g *Enterobacteria* resistant to bile – no more than 10^2 CFU in 1 g Absence of *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa* in 1 g Absence of *Salmonella spp.* in 25 g

ЛИТЕРАТУРА

1. Tondo L., Alda M., Bauer M., Bergink V., Grof P., Hajek T., Lewitka U., Licht R. W., Manchia M., Müller-Oerlinghausen B., Nielsen R. E., Selo M., Simhandl C., Baldessarini R. J. Clinical use of lithium salts: guide for users and prescribers. *International Journal of Bipolar Disorders*. 2019;7(1):16. DOI: 10.1186/s40345-019-0151-2.
2. Plotnikov E. V., Voronova O. A. ,Linert W., Martemianov D., Korotkova E., Dorozhko E. V., Astashkina A., Martemianova I., Ivanova S., Bokhan N. Antioxidant and Immunotropic Properties of some Lithium Salts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6:086–089. DOI: 10.7324/JAPS.2016.600115.
3. Плотников Е. В., Литвак М. М. Применение аскорбата лития в качестве церебропротективного средства на модели ишемиче-

ского инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова* 2020;120(3–2):29–32. DOI: 10.17116/jnevro202012003229.
4. Plotnikov E. V., Losenkov I., Epimakhova E., Bohan N. Protective Effects of Pyruvic Acid Salt Against Lithium Toxicity and Oxidative Damage in Human Blood Mononuclear Cells. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(2):302–306. DOI: 10.15171/apb.2019.035.
5. Plotnikov E. V., Korotkova E., Voronova O. A., Dorozhko E., Bohan N. Plotnikov S. Lithium-based antioxidants: electrochemical properties and influence on immune cells. *Physiology and Pharmacology*. 2015;19(2):107–113.
6. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189.
7. 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.
8. Tretayakova M. S., Brazovskii K. S., Belousov M. V, Artamonov A., Stuchebrov S., Gogolev A., Larkina M. S, Sukhikh E., Plotnikov E. V., Radiosensitizing Effects of Lithium Ascorbate on Normal and Tumor Lymphoid Cells under X-ray Irradiation. *Current Bioactive Compounds*. 2023;19(8). DOI: 10.2174/1573407219666230503094421.
9. Kaźmierczak-Barańska J., Boguszewska K., Adamus-Grabicka A., Karwowski B. T. Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients*. 2020;12(5). DOI: 10.3390/nu12051501.
10. Sotler R., Poljšak B., Dahmane R., Jukić T., Pavan Jukić D., Rotim C., Trebše P., Starc A. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta Clinica Croatica*. 2019;58(4):726–736. DOI: 10.20471/acc.2019.58.04.20.
11. Cameron E., Pauling L. Cancer and Vitamin C: A Discussion of the Nature, Causes, Prevention, and Treatment of Cancer with Special Reference to the Value of Vitamin C. Philadelphia: Camino Books; 1993. 278 p.
12. Государственная фармакопея РФ. М.: Министерства здравоохранения РФ; 2018.
13. Umer A., Naveed S., Ramzan N., Rafique M. S., Imran M. A green method for the synthesis of Copper Nanoparticles using L-ascorbic acid. *Matéria (Rio de Janeiro)*. 2014;19(3):197–203. DOI: 10.1590/S1517-70762014000300002.

REFERENCES

1. Tondo L., Alda M., Bauer M., Bergink V., Grof P., Hajek T., Lewitka U., Licht R. W., Manchia M., Müller-Oerlinghausen B., Nielsen R. E., Selo M., Simhandl C., Baldessarini R. J. Clinical use of lithium salts: guide for users and prescribers. *International Journal of Bipolar Disorders*. 2019;7(1):16. DOI: 10.1186/s40345-019-0151-2.
2. Plotnikov E. V., Voronova O. A. ,Linert W., Martemianov D., Korotkova E., Dorozhko E. V., Astashkina A., Martemianova I., Ivanova S., Bokhan N. Antioxidant and Immunotropic Properties of some Lithium Salts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6:086–089. DOI: 10.7324/JAPS.2016.600115.
3. Plotnikov E. V., Litvak M. M. Lithium ascorbate as a cerebroprotective agent in a model of ischemic stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S. S. Korsakova*. 2020;120(3–2):29–32. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro202012003229.
4. Plotnikov E. V., Losenkov I., Epimakhova E., Bohan N. Protective Effects of Pyruvic Acid Salt Against Lithium Toxicity and Oxidative Damage in Human Blood Mononuclear Cells. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(2):302–306. DOI: 10.15171/apb.2019.035.
5. Plotnikov E. V., Korotkova E., Voronova O. A., Dorozhko E., Bohan N. Plotnikov S. Lithium-based antioxidants: electrochemical properties and influence on immune cells. *Physiology and Pharmacology*. 2015;19(2):107–113.
6. 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-185-189.
7. 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.
8. Tretayakova M. S., Brazovskii K. S., Belousov M. V, Artamonov A., Stuchebrov S., Gogolev A., Larkina M. S, Sukhikh E., Plotnikov E. V., Radiosensitizing Effects of Lithium Ascorbate on Normal and Tumor Lymphoid Cells under X-ray Irradiation. *Current Bioactive Compounds*. 2023;19(8). DOI: 10.2174/1573407219666230503094421.
9. Kaźmierczak-Barańska J., Boguszewska K., Adamus-Grabicka A., Karwowski B. T. Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients*. 2020;12(5). DOI: 10.3390/nu12051501.
10. Sotler R., Poljšak B., Dahmane R., Jukić T., Pavan Jukić D., Rotim C., Trebše P., Starc A. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta Clinica Croatica*. 2019;58(4):726–736. DOI: 10.20471/acc.2019.58.04.20.
11. Cameron E., Pauling L. Cancer and Vitamin C: A Discussion of the Nature, Causes, Prevention, and Treatment of Cancer with Special Reference to the Value of Vitamin C. Philadelphia: Camino Books; 1993. 278 p.
12. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.)
13. Umer A., Naveed S., Ramzan N., Rafique M. S., Imran M. A green method for the synthesis of Copper Nanoparticles using L-ascorbic acid. *Matéria (Rio de Janeiro)*. 2014;19(3):197–203. DOI: 10.1590/S1517-70762014000300002.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-134-142
UDC 615.072

Check for updates

CC BY 4.0

Research article / Оригинальная статья

Identification and Quantitative Determination of Flavonoids by HPLC-UV Method in the Raw Materials of Some Representatives of the Genus *Rumex* of Three Vegetation Time

Andrey M. Poluyanov[1, 2, 3]✉, Anna Yu. Sokolova[1, 3], Anna-Daniela Koynova[1, 3], Sofia D. Kulikova[1, 2, 3], Evgeniya A. Malashenko[2, 3], Natalia V. Bobkova[3, 4]

[1] LLC "Scientific Compliance" (LLC «SC»). 19, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
[2] LLC "Center for Pharmaceutical Analytics" (LLC «CPHA»). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
[3] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[4] Lomonosov Moscow State University. Faculty of Fundamental Medicine. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia

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

ORCID: Andrey M. Poluyanov – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; Anna Yu. Sokolova – https://orcid.org/0000-0002-7500-5880; Anna-Daniela Koynova – https://orcid.org/0009-0003-8969-8854; Sofia D. Kulikova – https://orcid.org/0009-0001-7712-3418; Evgeniya A. Malashenko – https://orcid.org/0000-0002-4183-7822; Natalia V. Bobkova – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019.

Received: 11.07.2023 **Revised:** 21.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. The study of the dynamics of accumulation of biologically active substances (hereinafter – BAS) in relation to the phenological phases of plant development is of great scientific and practical interest. The quantitative content of aglycones and glycosides of flavonoids depends on the life cycle of the plant and its vegetation phase.

Aim. To identify and quantify flavonoids in the underground organs of *Rumex confertus* Willd., *Rumex aquaticus* L., *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. harvested during different phases of vegetation.

Materials and methods. Extracts from the underground organs of the studied plants, obtained according to the method from the pharmacopoeial article on *R. confertus*, were analyzed. Chromatographic separation and detection were performed on a Nexera-i LC-2040 high-performance liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan). The chromatograph was equipped with a column thermostat, chromatography column Grace HPLC-COLUMN 250 × 4.6mm platinum C8-EPS 5 mm (Grace, США) and Guard column Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges Widepore C18 4 × 3,0 mm, a degasser, an autosampler (injection volume: 10 µl), and an ultraviolet detector. Detection was carried out at a wavelength λ = 365 ± 2 nm. Mobile phase contains 0.1 % phosphoric acid in water (v/v) (eluent A); acetonitrile (eluent B) with flow rate: 0.9 ml/min.

Results and discussion. All studied objects were analyzed. The authenticity of the substances contained were confirmed using the external standard, and their quantitative content was determined. The discovered and quantified substances were: 3-O-rutinoside of quercetin (rutin), 3-O-rutinoside of isorhamnetin (narcissin), 3-O-glucoside of kaempferol (astragalin), luteolin, kaempferol and isorhamnetin. 7-O-glucoside of luteolin (cynaroside) and 7-O-beta-D-glucoside apigenin (cosmosiin) were not found. The aglycone luteolin had the biggest share in the total quantitative content of flavonoids. It is noted that this aglycone is contained in larger quantities in relation to other flavonoids in all studied objects, regardless of the phase of vegetation.

Conclusion. In the process of the research, a method for the quantitative determination of flavonoids in alcohol-water extracts was developed. Aglycones and glycosides of flavonoids were identified and quantified in the underground organs of *R. confertus* Willd., *R. aquaticus* L., *R. crispus* L. and *R. obtusifolius* L. of three different vegetations.

Keywords: flavonoids, HPLC-UV, underground organs, *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *R. aquaticus*

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 Natalia V. Bobkova invented and designed the experiment. Andrey M. Poluyanov, Anna Yu. Sokolova and Anna-Daniela Koynova analyzed the objects by HPLC-UV. Andrey M. Poluyanov, Evgeniya A. Malashenko and Sofia D. Kulikova participated in data processing. Andrey M. Poluyanov, Evgeniya A. Malashenko and Natalia V. Bobkova participated in writing the text of the article. All authors participated in discussion of the results.

Acknowledgment. The team of authors is grateful to Igor E. Shohin CEO LLC "CPHA" for support at all stages of scientific work.

For citation: Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Koynova A.-D., Kulikova S. D., Malashenko E. A., Bobkova N. V. Identification and quantitative determination of flavonoids by HPLC-UV method in the raw materials of some representatives of the genus *Rumex* of three vegetation time. *Drug development & registration*. 2023;12(3):134–142. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-134-142

Идентификация и количественное определение флавоноидов методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации

А. М. Полуянов[1, 2, 3]✉, А. Ю. Соколова[1, 3], А.-Д. Койнова[1, 3], С. Д. Куликова[1, 2, 3], Е. А. Малашенко[2, 3], Н. В. Бобкова[3, 4]

© Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Koynova A.-D., Kulikova S. D., Malashenko E. A., Bobkova N. V., 2023
© Полуянов А. М., Соколова А. Ю., Койнова А.-Д., Куликова С. Д., Малашенко Е. А., Бобкова Н. В., 2023

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс» (ООО «СК»). 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 19
[2] Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»). 117246, Россия, Москва, Симферопольский, д. 8
[3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). Факультет фундаментальной медицины. 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1

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

ORCID: А. М. Полуянов – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; А. Ю. Соколова – https://orcid.org/0000-0002-7500-5880;
А.-Д. Койнова – https://orcid.org/0009-0003-8969-8854; С. Д. Куликова – https://orcid.org/0009-0001-7712-3418;
Е. А. Малашенко – https://orcid.org/0000-0002-4183-7822; Н. В. Бобкова – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019.

Статья поступила: 11.07.2023 **Статья принята в печать:** 21.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Изучение динамики накопления биологически активных веществ (далее – БАВ) применительно к фенологическим фазам развития растений представляет большой научный и практический интерес. Количественное содержание агликонов и гликозидов флавоноидов зависит от жизненного цикла растения и фазы его вегетации.

Цель. Идентификация и количественное определение флавоноидов в подземных органах *Rumex confertus* Willd., *Rumex aquaticus* L., *Rumex crispus* L. и *Rumex obtusifolius* L., собранных в разные фазы вегетации.

Материалы и методы. Извлечения из подземных органов изучаемых растений были получены по методике из фармакопейной статьи на *R. confertus*. Хроматографическое разделение и детектирование осуществляли на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония). Хроматограф оснащён колоночным термостатом, хроматографической колонкой Grace HPLC-COLUMN 250 × 4,6 мм платина C8-EPS 5 мм (Grace, США) и колонкой Guard Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges Widepore C18 4 × 3,0 мм, дегазатором, автосамплером (объем ввода: 10 мкл) и ультрафиолетовым детектором. Детектирование проводили при длине волны λ = 365 ± 2 нм. Подвижной фазой была смесь 0,1%-й фосфорной кислоты в воде (об./об.) (элюент А); ацетонитрил (элюент В), скорость потока: 0,9 мл/мин.

Результаты и обсуждение. Все исследуемые объекты были проанализированы, с помощью внешнего стандарта была подтверждена подлинность содержащихся веществ и рассчитано их количественное содержание. Для веществ, которые были идентифицированы – проведена количественная оценка, среди них: 3-О-рутинозид кверцитина (рутин), 3-О-рутинозид изорамнитина (нарциссин), 3-О-гликозид кемпферола (астрагалин), лютеолин, кемпферол и изорамнитин. 7-О-гликозид лютеолина (цинарозид) и 7-О-β-D-гликозид апигенина (космосиин) не обнаружены. Наибольший вклад в общее содержание флавоноидов вносит агликон – лютеолин. Отмечено, что этот агликон содержится в большем количестве по сравнению с другими флавоноидам во всех исследованных объектах, независимо от фазы вегетации.

Заключение. В процессе исследования разработана методика количественного определения флавоноидов в водно-спиртовых экстрактах. В подземных органах Щ. конского, Щ. водного, Щ. курчавого и Щ. туполистного трёх различных вегетаций были идентифицированы и количественно определены агликоны и гликозиды флавоноидов.

Ключевые слова: флавоноиды, ВЭЖХ-УФ, подземные органы, *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *R. aquaticus*

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

Вклад авторов. А. М. Полуянов и Н. В. Бобкова придумали и разработали эксперимент. А. М. Полуянов, А. Ю. Соколова и А.-Д. Койнова анализировали объекты на ВЭЖХ-УФ. А. М. Полуянов, Е. А. Малашенко и С. Д. Куликова принимали участие в обработке данных. А. М. Полуянов, Е. А. Малашенко и Н. В. Бобкова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Коллектив авторов выражает благодарность И. Е. Шохину генеральному директору ООО «ЦФА» за поддержку на всех этапах научной работы.

Для цитирования: Полуянов А. М., Соколова А. Ю., Койнова А.-Д., Куликова С. Д., Малашенко Е. А., Бобкова Н. В. Идентификация и количественное определение флавоноидов методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):134–142. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-134-142

INTRODUCTION

The discovery of new medicinal plant raw materials sources becomes an important goal of scientific society. To incorporate a new plant species as a medicinal herb source, it is necessary to identify and quantify the substances contained in it using the cutting-edge technology.

Representatives of the *Rumex* genus of the *Polygonaceae* family, which are widespread throughout the world, contain a few biologically active substances (hereinafter- BAS): quinones, flavonoids, tannins, terpenes, terpene alkaloids, lignans, carotenoids, ascorbic acid, and anthracene derivatives [1]. According to meta-studies, raw materials from representatives of the genus *Rumex* (hereinafter – *R.*) can be used for: mild forms of diabetes, constipation, various infections, diarrhea, jaundice; as an antihypertensive agent and hepatoprotector [2].

Polyphenols are an important group of BAS, contained in the raw materials of representatives of the *Rumex* genus, famous for their antioxidant activity and the ability to form chelate complexes with metals [3]. The group of polyphenols includes, among others, such

substances as flavonoids and isoflavonoids, which therapeutic potential is being widely discussed in the context of their antioxidant activity, anti-aging properties, anti-inflammatory activity, immunomodulatory activity and cardioprotective effects [4]. The content of flavonoids is usually studied in such species of the *Rumes* genus, as: *R. acetosa, R. hastatus, R. aquaticus, R. chalepensis, R. crispus, R. dentatus, R. gmelini, R. japonicus, R. vesicarius, R. luminiastrum, R. patientia, R. pictus, R. rechingerianus, R. acetosaella, R. confertus* [5].

In Russia, the only representative of the genus *Rumex – R. confertus –* has been described as a medicinal plant raw material-a source of anthracene derivatives; the raw material being used are the roots. The information about the total flavonoids content (TFC) in the underground organs of *R. confertus* is scarce, however there is some data about the TFC in leaves of this species: 3.8 ± 0.2 % [6].

The study underground organs of some *Rumex* species, widespread in Russia, is of great practical and scientific interest, the species being: *R. crispus, R. obtusifolius, R. aquaticus*. The TFC in the leaves of these species is presented in the Table 1.

Table 1. TFC in the leaves of studied R.species, according to the literature

Rumex species	TFC, % [7]
R. crispus	9.2 ± 0.5
R. obtusifolius	9.2 ± 0.4
R. aquaticus	No data available

According to the literature, there is a discrepancy between the period of maximum content of various groups of BAS in underground organs and the generally accepted time of their harvesting [7, 8]. In this regard, it is especially important to conduct a comparative analysis of the dynamics of the accumulation of flavonoids in Rumex species, depending on their stage of vegetation.

Therefore, the purpose of this study is to identify and quantify flavonoids in the underground organs of *R. confertus Willd, R. aquaticus L., R. crispus L.* and *R. obtusifolius L.* harvested during different phases of vegetation.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The following reagents were used during the research: acetonitrile, "for UHPLC" grade (PanReac, Spain); phosphoric acid, "for HPLC" grade (Scharlau, Spain); ethanol 95 % chemically pure grade (LLC TD "HIMMED", Russia); demineralized water, purity class I. Stock standard solutions were prepared by dissolving an exact sample weight of the substance in 95 % pure ethanol.

Equipment

The determination of the moisture content of the crushed underground organs was carried out on an Ohaus MB27 moisture content analyzer (Ohaus, USA).

Objects of study

The underground organs of *Rumex confertus* Willd., *Rumex aquaticus L., Rumex crispus L.* and *Rumex obtusifolius L.* were collected for this study. They were harvested during the spring regrowth period (April-May 2022) – (hereinafter – "regrowth"), during the flowering period (June-July 2021) – (hereinafter – "flowering"), during the withering period of the aerial part (October 2021) – (hereinafter – "overhead part dieback"). All the objects' data are presented in Table 2.

The harvested underground organs were washed with cold water. Before drying, the more massive underground organs were divided lengthwise into two parts. Drying was carried out at room temperature in a well-ventilated area, with no access to sunlight. The moisture content of the dried raw materials was determined using a moisture meter and did not exceed 13 %. Water-alcohol extracts were obtained from raw materials with a ratio of 1 g sample of medicinal plant materials in 50 ml of extractant.

Chromatographic separation and detection were performed on a Nexera-i LC-2040 high-performance liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan) equipped with a column thermostat, chromatography column Grace HPLC-COLUMN 250 × 4.6 mm platinum C8-EPS 5 mm (Grace, США) and Guard column Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges Widepore C18 4 × 3,0 mm, a degasser, an autosampler (injection volume: 10 µl), and an ultraviolet detector. Detection was carried out at a wavelength λ = 365 ± 2 nm. Mobile phase contains 0.1 % phosphoric acid in water (v/v) (eluent A); acetonitrile (eluent B) with flow rate: 0.9 ml/min. The composition gradient of the mobile phase is shown in Figure 1.

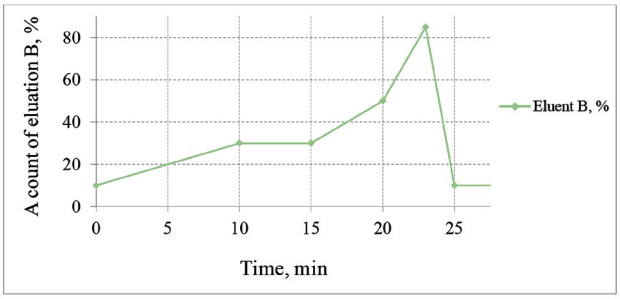


Figure 1. Gradient elution scheme

The primary data were processed using LabSolutions Single LC software (Shimadzu Corporation, Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

Method development

To identify and determine the quantitative content of the BAS, the HPLC-UV method was chosen. The conditions for chromatographic separation were adjusted

Table 2. **Objects of research.**

Object of research	Photo of underground organs	Vegetative phase, harvesting period	Harvesting place
Rumex confertus Willd.		regrowth, April 2022	Rogovskoye, Moscow, Russia Coordinates: 55.245626, 37.009576
		flowering, June 2021	
		dieback, October 2021	
Rumex crispus L.		regrowth, April 2022	Krasnopakhorskoye settlement Moscow, Russia Coordinates: 55.384859, 37.225441
		flowering, June 2021	
		dieback, October 2021	
Rumex obtusifolius L.		regrowth, April 2022	Rogovskoye settlement, Moscow, Russia Coordinates: 55.245626, 37.009576
		flowering, June 2021	
		dieback, October 2021	
Rumex aquaticus L.		regrowth, April 2022	Rogovskoye settlement, Moscow, Russia Coordinates: 55.245626, 37.009576
		flowering, July 2021	
		dieback, October 2021	

experimentally, based on previous studies and publications [9]. The flow rate and gradient scheme were changed as well as the usage of phosphoric acid as a modifier was favored over the formic acid, Figure 2 shows chromatogramms of standard solutions of substances used in the experiment, Figure 3 shows chromatogramms of extracts from underground organs of the studied objects of various phases of vegetation.

For all the studied objects, the values of the quantitative content of flavonoids in terms of absolutely dry raw materials, in%, were calculated and presented in Table 3.

Cynaroside and cosmosiin were not found in any of the objects. The Table 4 compares the content of some flavonoids in different species.

The aglycone luteolin has the biggest share in the total quantitative content of flavonoids. It is noted that this aglycone is contained in larger quantities in relation to other flavonoids in all studied objects, regardless of the vegetation phase. Meanwhile, the luteolin glycoside was not found in any of the objects.

The total content of detected flavonoids in each species was calculated for each vegetation phase in Table 5 and shown in Figure 4.

The total value allows us to conclude that the content of substances from the group of flavonoids is quite low. For three representatives of the *R.* genus, the highest content of flavonoids was noted in the flowering phase, the exception being R. *confertus*. The content of the studied flavonoids in *R. aquaticus* in the flowering phase is twice as high as in the other studied species.

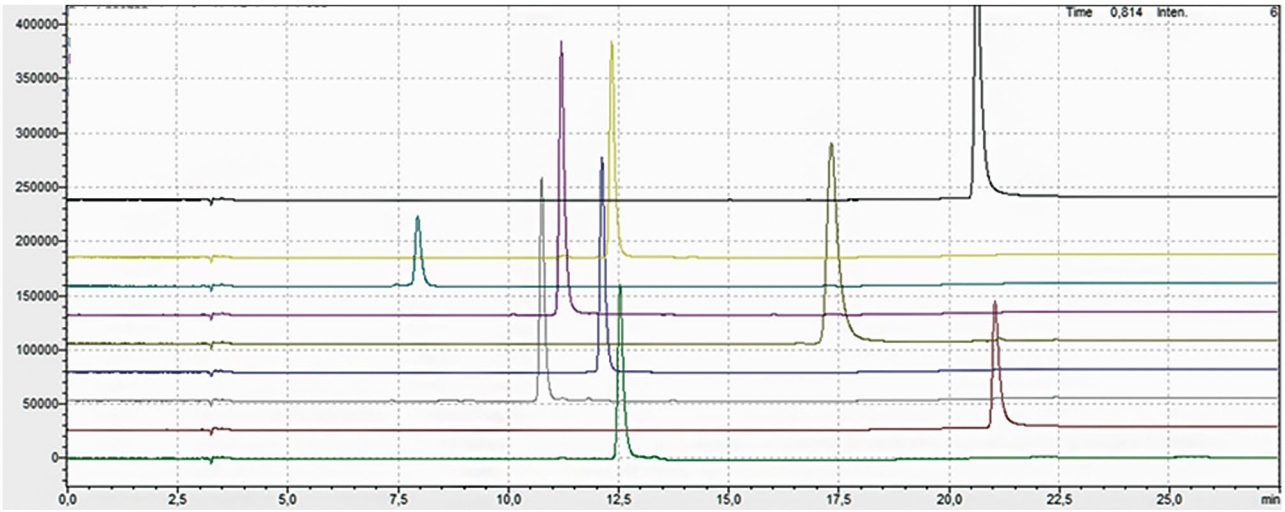
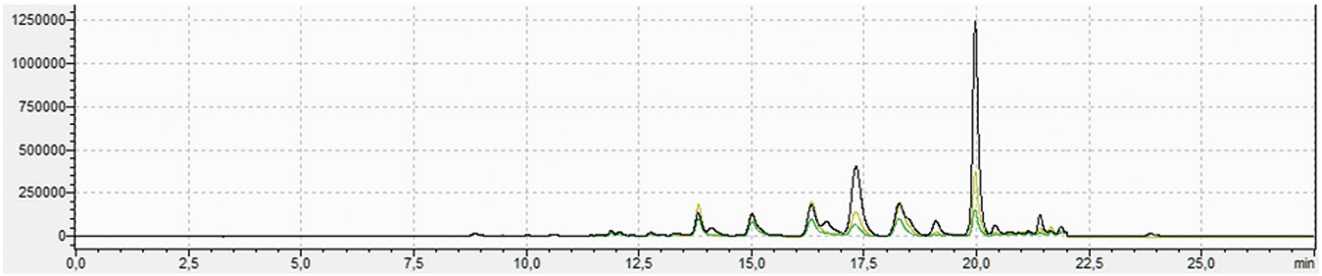


Figure 2. **Chromatogramms of standard solutions of substances**

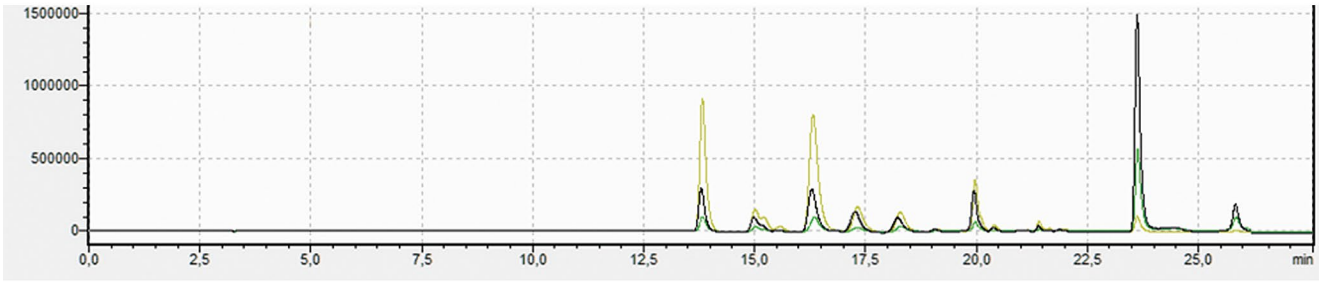
Table 3. **Content of the amount of certain flavonoids, in %**

Vegetation phase	The content of the amount of certain flavonoids, in %			
	R. confertus	***R. crispus***	***R. obtusifolius***	***R. aquaticus***
The content of narcissin, in %				
Regrowth	–	0.003 ±0.001	0.009 ±0.001	0.025 ±0.001
Flowering	0.008 ± 0.001	0.011 ±0.002	0.016 ±0.002	0.054 ±0.003
Dieback	0.002 ± 0.001	0.002 ±0.001	0.006 ±0.001	0.028 ±0.001
The content of rutin, in %				
Regrowth	–	0.004 ± 0.001	–	0.029 ± 0.001
Flowering	–	0.003 ± 0.001	–	0.023 ± 0.001
Dieback	–	0.002 ± 0.001	–	0.026 ± 0.001
The content of luteolin, in %				
Regrowth	0.409 ± 0.023	0.056 ± 0.004	0.138 ± 0.009	0.298 ± 0.029
Flowering	0.323 ± 0.011	0.305 ± 0.030	0.383 ± 0.018	0.888 ± 0.034
Dieback	0.059 ± 0.003	0.022 ± 0.001	0.018 ± 0.003	0.138 ± 0.012
The content of isorhamnetin, in %				
Regrowth	0.019 ± 0.002	0.027 ± 0.003	0.017 ± 0.001	0.065 ± 0.001
Flowering	0.008 ± 0.001	0.026 ± 0.001	0.020 ± 0.001	0.025 ± 0.001
Dieback	0.005 ±0.001	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.011 ± 0.001
The content of astragalin, in %				
Regrowth	–	0.026 ± 0.001	0.023 ± 0.001	0.005 ± 0.001
Flowering	–	0.002 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.004 ± 0.001
Dieback	–	0.004 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.004 ± 0.001
The content of kaempferol, in %				
Regrowth	0.003 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.010 ± 0.001
Flowering	0.002 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.013 ± 0.001
Dieback	–	–	0.002 ± 0.001	0.005 ± 0.001

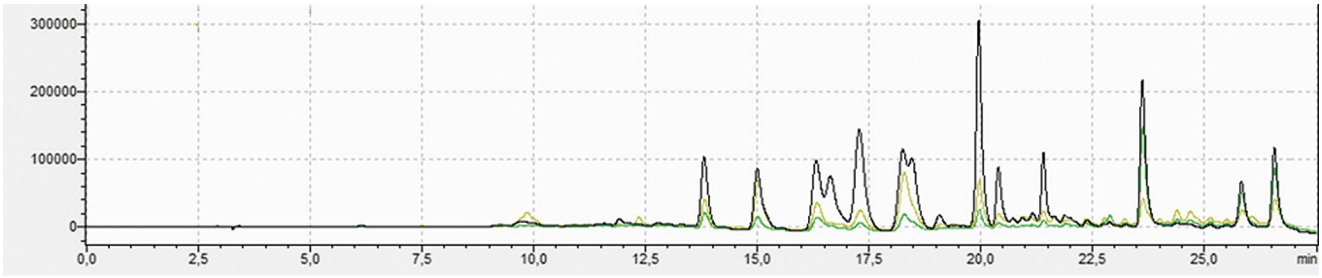
Note. The percentage value is indicated as the arithmetic mean ± standard deviation.



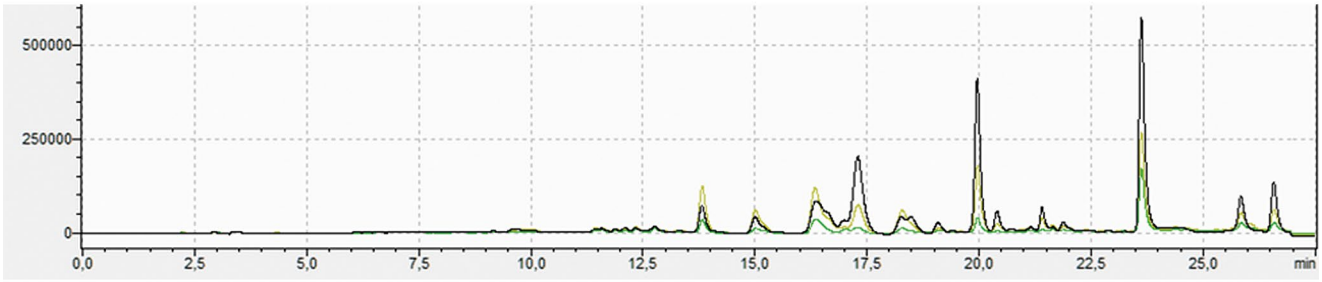
A



B



C



D

Figure 3. Chromatogramms of the extracts from the underground organs.

A – *Rumex aquaticus* L.; B – *Rumex confertus* Willd.; C – *Rumex crispus* L.; D – *Rumex obtusifolius* L. The black line is the flowering phase, the green line is the end of the growing season, the yellow line is the beginning of the growing season

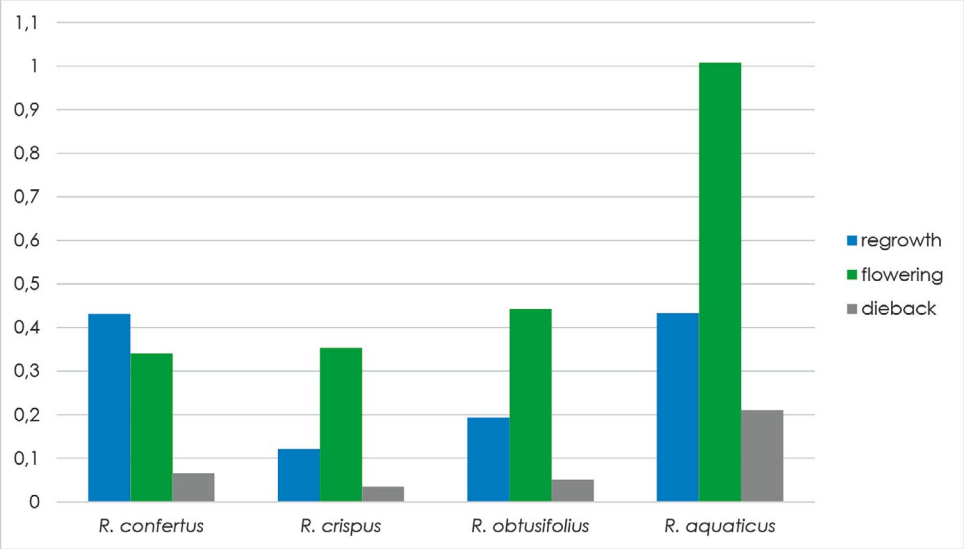
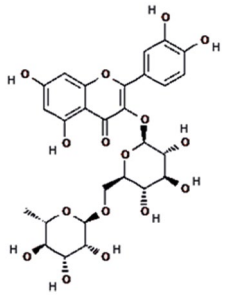
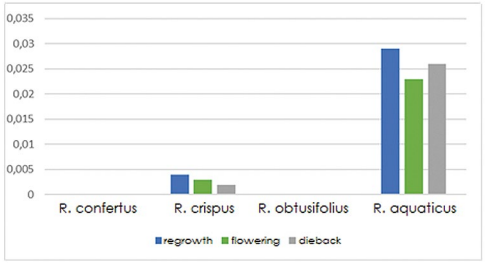
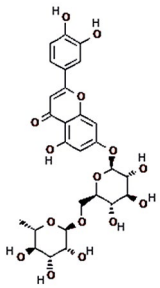
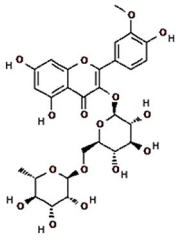
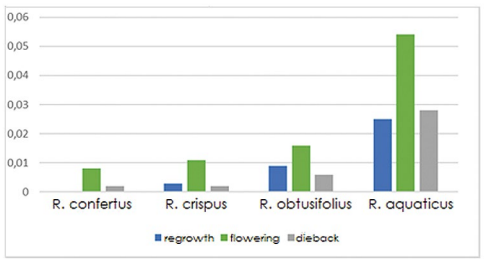


Figure. 4. **Diagram of the total quantitative content of flavonoids**

Table 4. **Physical and chemical properties of the analyzed substances**

Compound	Structural formula	Content
3-O-rutinoside of quercetin (rutin)		
7-O-glucoside of luteolin (cynaroside)		Not found in any of the objects
3-O-rutinoside of isorhamnetin (narcissin)		

End of table 4

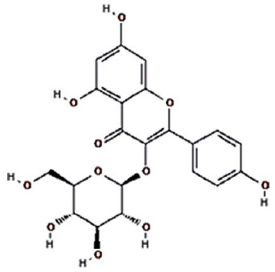
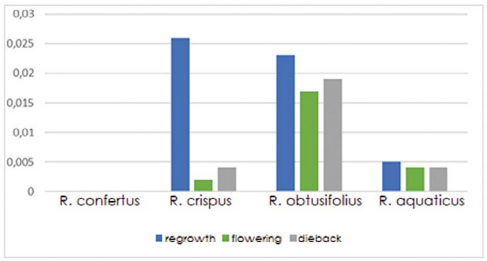
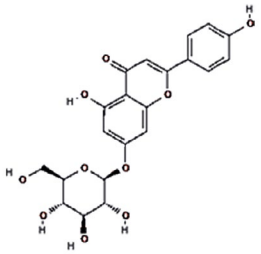
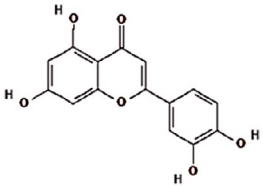
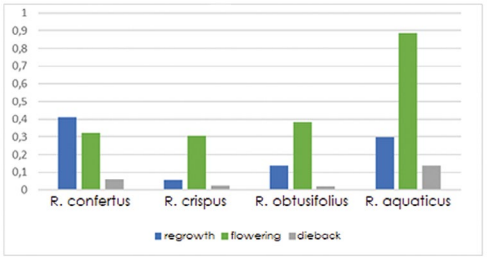
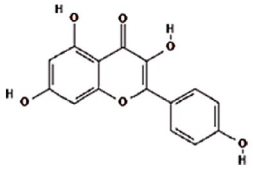
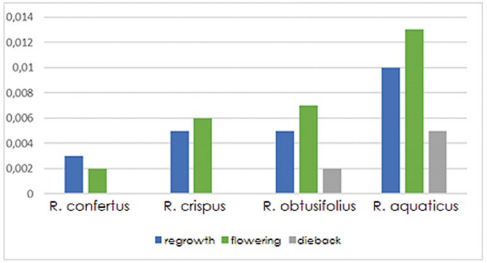
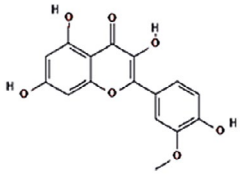
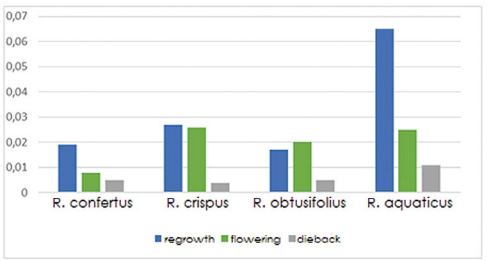
Compound	Structural formula	Content
3-O-glucoside of kaempferol (astragalin)		
7-O-beta-D-glucoside apigenin (cosmosiin)		Not found in any of the objects
Luteolin		
Kaempferol		
Isorhamnetin		

Table 5. The content of certain flavonoids, in %

Vegetation phase	*R. confertus*	*R. crispus*	*R. obtusifolius*	*R. aquaticus*
Spring regrowth	0,431	0,121	0,194	0,433
Flowering	0,341	0,353	0,443	1,008
Aboveground part dieback	0,066	0,035	0,051	0,211

It can be noted that there is a trend of low content in the overhead part dieback. The results obtained allow us to judge the prospects for further study of the dynamics of BAS accumulation in representatives of the genus Rumex in underground organs, depending on the phenological phase of the plant.

CONCLUSION

In the process of the research, a method for the quantitative determination of flavonoids in alcohol-water extracts was developed. The method allows to determine the presence of accurately and reliably one of the BAS groups – flavonoids. The discovered and quantified substances were: 3-O-rutinoside of quercetin (rutin), 3-O-rutinoside of isorhamnetin (narcissin), 3-O-glucoside of kaempferol (astragalin), luteolin, kaempferol and isorhamnetin. 7-O-glucoside of luteolin (cynaroside) and 7-O-beta-D-glucoside apigenin (cosmosiin) were not found.

REFERENCES

1. Li J.-J.., Li Y.-X., Li N.,Zhu H.-T., Wang D., Zhang 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.
2. Vasas A., Orbán-Gyapai O., Hohmann J. The Genus Rumex: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;175:198–228 DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.001.
3. Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Huđek A., Bačun-Družina V., Komes D. Overview of polyphenols and their properties. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. 2018;3–44. DOI: 10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4.
4. Jucá M. M., Cysne Filho F. M. S., de Almeida J. C., da Silva Mesquita D., de Moraes Barriga J. R., Ferreira Dias K. C., Barbosa T. M., Costa Vasconcelos L., Moreira Leal L. K. A., Ribeiro J. E., Mendes Vasconcelos S. M. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural Product Research*. 2020;34(5):692–705. DOI: 10.1080/14786419.2018.1493588.
5. Berillo D., Kozhahmetova M., Lebedeva L. Overview of the Biological Activity of Anthraquinons and Flavanoids of the Plant Rumex Species. *Molecules*. 2022;27(4):1204. DOI: 10.3390/molecules27041204.
6. Feduraev P., Skrypnik L., Nebreeva S., Dzhobadze, G., Vatagina A., Kalinina E., Pungin A., Maslennikov P., Riabova A., Krol O., Chupakhina G. Variability of Phenolic Compound Accumulation and Antioxidant Activity in Wild Plants of Some Rumex Species (Polygonaceae). *Antioxidants*. 2022;11(2):311. DOI: 10.3390/antiox11020311.
7. Feduraev P., Chupakhina G., Maslennikov P., Tacenko N., Skrypnik L. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from Rumex crispus L. and Rumex obtusifolius L. at Different Growth Stages. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(7):237. DOI: 10.3390/antiox8070237.
8. Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Malashenko E. A., Sergunova E. V., Bobkova N. V. Isolation, identification and quantitative determination of anthracene derivatives by HPLC-UV method in the raw materials of some representatives of the genus *Rumex* of three vegetation times. *Drug development & registration*. 2022;11(4):216–225. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-216-225.
9. Matvienko U. A., Durnova N. A., Poluyanov A. M., Bobkova N. V., Turenko V. N., Smirnov V. V., Ramenskaya G. V. Isolation and Identification of Aglicones of Flavonoids of Some Species of the Genus *Astragalus* L. of the Volga Region Flora. *Drug development & registration*. 2023;12(1):106–113. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-106-113.
10. Kotsupiy O. V., Zagurskaya Yu. V., Ufimtsev V. I. Determination of phenolic compounds in water-ethanol extracts of *Populus tremula* L. leaves using high-performance liquid chromatography. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):470–478 DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-470-478.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-143-150
УДК 615.322:579.61

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Антибактериальная активность эфирных масел тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.)

О. Г. Шаповал[1], А. С. Шереметьева[1]✉, Н. А. Дурнова[1], Н. К. Мухамадиев[2], Г. Т. Раббимова[3], М. Х. Назирбеков[4], М. А. Купряшина[1, 5]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России), 410012, Россия, г. Саратов, Россия, ул. Большая Казачья, д. 112
[2] Самаркандский государственный университет имени Шарофа Рашидова (СамГУ), 140104, Узбекистан, г. Самарканд, ул. Университетский бульвар, д. 15
[3] Самаркандский государственный медицинский университет (СамГМУ), 140100, Узбекистан, г. Самарканд, ул. Амира Темура, д. 18
[4] Государственный научный центр по контролю качества и оборота ветеринарных лекарственных средств и кормовых добавок, 100208, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Дийдор, д. 100
[5] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», 410049, Россия, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

✉ **Контактное лицо:** Шереметьева Анна Сергеевна. **E-mail:** anna-sheremetyewa@yandex.ru

ORCID: О. Г. Шаповал – https://orcid.org/0000-0002-8290-7524; А. С. Шереметьева – https://orcid.org/0000–0002–0022–8318; Н. А. Дурнова – https://orcid.org/0000–0003–4628–9519; Н. К. Мухамадиев – https://orcid.org/0000-0003-4776-4625; Г. Т. Раббимова – https://orcid.org/0000-0003-2519-027X; М. Х. Назирбеков – https://orcid.org/0000-0002-7714-8316; М. А. Купряшина – https://orcid.org/0000-0002-2136-5362.

Статья поступила: 16.02.2023 **Статья принята в печать:** 20.06.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Эфирные масла, получаемые из растений, являются природными источниками антибактериальных веществ широкого спектра действия, включая фенол и его производные. Стабильные эмульсии эфирных масел используются местно в качестве новых антимикробных агентов.

Цель. Целью данного исследования явилась оценка антимикробной активности эфирных масел тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.) в отношении клинических штаммов.

Материалы и методы. Антимикробную активность эфирных масел определяли методом серийных разведений в бульоне Мюллера – Хинтон при микробной нагрузке 5×10^5 КОЕ/мл в отношении 6 штаммов *Staphylococcus aureus* – одного стандартного (*S. aureus* FDA 209P) и 5 клинических; 2 штаммов *Escherichia coli* – стандартного *E. coli* ATCC 25922 (M-17) и клинического; 2 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* – стандартного *P. aeruginosa* ATCC 27835 и клинического.

Результаты и обсуждение. Установлено, что бактерицидная минимальная ингибирующая концентрация (МИК) эфирного масла *T. serpyllum* в отношении опытных штаммов S. *aureus* составила для 5 штаммов 1097,5 мкг/мл, для одного – 2195 мкг/мл. Бактериостатические концентрации установлены для трех штаммов и составили для двух 548,75 и одного 1097,5 мкг/мл. МИК эфирного масла *T. marschallianus* в отношении 5 опытных штаммов стафилококков составили 120 мкг/мл, в отношении одного – 480 мкг/мл и носили бактерицидный характер. В отношении всех штаммов грамотрицательных бактерий МИК эфирных масел тимьянов обоих видов носили бактерицидный характер и составили 1097 и 960 мкг/мл. С учетом количественного содержания тимола и его изомеров в эфирных маслах $МИК_{50}$ *T. marschallianus* и *T. serpyllum* для опытных штаммов стафилококков составили 108,9 и 496,59 мкг/мл, для опытных штаммов грамотрицательных бактерий 683,91 и 783,43 мкг/мл соответственно.

Заключение. Согласно полученным значениям МИК и $МИК_{50}$, антимикробная активность эфирного масла тимьяна Маршалла оказалась существенно более высокой по сравнению с эфирным маслом тимьяна ползучего в отношении опытных штаммов *S. aureus*.

Ключевые слова: антибактериальная активность, эфирные масла, *Thymus serpyllum* L., *Thymus marschallianus* Willd.

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

Вклад авторов. О. Г. Шаповал и А. С. Шереметьева – проведение исследования, подготовка и написание текста статьи. Н. А. Дурнова и Н. К. Мухамадиев – определение концепции и дизайна исследования, написание текста статьи. Г. Т. Раббимова, М. Х. Назирбеков и М. А. Купряшина – проведение исследования. Все авторы участвовали в анализе полученных данных и обсуждении результатов.

Финансирование. Данное исследование проводится в рамках совместного гранта «Эффективность применения эфирных масел растений в этиотропной терапии урогенитальных инфекций у беременных», полученного в рамках межвузовского конкурса перспективных научных исследований Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского и Самаркандского государственного медицинского института, регистрационный номер государственного учета научно-исследовательской, опытно-конструкторской и технологической работы гражданского назначения 121090200092-4.

Благодарность. Авторы выражают благодарность ведущему специалисту по флоре Саратовской области – доктору биологических наук, профессору Михаилу Александровичу Березуцкому за консультативную помощь в процессе сбора и обработке растительного сырья.

Для цитирования: Шаповал О. Г., Шереметьева А. С., Дурнова Н. А., Мухамадиев Н. К., Раббимова Г. Т., Назирбеков М. Х., Купряшина М. А. Антибактериальная активность эфирных масел тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(3):143–150. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-143-150

© Шаповал О. Г., Шереметьева А. С., Дурнова Н. А., Мухамадиев Н. К., Раббимова Г. Т., Назирбеков М. Х., Купряшина М. А., 2023
© Shapoval O. G., Sheremetyeva A. S., Durnova N. A., Mukhamadiev N. Q., Rabbimova G. T., Nazirbekov M. K., Kupryashina M. A., 2023

Antibacterial Activity of Essential Oils of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus marschallianus* Willd.

Olga G. Shapoval[1], Anna S. Sheremetyeva[1]✉, Natalya A. Durnova[1], Nurali Q. Mukhamadiev[2], Gulnora T. Rabbimova[3], Mavlonbek K. Nazirbekov[4], Maria A. Kupryashina[1, 5]

[1] Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky (Razumovsky University), 112, Bolshaya Kazachya str., Saratov, 410012, Russia
[2] Samarkand State University (SamSU), 15, University Boulevard str., Samarkand, 140104, Uzbekistan
[3] Samarkand State Medical University, 18, Amir Temur str., Samarkand, 140100, Uzbekistan
[4] State research center for quality control and circulation of veterinary drugs and feed additives, 100, Didor str., Tashkent, 100208, Uzbekistan
[5] Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna S. Sheremetyeva. **E-mail:** anna-sheremetyewa@yandex.ru

ORCID: Olga G. Shapoval – https://orcid.org/0000-0002-8290-7524; Anna S. Sheremetyeva – https://orcid.org/0000–0002–0022–8318; Natalya A. Durnova – https://orcid.org/0000–0003–4628–9519; Nurali Q. Mukhamadiev – https://orcid.org/0000-0003-4776-4625; Gulnora T. Rabbimova – https://orcid.org/0000-0003-2519-027X; Mavlonbek K. Nazirbekov – https://orcid.org/0000-0002-7714-8316; Maria A. Kupryashina – https://orcid.org/0000-0002-2136-5362.

Received: 16.02.2023 **Revised:** 20.06.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Plant essential oils are supposed to be applied for local treatment of infectious focuses.

Aim. The aim of this study was evaluation of antimicrobial activity of essential oils of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus marschallianus* Willd., widely distributed in the Saratov region.

Materials and methods. Antimicrobial activity of the essential oils was determined by a serial dilution test at the microbial number of 5×10^5 CFU/ml against 6 strains of *Staphylococcus aureus,* including *S. aureus* FDA 209P and five clinical, 2 strains of *Escherichia coli – E. coli* ATCC 25922 and one clinical, two strains of *Pseudomonas aeruginosa – P. aeruginosa* ATCC 27835 and one clinical.

Results and discussion. The bactericidal minimal inhibitory concentrations (MICs) of essential oil of *T. serpyllum* were determined for all strains of staphylococci (for 5 – 1097,5, for 1 – 2195 μg/ml). The bacteriostatic MICs were determined for 3 strains (for 2 – 548,75, for 1 – 1097,5 μg/ml). MICs of the *T. marschallianus* essential oil were bactericidal for all strains of *S. aureus* (120 for 5 and 480 μg/ml for 1 strain). For all test strains of gram-negative bacteria MICs of the essential oils of both species were bactericidal and amounted to 1097 and 960 μg/ml. Considering the chemical composition of the oils by thymol and its isomers, MIC_{50} of *T. marschallianus* и *T. serpyllum* for the test staphylococcal strains amounted 108,89 and 496,59, for the test strains of gram-negative bacteria 683,91 and 783,43 μg/ml respectively.

Conclusion. According to the values of MIC_{50} antistaphylococcal activity of the essential oils of *T. marschallianus* was significantly higher than this activity of the essential oils of *T. serpyllum*.

Keywords: antibacterial activity, essential oils, *Thymus serpyllum* L., *Thymus marschallianus* Willd.

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. Olga G. Shapoval and Anna S. Sheremetyeva – the study, the article writing. Natalya A. Durnova and Nurali Q. Mukhamadiev – conception and design of the study, the article writing. Gulnora T. Rabbimova, Mavlonbek K. Nazirbekov and Maria A. Kupryashina – the study. All authors participated in the analysis of the obtained data and discussion of the results.

Funding. This study is carried out within the framework of the joint grant "The effectiveness of the use of essential oils of plants in the etiotropic therapy of urogenital infections in pregnant women", received in the framework of the interuniversity competition for promising scientific research of the Saratov State Medical University. V. I. Razumovsky and Samarkand State Medical Institute, registration number of the state registration of research, development and technological work for civil purposes 121090200092-4.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the leading specialist in the flora of the Saratov region, Doctor of Biological Sciences, Professor Mikhail A. Berezutsky, for his advisory assistance in the process of collecting and processing plant materials.

For citation: Shapoval O. G., Sheremetyeva A. S., Durnova N. A., Mukhamadiev N. Q., Rabbimova G. T., Nazirbekov M. K., Kupryashina M. A. Antibacterial activity of essential oils of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus marschallianus* Willd. *Drug development & registration*. 2023;12(3):143–150. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-143-150

ВВЕДЕНИЕ

Масштабное применение антибактериальных препаратов для лечения инфекционных болезней в последние годы привело к существенному увеличению числа антибиотикорезистентных штаммов. В этой связи поиск альтернативных способов лечения инфекций с каждым годом приобретает все большую актуальность и востребованность.

Эфирные масла, получаемые из растений, являются важными источниками антимикробных веществ природного происхождения и благодаря широкому спектру биологической активности применяются как в практическом здравоохранении, так и в народной медицине [1–3].

Эфирные масла тимьянов, согласно химическому составу, являются одними из наиболее перспективных антимикробных агентов. Антимикробная активность эфирных масел растений основана на содержании монотерпенов, альдегидов, кетонов, простых и сложных эфиров, производных фенола, последние преобладают в эфирном масле тимьянов в виде тимола (2-изопропил-5-метилфенола) и карвакрола (2-ме-

тил-5-(пропан-2-ил)фенола), массовая доля которых достигает 46–54 % [4–6]. У эфирных масел тимьянов она обнаружена в отношении патогенных и оппортунистических бактерий, а также грибов [7, 4–6, 8–10]. Антибактериальные свойства эфирных масел растений обусловлены действием на мембрану клеток, включая наружную мембрану грамотрицательных бактерий, что приводит к нарушению процессов трансмембранного транспорта, ионной проницаемости, работе цепи переноса электронов, но в целом механизм их признается до конца не изученным [7, 10].

В литературе представлены данные об антимикробной активности эмульсий и паров эфирных масел, получаемых из стеблей и листьев тимьянов разных видов, но в отношении тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.) сведений мало из-за большого таксономического разнообразия эфирномасличных растений.

Целью данного исследования явилась оценка антибактериальной активности эфирных масел тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.) и тимьяна Маршалла (*Thymus marschallianus* Willd.) в отношении клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Для ее достижения задачами исследования послужили получение эфирных масел из растительного сырья указанных видов и оценка их антимикробной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эфирные масла для эксперимента получали из надземных частей тимьяна Маршалла и тимьяна ползучего.

Трава тимьяна Маршалла собрана в окрестностях поселка Красный Текстильщик Саратовского района на степной возвышенности (долгота: 45.79; широта: 51.36) в фазе цветения (июнь-июль 2021 г.). Определение вида проведено по ключу В. Н. Гладковой и Ю. Л. Меницкого [11] и подтверждено ведущим специалистом по флоре Саратовской области – доктором биологических наук, профессором М. А. Березуцким. Сырье сушили естественным способом в сухом, хорошо проветриваемом месте, затем для получения эфирного масла измельчали до частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Трава тимьяна ползучего, которая не произрастает в регионе, приобретена в аптечной сети (производитель ООО «фирма КИМА», России, серия 0421).

Для подтверждения подлинности сырья был проведен микроскопический анализ, который выполнен на микроскопе Primo Star (Carl Zeiss AG, Германия) согласно ГФ XIV ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [12]. Описание травы тимьяна ползучего соответствовало ФС.2.5.0047.15 «Чабреца трава», а тимьяна Маршалла – ранее проведенным исследованиям, посвященным микроскопическому анализу данного вида [13].

Получение эфирного масла из травы тимьяна Маршалла и тимьяна ползучего проводили с помощью прибора для определения содержания эфирного масла по методу Гинзберга перегонкой с водяным паром согласно требованиям ГФ XIV издания ОФС.1.5.3.0010.15 «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» методом 1: измельченную траву (30 г) помещали в круглодонную колбу объемом 1000 мл, приливали 300 мл воды очищенной и закрывали резиновой пробкой с обратным холодильником. Колбу с содержимым нагревали на колбонагревателе и кипятили в течение двух часов. После окончания перегонки и охлаждения прибора до комнатной температуры полученное эфирное масло собирали из приемника в пробирку.

Анализ химического состава полученных масел осуществляли с помощью газового хроматографа – масс-спектрометра YL 6900 GC/MS (Young Lin Instrument Co., Ltd., Корея) с капиллярной колонкой HP-5 30 м × 0,32 мм с толщиной фазы 0,25 мкм при соблюдении следующих условий: изотермическом режиме (60 °С 3 мин) с повышением до 250 °С (нагрев со скоростью 15 °С/мин) и поддержании достигнутого режима в течение 3 мин. Частота потока газа гелия составила 1 мл/мин, коэффициент разделения – 1:100. Масс-спектрометрический анализ проведен при следующих параметрах работы масс-детектора: время удержания – 3 мин, эмиссия – 50 мА, диапазон сканирования – 30–350 а.е.м., скорость сканирования – 1600 а.е.м./с, температура ионного источника – 230 °С, температура трансфера – 280 °С, время анализа – 21 мин. Идентификацию компонентов проводили на основе сравнения полученных масс-спектров с библиотекой масс-спектров NIST (National Institute of Standards and Technology, США) и по времени удерживания. Для количественного анализа использовали метод внутренней нормализации.

Антимикробную активность эфирных масел определяли в отношении 6 штаммов *Staphylococcus aureus* – одного стандартного (*S. aureus* FDA 209P) и 5 клинических; 2 штаммов *Escherichia coli* – стандартного *E. coli* ATCC 25922 (M-17) и клинического; 2 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* – стандартного *P. aeruginosa* ATCC 27835 и клинического. Все стандартные штаммы получены из музея живых культур кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России. Клинические штаммы стафилококков выделены на маннит-солевом агаре (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) в ходе бактериологического исследования носоглоточных мазков, взятых от новорожденных детей, госпитализированных в ГУЗ «Саратовская областная детская клиническая больница» г. Саратова, идентифицированы фенотипически с помощью тест-системы СТАФИтест 24 (Erba Lachema s.r.o., Чешская Республика) и плазмокоагулазной активности, по результатам диско-диффузионного метода

чувствительны к цефокситину. Клинический штамм *P. aeruginosa* выделен на среде Эндо и мясо-пептонном агаре (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Россия) из мочи беременной женщины с инфекцией мочевыводящих путей в бактериологической лаборатории ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница № 10», идентифицирован фенотипически с помощью тест-системы для неферментирующих грамотрицательных бактерий «ДС-ДИФ-НЕФЕРМ» (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия). По результатам диско-диффузионного метода чувствителен к левофлоксацину и с промежуточным отношением к цефтазидиму. Все штаммы субкультивированы на мясо-пептонном агаре (ГРМ-агар, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Россия). Оценку антимикробной активности проводили макрометодом двукратных серийных разведений в бульоне Мюллера – Хинтон (AppliChem GmbH, Германия) при микробной нагрузке 5×10^5 КОЕ/мл по стандарту мутности ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Указанный метод принимается рядом исследователей при тестировании антибактериального и противогрибкового действия эфирных масел [8, 9, 14, 15]. Объем каждого разведения для посева составил 1 мл. В качестве контролей использовали питательный бульон без эфирных масел. После инкубации при температуре 37 °С при наличии видимого роста в контроле определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), для определения характера которой (бактерицидного или бактериостатического) из пробирок с отсутствием видимого роста осуществляли высев на мясо-пептонный агар.

На основании полученных значений МИК рассчитывали $МИК_{50}$ для опытных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий с оценкой ее доверительного интервала, а также достоверность различий найденных для каждого вида масел значений $МИК_{50}$ с вероятностью 95 %, используя программу Microsoft Excel пакета программ Microsoft Office 365.

С учетом полученных значений МИК оценивали влияние эфирных масел на относительную респираторную активность опытных штаммов флуориметрическим резазурин-тестом. С этой целью в лунки стерильного 96-луночного планшета вносили по 100 мкл бульонной культуры в стационарной фазе роста, полученной из стартовой концентрации инокулюма 5×10^5 КОЕ/мл, 80 мкл раствора резазурина – Alamar Blue (Sigma-Aldrich, США) концентрацией 1 мкг/мл и по 20 мкл разведений исследуемых эфирных масел (1250–10000 мкг/мл), приготовленных в бульоне Мюллера – Хинтон. Планшеты инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч, затем регистрировали интенсивность флуоресценции на спектрофлуориметре с микропланшетной приставкой Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) при следующих параметрах: длина волны возбуждения – 530 нм, длина волны эмиссии – 600 нм, ширина щели – 10 нм, время интегрирования – среднее. Значения интенсивности флуоресценции опытных образцов нормировались на бланк (раствор резазурина в бульоне Мюллера – Хинтон), за 100 % была принята дыхательная активность суточной культуры бактерий без добавления масел, нижний порог определен по базовой линии (сигнал/шум). Для статистической обработки полученных данных использовали пакет программы Microsoft Office Excel. Планки погрешностей на рисунках 1 и 2, отображающих результаты, соответствуют доверительным интервалам для среднеарифметических при уровне значимости $p = 0{,}05$. Объем выборки $n = 3$.

Сравнение антибактериальной активности эфирных масел проводили с тимолом (основного антимикробного вещества эфирных масел тимьяна) методом макроразведений. Базовый раствор тимола концентрацией 20 мг/мл готовили, добавляя к навеске 200 мг 10 мл 10 % водного раствора этанола. На его основе получали разведения тимола в бульоне Мюллера – Хинтон концентрацией от 2000 до 125 мкг/мл объемом 1 мл [14, 16]. Параллельно осуществляли посевы в двукратные разведения этанола в бульоне Мюллера – Хинтон для исключения его антибактериальной активности в используемых концентрациях от 100 000 до 12 500 мкг/мл в связи с использованием его при приготовлении базового раствора тимола.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии в составе эфирного масла *T. marschallianus* наибольшие массовые доли приходятся на тимол и его изомеры – 38,4 %, циклогексен – 8,9 %, g-терпинен – 7,6 %, эндоборнеол – 5,3 %; в составе эфирного масла *T. serpyllum* массовая доля тимола и его изомеров – 43,9 %, на следующих трех позициях в порядке убывания находятся эвкалиптол – 8,4 %, бензен – 4,2 %, кариофиллен – 2,9 %. В пересчете на содержание тимола и его производных в эфирных маслах установлено, что бактерицидная МИК эфирного масла тимьяна ползучего в отношении шести опытных штаммов *S. aureus* составила для 5 штаммов 1097,5, для одного – 2195 мкг/мл. Бактериостатические концентрации установлены только для трех штаммов и составили для двух 548,75 и одного 1097,5 мкг/мл. МИК эфирного масла тимьяна Маршалла в отношении 5 опытных штаммов стафилококков составила 120, в отношении одного – 480 мкг/мл и носили бактерицидный характер (таблица 1). В отношении всех опытных штаммов грамотрицательных бактерий МИК тимьяна ползучего и тимьяна Маршалла носили бактерицидный характер и составили 1097,5 и 960 мкг/мл соответственно.

С учетом количественного содержания в эфирных маслах изучаемых видов тимьяна тимола и его изомеров $МИК_{50}$ *T. marschallianus* и *T. serpyllum* для

Таблица 1. **МИК эфирных масел *T. serpyllum* и *Thymus marschallianus***

Table 1. **MIC of essential oils of *T. serpyllum* and *T. marschallianus***

Штамм Strain	Разведения эфирных масел и соответствующие им концентрации (мкг/мл) тимола и его изомеров Dilutions of essential oils and corresponding to them concentrations (μg/ml) of thymol ant its isomers															
	Thymus serpyllum L.								*Thymus marschallianus* Willd.							
	50 (8780)	100 (4390)	200 (2195)	400 (1097,5)	800 (548,75)	1600 (274,38)	3200 (137,19)	6400 (68,6)	50 (7680)	100 (3840)	200 (1920)	400 (960)	800 (480)	1600 (240)	3200 (120)	6400 (60)
S. aureus 209P	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
S. aureus 2963	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
S. aureus 3473	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
S. aureus 3239	–	–	–	–	–*	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
S. aureus 3282	–	–	–	–*	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
S. aureus 2977	–	–	–	–	–*	+	+	+	–	–	–	–	–	+	+	+
E. coli ATCC 25922	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+
E. coli 3	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+
P. aeruginosa ATCC 27835	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+
P. aeruginosa 7728	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+

Примечание. * Бактериостатическая концентрация.

Note. * Bacteriostatic concentration.

опытных штаммов стафилококков составили 108,89 и 496,59, для опытных штаммов грамотрицательных бактерий 683,91 и 783,43 мкг/мл соответственно. Установлено, что найденные значения $МИК_{50}$ с вероятностью 95 % лежат в пределах следующих максимальных и минимальных показателей: в отношении стафилококков для эфирного масла *T. marschallianus* 71,94–153,82, *T. serpyllum* – 351,46–701,46, в отношении псевдомонад – 421,7–1109,17 и 483,06–1270,57 мкг/мл соответственно. Достоверность различий между полученными значениями $МИК_{50}$ с той же вероятностью установлена для эфирных масел растений обоих видов в отношении стафилококков.

МИК тимола для двух штаммов стафилококка составили 1000 и четырех – 500 мкг/мл и носили бактериостатический характер. МИК тимола (500–1000 мкг/мл) для всех штаммов грамотрицательных бактерий оказались бактерицидными.

Контрольные посевы в разведения этанола показали бактерицидное действие в минимальных концентрациях, превышающих таковые в опытных разведениях спиртового раствора тимола, и составили 50000–100000 мкг/мл. Таким образом, этанол в данных концентрациях не оказывал влияния на антимикробную активность тимола.

По результатам оценки относительной респираторной активности опытных штаммов показано, что концентрации эфирных масел *T. serpyllum* и *T. marschallianus* 125–1000 мкг/мл подавляют респираторную активность культур стафилококков на 44–66 % и 22–58 % (в зависимости от штамма) соответственно (рисунки 1, 2). В отношении грамотрицательных бактерий значимое снижение респираторной активности установлено для двух штаммов: стандартного штамма *E. coli* на 9–29 % и 22–40 %, штамма *P. aeruginosa* 7728 на 38–51 % и 48–50 % соответственно. При сравнительной оценке антиреспираторной активности масел обоих видов установлено существенное преобладание подавляющего действия у эфирного масла *T. serpyllum* в отношении стандартного штамма стафилококка. Колебания показателей относительной респираторной активности обусловлены воздействием опытных концентраций на культуру в стационарной фазе роста, то есть на высокое количество микроорганизмов.

Представленные результаты свидетельствуют о наличии антибактериальной активности у эфирных масел *T. serpyllum* и *T. marschallianus* в отношении стандартных и клинических штаммов *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa*, в том числе за счет подавления процессов клеточного дыхания.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что эфирные масла тимьяна ползучего и тимьяна Маршалла, согласно значениям МИК, не уступают по антимикробной активности химически чистому тимолу, принимая во внимание достаточно низкую растворимость эфирных масел в воде и необходимость создания стабилизированных масляных эмульсий для преодоления этого недостатка [4, 5]. Химический состав эфирных масел тимьянов разных видов по основным компонентам примерно одинаков, что может послужить объяснением для сопоставимых с полученными нами значениям МИК, установленных другими авторами: МИК эфирного масла *Thymus zygis* для уропатогенных штаммов *E. coli* составляет от 190 до 780 при бактерицидных показателях от 1560 до 6250 мкг/мл [8], бактерицидная МИК эфирного масла *Thymus capitatus* для стандартных штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* достигает 730–2940 мкг/мл [9].

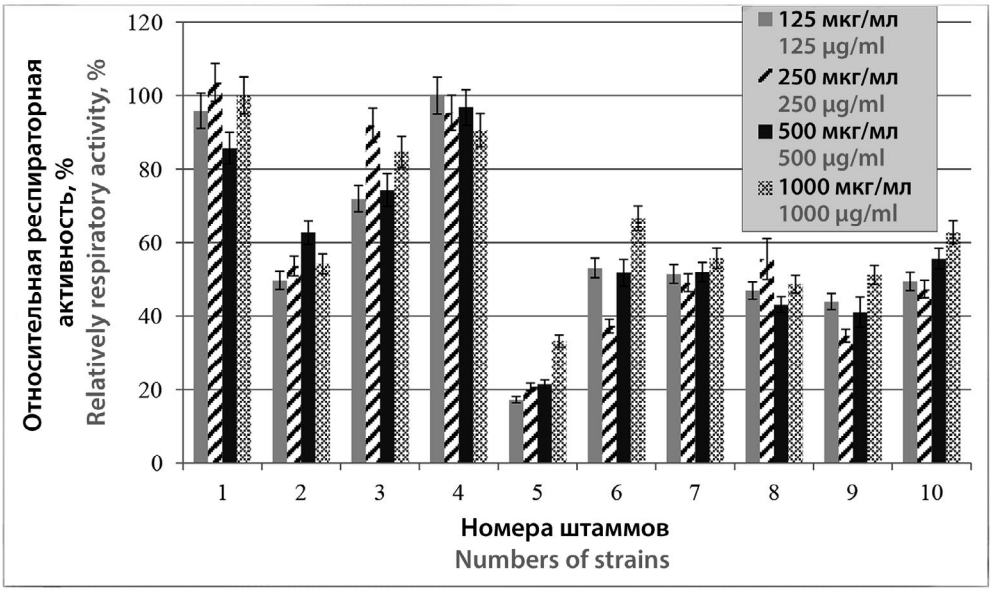


Рисунок 1. **Относительная респираторная активность штаммов:**

1 – *P. aeruginosa* ATCC 27835; 2 – *P. aeruginosa* 7728; 3 – *E. coli* ATCC 25922; 4 – *E. coli* 3; 5 – *S. aureus* 209P; 6 – *S. aureus* 2963; 7 – *S. aureus* 3473; 8 – *S. aureus* 3282; 9 – *S. aureus* 3239; 10 – *S. aureus* 2977 под воздействием эфирного масла *T. serpyllum*

Figure 1. **Relatively respiratory activity of the strains:**

1 – *P. aeruginosa* ATCC 27835; 2 – *P. aeruginosa* 7728; 3 – *E. coli* ATCC 25922; 4 – *E. coli* 3; 5 – *S. aureus* 209P; 6 – *S. aureus* 2963; 7 – *S. aureus* 3473; 8 – *S. aureus* 3282; 9 – *S. aureus* 3239; 10 – *S. aureus* 2977 under influence of *T. serpyllum* essential oil

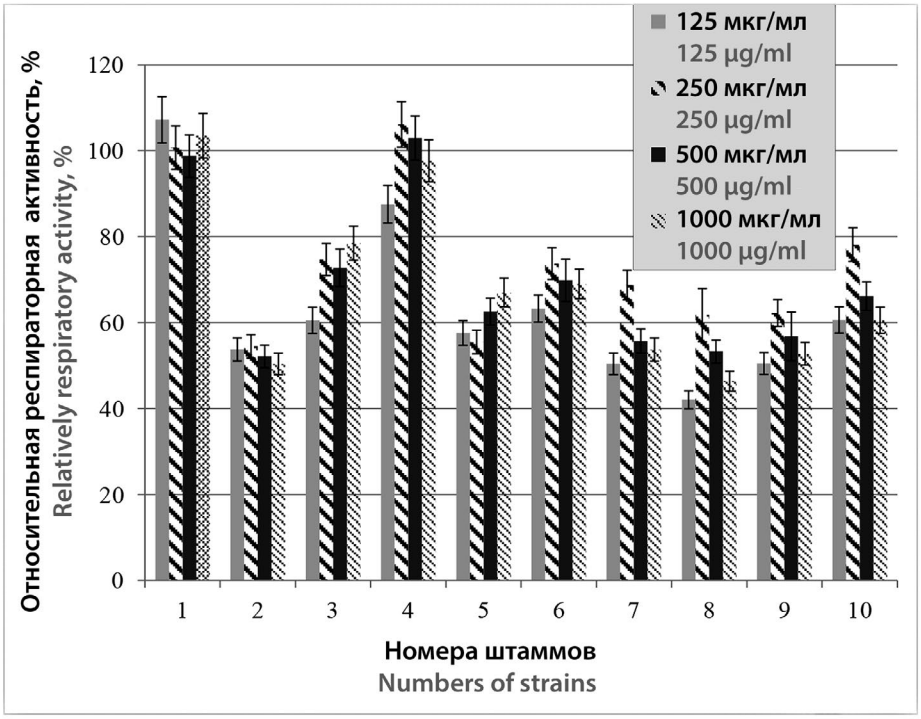


Рисунок 2. **Относительная респираторная активность штаммов:**

1 – *P. aeruginosa* ATCC 27835; 2 – *P. aeruginosa* 7728; 3 – *E. coli* ATCC 25922; 4 – *E. coli* 3; 5 – *S. aureus* 209P; 6 – *S. aureus* 2963; 7 – *S. aureus* 3473; 8 – *S. aureus* 3282; 9 – *S. aureus* 3239; 10 – *S. aureus* 2977 под воздействием эфирного масла *T. marschallianus*

Figure 2. **Relatively respiratory activity of the strains:**

1 – *P. aeruginosa* ATCC 27835; 2 – *P. aeruginosa* 7728; 3 – *E. coli* ATCC 25922; 4 – *E. coli* 3; 5 – *S. aureus* 209P; 6 – *S. aureus* 2963; 7 – *S. aureus* 3473; 8 – *S. aureus* 3282; 9 – *S. aureus* 3239; 10 – *S. aureus* 2977 under influence of *T. marschallianus* essential oil

По данным статистической обработки МИК и $МИК_{50}$ эфирное масло тимьяна Маршалла согласно полученным значениям обладает большей антибактериальной активностью по сравнению с эфирным маслом тимьяна ползучего в отношении опытных штаммов стафилококков.

С точки зрения химического строения эфирных масел, по суммарной массовой доли веществ, не относящихся к тимолу и его изомерам, но с предполагаемой или доказанной антимикробной активностью [9, 10], опытные эфирные масла практически не отличаются между собой и процент данных соединений составляет 16,09 % для *T. marschallianus* и 15,73 % для *T. serpyllum*. Однако дополнительно среди указанных веществ (эвкалиптола, γ-терпинена и кариофиллена) в эфирном масле *T. marschallianus* по сравнению с *T. serpyllum* присутствуют анетол (0,3 %) и эндоборнеол (5,25 %). Последний является монотерпеновым спиртом, то есть содержит гидроксогруппы, как и тимол, которые усиливают повреждающее воздействие несущих их молекул на ферменты клетки [10, 17, 18]. Другие же указанные вещества эти группы не содержат, являясь в большинстве своем циклическими соединениями с развернутой пространственной структурой.

В целом пока во многом остается не изученным тот факт, как работают все компоненты эфирных масел в совокупности: потенцируют, ингибируют или не влияют друг на друга, что является предметом дальнейшего изучения.

В отношении грамотрицательных бактерий отсутствие различий в значении МИК эфирных масел обусловлено липополисахаридным барьером клеточной стенки [19], ослабляющим взаимодействие липофильных компонентов с наружной мембраной. По угнетению респираторной активности опытные эфирные масла не проявили существенных различий между собой в отношении большинства штаммов в виду воздействия на высокую концентрацию микроорганизмов, но показали, что данный механизм действия является одним из важных в воздействии уже на сформировавшуюся популяцию бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования доказывают антибактериальную эффективность эфирных масел тимьяна *T. marschallianus* и *T. serpyllum* на примере стандартных штаммов условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий и делают их перспективными антимикробными агентами для дальнейших исследований, посвященным возможностям их практического применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сентябрев Н. Н., Караулов В. В., Кайдалин В. С., Камчатников А. Г. Эфирные масла в спортивной практике. Волгоград: ВГАФК; 2009. 138 с.
2. Шавловская О. А. Спектр применения эфирных масел в современной медицине на примере бальзама Золотая звезда. *Лечащий врач*. 2016;10:e1–16.
3. Тернинко И. И., Лёзина А. В., Снигирева Н. А., Романова М. А. К вопросу о применении фитотерапии в лечении онкологических заболеваний (обзор). В: Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» «Современные достижения фармацевтической науки и практики». 31 октября 2019 года. Витебск; 2019. С. 115–117.
4. Acs K., Balazs V. L., Kocsis B., Bencsik T., Boszormenyi A., Horvath G. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18(1):227. DOI: 10.1186/s12906-018-2291-9.
5. Shin J., Na K., Shin S., Seo S.-M., Youn H.-J., Park I.-K., Hyun J. Biological activity of *Thyme white* essential oil stabilized by cellulose nanocrystals. *Biomolecules*. 2019;9(12):799. DOI: 10.3390/biom9120799.
6. Jafri H., Ahmad I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de Mycologie Médicale*. 2020;30(1):100911. DOI: 10.1016/j.mycmed.2019.100911.
7. Sakkas H., Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;27(3):429–438. DOI: 10.4014/jmb.1608.08024.
8. Lagha R., Ben Abdallah F., AL-Sarhan B., Al-Sodany Y. Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. *Molecules*. 2019; 24(6):1161. DOI: 10.3390/molecules24061161.
9. Moumni S., Elaissi A., Trabelsi A., Merghni A., Chraief I., Jelassi B., Chemli R., Ferchichi S. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some *Lamiaceae* species essential oils from Tunisia. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2020;20(1):103. DOI: 10.1186/s12906-020-02888-6.
10. Kowalczyk A., Przychodna M., Sopata S., Bodalska A., Fecka I. Thymol and thyme essential oil – new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*. 2020;25(18):4125. DOI: 10.3390/molecules25184125.
11. Гладкова В. Н., Меницкий Ю. Л. Флора европейской части СССР. В 11 т. Т. 3. Род Тимьян – *Thymus* L. Ленинград: Наука; 1978.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. В 4 т. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2018.
13. Коренская И. М., Измалкова И. Е., Сливкин А. И., Фалалеев А. В., Мальцева А. А. Фармакогностическое и хромато-масс-спектрометрическое исследование надземных частей тимьяна марокканского и тимьяна Маршалла. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия.* Биология. Фармация. 2016;(4):137–141.
14. Engel J. B., Heckler C., Tondo E. C., Daroit D. J., da Silva Malheirosa P. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 2017;252:18–23. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003.
15. Wang X., Shen Y., Thakur K., Han J., Zhang J.-G., Hu F., Wei Z.-J. Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2020;25(17):3955. DOI: 10.3390/molecules25173955.
16. Rua J., del Valle P., de Arriaga D., Fernandez-Alvarez L., Garcıa-Armesto M. R. Combination of carvacrol and thymol: antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2019;16(9):622–629. DOI: 10.1089/fpd.2018.2594.
17. Guimaraes A. C., Meireles L. M., Lemos M. F., Guimaraes M. C. C., Endringer D. C., Fronza M., Scherer R. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*. 2019;24(13):2471. DOI: 10.3390/molecules24132471.
18. Winska K., Maczka W., Lyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents – myth or real alternative. *Molecules*. 2019;24(11):2130. DOI: 10.3390/molecules24112130.
19. Valdivieso-Ugarte M., Gomez-Llorente C., Plaza-Diaz J., Gil A. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: a systematic review. *Nutrients*. 2019;11(11):2786. DOI: 10.3390/nu11112786.

REFERENCES

1. Sentjabrev N. N., Karaulov V. V., Kajdalin V. S., Kamchatnikov A. G. Essential oils in sports practice. Volgograd: VGAFK; 2009. 138 p. (In Russ.)
2. Shavlovskaja O. A. The range of essential oils application in modern medicine on the example of Golden Star balsam. *Lechashhij vrach*. 2016;10:e1–16. (In Russ.)
3. Terninko I. I., Ljozina A. V., Snigireva N. A., Romanova M. A. On the issue of phytotherapy in the treatment of oncological diseases (overview). In: International conference dedicated to the 60th anniversary of the pharmaceutical faculty of the educational institution "Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University" "Modern achievements of pharmaceutical science and practice." October 31, 2019. Vitebsk; 2019. P. 115–117. (In Russ.)
4. Acs K., Balazs V. L., Kocsis B., Bencsik T., Boszormenyi A., Horvath G. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18(1):227. DOI: 10.1186/s12906-018-2291-9.
5. Shin J., Na K., Shin S., Seo S.-M., Youn H.-J., Park I.-K., Hyun J. Biological activity of *Thyme white* essential oil stabilized by cellulose nanocrystals. *Biomolecules*. 2019;9(12):799. DOI: 10.3390/biom9120799.
6. Jafri H., Ahmad I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de Mycologie Médicale*. 2020;30(1):100911. DOI: 10.1016/j.mycmed.2019.100911.
7. Sakkas H., Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;27(3):429–438. DOI: 10.4014/jmb.1608.08024.
8. Lagha R., Ben Abdallah F., AL-Sarhan B., Al-Sodany Y. Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. *Molecules*. 2019; 24(6):1161. DOI: 10.3390/molecules24061161.
9. Moumni S., Elaissi A., Trabelsi A., Merghni A., Chraief I., Jelassi B., Chemli R., Ferchichi S. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some *Lamiaceae* species essential oils from Tunisia. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2020;20(1):103. DOI: 10.1186/s12906-020-02888-6.
10. Kowalczyk A., Przychodna M., Sopata S., Bodalska A., Fecka I. Thymol and thyme essential oil – new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*. 2020;25(18):4125. DOI: 10.3390/molecules25184125.
11. Gladkova V. N., Menickiy Yu. L. Flora of the European parts of the USSR. In 11 vols. V. 3. The genus Thymus – *Thymus* L. Leningrad: Nauka; 1978. (In Russ.)
12. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. In 4 volumes. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation. 2018. (In Russ.)
13. Korenskaya I. M., Izmalkova I. E., Slivkin A. I., Falaleev A. V., Maltzeva A. A. Pharmacognostic and chromato-mass spectrometric study of the aerial parts of the moroccan herb of thyme and marshall herb of thyme. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2016;(4):137–141. (In Russ.)
14. Engel J. B., Heckler C., Tondo E. C., Daroit D. J., da Silva Malheirosa P. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 2017;252:18–23. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.003.
15. Wang X., Shen Y., Thakur K., Han J., Zhang J.-G., Hu F., Wei Z.-J. Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2020;25(17):3955. DOI: 10.3390/molecules25173955.
16. Rua J., del Valle P., de Arriaga D., Fernandez-Alvarez L., Garcıa-Armesto M. R. Combination of carvacrol and thymol: antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2019;16(9):622–629. DOI: 10.1089/fpd.2018.2594.
17. Guimaraes A. C., Meireles L. M., Lemos M. F., Guimaraes M. C. C., Endringer D. C., Fronza M., Scherer R. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*. 2019;24(13):2471. DOI: 10.3390/molecules24132471.
18. Winska K., Maczka W., Lyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents – myth or real alternative. *Molecules*. 2019;24(11):2130. DOI: 10.3390/molecules24112130.
19. Valdivieso-Ugarte M., Gomez-Llorente C., Plaza-Diaz J., Gil A. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: a systematic review. *Nutrients*. 2019;11(11):2786. DOI: 10.3390/nu11112786.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-151-168
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Особенности набора пациентов в клинических исследованиях на примере международных мультицентровых клинических исследований (ММКИ)

С. С. Милованов✉

Индивидуальный предприниматель Милованов Святослав Сергеевич, Россия, г. Москва

✉ **Контактное лицо:** Милованов Святослав Сергеевич. **E-mail:** milovanovss@gmail.com

ORCID: С. С. Милованов – https://orcid.org/0000-0001-9843-6096.

Статья поступила: 23.01.2023 **Статья принята в печать:** 21.06.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Набор пациентов является одной из основных количественных и качественных характеристик клинического исследования. Как количественная характеристика набор пациентов – это в первую очередь конечная цифра, необходимая для ответа на вопрос исследователя, как качественная характеристика набор пациентов – это процесс, подверженный влиянию. Набор пациентов в центре определяется скоростью в месяц и позволяет набрать статистическую мощность протокола, и если набор пациентов не достигает запланированного, то мощность может быть не набрана и это приводит к неудаче клинического исследования. Неудачи в наборе пациентов, по данным литературы, ведут к более чем 80 % неудачных клинических исследований всех фаз. На набор пациентов как процесс влияют различные факторы, и авторы выделяют предикторы набора, фасилитаторы набора и барьеры к набору пациентов.

Цель. Рассмотреть общие особенности и закономерности набора пациентов в клинических исследованиях на примере международных мультицентровых клинических исследований.

Материалы и методы. Мы провели анализ количественных характеристик набора пациентов в 4 клинических исследованиях, успешных по набору пациентов.

Результаты и обсуждение. Несмотря на уникальность каждого протокола, набор пациентов имеет свои закономерности, общие для всех клинических исследований. Изучено, в частности, что интегративная оценка предварительного набора пациентов исследователем клинического центра не связана с объективным пулом пациентов и влияет на скорость набора пациентов и на таргетный набор пациентов. Нами выявлено, что количество клинических центров, не набирающих пациентов, в каждом исследовании составляет не менее 30 % всех вовлеченных центров. Также выявлены три скорости набора пациентов, которые необходимо учитывать при планировании клинического исследования.

Заключение. Мы выявили закономерности набора пациентов, которые помогут в планировании клинических исследований.

Ключевые слова: скорость набора пациентов, набор пациентов, клинические исследования, особенности набора пациентов, предварительная скорость набора пациентов

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

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

Для цитирования: Милованов С. С. Особенности набора пациентов в клинических исследованиях на примере международных мультицентровых клинических исследований (ММКИ). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(3):151–168. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-151-168

Patterns of Patient Recruitment in Clinical Studies on the Example of International Multicenter Clinical Studies (IMCTs)

Svyatoslav S. Milovanov✉

Sole entrepreneur Svyatoslav S. Milovanov, Moscow, Russia

✉ **Corresponding author:** Svyatoslav S. Milovanov. **E-mail:** milovanovss@gmail.com

ORCID: Svyatoslav S. Milovanov – https://orcid.org/0000-0001-9843-6096.

Received: 23.01.2023 **Revised:** 21.06.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Patient recruitment is one of the main quantitative and qualitative characteristics of a clinical trial. As a quantitative characteristic, the recruitment of patients is, first of all, the final figure necessary to answer the researcher's question; as a qualitative characteristic, the recruitment of patients is a process subject to influence. The recruitment of patients in the center is determined by the rate per month and allows you to gain the statistical power of the protocol, and if the recruitment of patients does not reach the planned capacity, then the capacity may not be gained and this leads to the failure of the clinical trial. Failures in patient recruitment reported in the literature lead to more than 80 % of failed clinical trials of all phases. Patient recruitment as a process is influenced by various factors, and the authors identify recruitment predictors, recruitment facilitators, and barriers to patient recruitment.

© Милованов С. С., 2023
© Milovanov S. S., 2023

Aim. To consider the general features and patterns of recruitment of patients in clinical trials on the example of international multicenter clinical trials.
Materials and methods. We analyzed the quantitative characteristics of patient recruitment in 4 clinical trials with successful recruitment.
Results and discussion. Despite the uniqueness of each protocol, the set of patients has its own patterns common to all clinical studies. It was studied, in particular, that the integrative assessment of the preliminary recruitment of patients by the researcher of the clinical center is not associated with an objective pool of patients and affects the rate of patient recruitment and targeted patient recruitment. We found that the number of clinical centers not recruiting patients in each study is at least 30 % of all centers involved. Three patient recruitment rates have also been identified that need to be considered when planning a clinical trial.
Conclusion. We have identified patterns in patient recruitment that will help in planning clinical trials.

Keywords: recruitment rate, recruitment, clinical trials, patterns of recruitment, proposed recruitment

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

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

For citation: Milovanov S. S. Patterns of patient recruitment in clinical studies on the example of international multicenter clinical studies (IMCTs). *Drug development & registration*. 2023;12(3):151–168. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-151-168

ВВЕДЕНИЕ

Набор пациентов является важной составляющей любого клинического исследования [1]. Количество пациентов, набираемых в исследование, называется таргетным набором, который имеет строго определенные временные рамки, прописанные в протоколе и одобренные регуляторными органами, и строгое следование количеству пациентов и времени их набора, необходимого для достижения мощности протокола и набора данных для доказательства эффективности и безопасности исследуемого медицинского препарата [1]. Поскольку набор пациентов – это финансово затратная процедура, его нарушение ведет не только к дополнительным тратам, но и к недополученной прибыли от задержек старта продаж после одобрения исследованного препарата. Неудачи в наборе пациентов во всех фазах достигают, по некоторым оценкам, 86 % [2, 3]. Однако и успешность в наборе пациентов не всегда ведет к успеху всего исследования [4]. Набор пациентов по протоколу, или, иначе, таргетный набор, формируется на основании статистического расчета и «образованного предположения» – "educated guess" [5]. Для достижения таргетного набора на этапе исследования возможности проведения клинического исследования [6] клинические центры в лице главного исследователя предоставляют предполагаемый (обещанный) набор пациентов, на основании которого формируется представление о возможностях таргетного набора. Предполагаемый набор пациентов является интегративным показателем, с учетом всех факторов, которые могут влиять на процесс набора пациентов в дальнейшем (конкурентные исследования, размер гранта и финансовые условия, различные условия медицинского обслуживания и многие другие). После старта исследования и в случае успешного достижения таргетного набора пациентов фактическая цифра набранных пациентов, как правило, больше таргетного набора из-за невозможности удержания (retention) некоторых пациентов в исследовании [7]. Также согласно пункту 5.18.4 ICH GCP [8] характеристикой набора пациентов является его скорость. Цифры таргетного и фактического наборов пациентов любого протокола доступны на сайтах clinicaltrial.gov, в то время как данные по предполагаемому набору, скорости набора представлены единицами и труднодоступны, хотя именно на основании данных предполагаемого набора возможно прогнозирование успешного набора пациентов для достижения таргетного набора в запланированные сроки, и авторы отмечают почти во всех клинических исследованиях значительное снижение скорости набора пациентов по отношению к запланированной [9].

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

На протяжении 13,5 лет, начиная с 22 июля 2008 года по 31 декабря 2021 года, мы изучали набор пациентов в четырех успешных по набору пациентов клинических исследованиях инновационных лекарственных средств в регионе нахождения клинических центров России, Белоруссии и Украины (регион РУБ) по следующим терапевтическим показаниям:

1) рак головы и шеи (распространенный первичный плоскоклеточный рак полости рта / мягкого неба) III фазы (CS001P3, EudraCT – 2010-019952-35);
2) рак легких (немелкоклеточный рак легкого стадии IIIb или IV) (STA9090, EudraCT – 2011-001084-42);
3) колоректальный рак (колоректальный рак и рецидивирующие метастазы в печени) (LSO-OL006, EudraCT – 2006-004214-41);
4) идиопатическая пурпура (хроническая персистирующая) (SM101-201, EudraCT – 2009-014842-28).

Проведен описательный статистический анализ: расчет средней арифметической величины, расчет медианы и моды, расчет стандартного отклонения, доверительного интервала, ошибки средней арифметической, коэффициента вариации для параметров и показателей до и после завершения набора пациентов.

Параметры до исследования.

1. Предполагаемое (планируемое, обещанное) количество пациентов – это параметр набора, спрогнозированный главным исследователем на этапе поиска клинических центров для проведения клинического исследования.
2. Предполагаемая скорость набора пациентов в месяц, рассчитанная как общее количество пациентов, предложенное клиническими центрами на этапе отбора клинических центров и поделенное на время набора пациентов, отведенное по протоколу.
3. Параметр таргетной скорости набора пациентов в месяц, рассчитанный как таргетный набор пациентов в таргетном количестве клинических центров, поделенный на время набора пациентов, отведенное по протоколу.

Параметры после завершения исследования.

1. Период набора пациентов (в месяцах) – период времени от активации сайта до последнего набранного пациента.
2. Финальная скорость набора пациентов, рассчитанная как фактически набранное количество пациентов, поделенное на количество месяцев, потраченных на набор.
3. Набранное количество пациентов в клиническом центре.
4. Процент выполнения предполагаемого набора пациентов.

Анализ проведен для величин набора пациентов (НП), предполагаемого до старта НП, во время НП и после его завершения. Прогноз набора пациентов до старта клинического исследования строился на основании интегративной величины, предоставленной главным исследователем клинического центра во время проведения исследования возможности проведения клинического исследования, и эта величина вносилась в разработанные опросники. По средним значениям проводилась группировка данных с целью выявления типов клинических центров.

Параметры рассчитывались для всей группы в целом, по группам с учетом типов клинических центров.

Результаты набора пациентов и связанные с НП данные получены из клинических центров России, Украины и Белоруссии.

Всего набрано 622 пациента из 70 клинических центров, расположенных в 59 городах региона РУБ. Общее количество вовлеченных пациентов по всему миру – 1919.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После проведения отбора клинических центров в четырех проанализированных клинических исследованиях было выбрано 70 клинических центров в 59 городах региона РУБ. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Отобранные клинические центры и количество городов их локализации в регионе РУБ

Table 1. Selected clinical centers and the number of cities where they are located in the RUB region

	Нозология Nosology	**Количество центров в регионе РУБ** Number of centers in the region RUB	**Количество городов с открытыми центрами (РУБ)** Number of cities with open centers (RUB)
1	Рак головы и шеи Head and neck cancer	9	8
2	Рак легких Lungs' cancer	27	23
3	Колоректальный рак Colorectal cancer	19	13
4	Идиопатическая пурпура Idiopathic purpura	15	15
Всего Total		70	59

Очевидно, что в основном количество клинических центров превышает количество городов, то есть в одном городе больше одного клинического центра, в то время как для одного исследования по идиопатической пурпуре количество отобранных клинических центров равно количеству городов. Данная картина объясняется географической распространенностью заболеваний. Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) является орфанным заболеванием (закон № 323 «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» от 21.11.2011) с распространенностью не более 10 на 100 тысяч населения. Заболеваемость представлена ниже.

Из анализа таблицы 2 видно, что наиболее привлекательным для открытия клинических центров выглядят локации с наибольшей заболеваемостью. Мы рассмотрели количество центров, открытых в регионе РУБ (таблица 3).

Таблица 2. Абсолютная заболеваемость в России, Украине и Белоруссии[1, 2, 3, 4] по раку головы и шеи, раку легких, колоректальному раку и идиопатической пурпуре в 2000–2020 гг. (на основании усредненных значений заболеваемости на сто тысяч населения в год, по данным [10–14])

Table 2. Absolute incidence in Russia, Ukraine and Belarus[1, 2, 3, 4] for head and neck cancer, lung cancer, colorectal cancer and idiopathic purpura, in 2000–2020 (based on the average incidence rate per one hundred thousand population per year according to [10–14])

№	Страна A country	Рак головы и шеи (рак языка)* Head and neck cancer (tongue cancer)*	Рак легких (немелкоклеточный рак легких)* Lung cancer (non-small cell lung cancer)*	Колоректальный рак* Colorectal cancer*	Идиопатическая хроническая персистирующая пурпура* Idiopathic chronic persistent purpura*
1	2	3	4	5	6
1	Россия Russia	13500	62000	29918	100
2	Украина Ukraine	3000	19330	8500	100
3	Белоруссия Belarus	1514	2430	3400	50

Примечание.

[1] Всемирная организация здравоохранения. Рак. Доступно по: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Ссылка активна на 22.11.2022.

[2] International Agency for Research on Cancer. Available at: https://gco.iarc.fr/ Accessed: 22.11.2022.

[3] Национальное гематологичесоке общество. II научно-практическая конференция «Инфекции в гематологии и трансплантации костного мозга». Доступно по: https://npngo.ru/ Ссылка активна на 22.11.2022.

[4] Федеральная служба государственной статистики. Сдать статистическую отчетность онлайн. Доступно по: https://rosstat.gov.ru/ Ссылка активна на 22.11.2022.

* Протоколы имели ограничения по критериям включения (возраст, диагноз и другие), и поэтому распространенность взята с учетом критериев включения каждого протокола.

Note.

[1] World Health Organization. Cancer. Available at: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Accessed: 22.11.2022.

[2] International Agency for Research on Cancer. Available at: https://gco.iarc.fr/ Accessed: 22.11.2022.

[3] National Hematological Society. II scientific-practical conference "Infections in hematology and bone marrow transplantation". Available at: https://npngo.ru/ Accessed: 22.11.2022.

[4] Federal State Statistics Service. Submit statistical reports online. Available at: https://rosstat.gov.ru/ Accessed: 22.11.2022.

* The protocols had restrictions on inclusion criteria (age, diagnosis, etc.) and therefore the prevalence was taken taking into account the inclusion criteria of each protocol.

Таблица 3. Количество отобранных центров в регионе РУБ

Table 3. Number of selected centers in the RUB region

	Нозология Nosology	Россия Russia	Украина Ukraine	Белоруссия Belorrusia
1	2	3	4	5
1	Рак головы и шеи Head and neck cancer	7	0	2
2	Рак легких Lungs' cancer	13	14	0
3	Колоректальный рак Colorectal cancer	13	6	0
4	Идиопатическая пурпура Idiopathic purpura	11	4	0
Всего Total		44	24	2

Таблица 4. Распространенность заболеваний по раку головы и шеи, идиопатической пурпуре (ИТП), колоректальному раку и раку легких в России, Украине и Белоруссии, по данным (на основании заболеваемости на сто тысяч населения) по раку головы и шеи[1], раку легких[2], колоректальному раку[3] и идиопатической пурпуре[4] на 2000–2020 гг. по городам, в которых были открыты клинические центры

Table 4. The prevalence of diseases for head and neck cancer, idiopathic purpura (ITP), colorectal cancer and lung cancer in Russia, Ukraine and Belarus, according to data (based on incidence per hundred thousand population) for head and neck cancer[1], cancer lungs[2], colorectal cancer[3], and idiopathic purpura[4], for 2000-2020 for cities where clinical centers were opened

Город City	Код исследования Study	Страна Country	Нозология Nosology	Распространенность исследуемой нозологии (случаев в год) Prevalence of the studied nosology (cases per year)
1	2	3	4	5
Москва Moscow	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	1018
Сочи Sochi	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	34
Санкт-Петербург Saint Petersburg	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	500

Продолжение таблицы 4

Город City	**Код исследования** Study	**Страна** Country	**Нозология** Nosology	**Распространенность исследуемой нозологии (случаев в год)** Prevalence of the studied nosology (cases per year)
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Курск Kursk	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	102
Витебск Vitebsk	CS001P3	Белоруссия Belarus	Рак головы и шеи Head and neck cancer	57
Минск Minsk	CS001P3	Белоруссия Belarus	Рак головы и шеи Head and neck cancer	305
Санкт-Петербург Saint Petersburg	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	500
Омск Omsk	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	177
Екатеринбург Ekaterinburg	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	398
Челябинск Chelyabinsk	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	489
Пенза Penza	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	221
Тула Tula	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	202
Санкт-Петербург Saint Petersburg	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	2294
Москва Moscow	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	4914
Сочи Sochi	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	155
Санкт-Петербург Saint Petersburg	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	2294
Владивосток Vladivostok	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	255
Донецк Donetsk	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	411
Черновцы Chernivtsi	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	108
Луцк Lutsk	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	92
Запорожье Zaporozhye	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	321
Киев Kyiv	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	1199
Киев Kyiv	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	1199
Волгоград Volgograd	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	434
Пятигорск Pyatigorsk	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	62
Самара Samara	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	490
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	541
Воронеж Voronezh	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	385
Ставрополь Stavropol	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	164

Продолжение таблицы 4

Город City	**Код исследования** Study	**Страна** Country	**Нозология** Nosology	**Распространенность исследуемой нозологии (случаев в год)** Prevalence of the studied nosology (cases per year)
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Кривой Рог Krivoy Rog	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	292
Сумы Sumy	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	123
Киев Kyiv	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	1199
Казань Kazan	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	496
Харьков Kharkiv	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	610
Москва Moscow	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	4914
Днепропетровск Dnepropetrovsk	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	416
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	1107
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	1107
Москва Moscow	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	2371
Барнаул Barnaul	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	128
Ярославль Yaroslavl	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	123
Екатеринбург Ekaterinburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	883
Донецк Donetsk	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	181
Черкассы Cherkasy	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	53
Днепропетровск Dnepropetrovsk	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	183
Москва Moscow	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	2257
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	1107
Москва Moscow	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	2371
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	1107
Тамбов Tambov	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	58
Запорожье Zaporozhye	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	141
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	261
Москва Moscow	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	2371
Киев Kyiv	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	527

Окончание таблицы 4

Город City	**Код исследования** Study	**Страна** Country	**Нозология** Nosology	**Распространенность исследуемой нозологии (случаев в год)** Prevalence of the studied nosology (cases per year)
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Харьков Kharkiv	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	268
Тула Tula	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	0
Ижевск Izhevsk	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	0
Санкт-Петербург Saint Petersburg	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	4
Киев Kyiv	SM101-201	Украина Ukraine	ИТП ITP	6
Днепропетровск Dnepropetrovsk	SM101-201	Украина Ukraine	ИТП ITP	2
Одесса Odessa	SM101-201	Украина Ukraine	ИТП ITP	2
Электросталь Elektrostal	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	0
Екатеринбург Ekaterinburg	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	3
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	1
Рязань Ryazan	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	0
Краснодар Krasnodar	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	1
Сочи Sochi	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	0
Харьков Kharkiv	SM101-201	Украина Ukraine	ИТП ITP	3
Саратов Saratov	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	1
Москва Moscow	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	8

Примечание.

[1] Белякова Е. Н., Брико Н. И., Лопухов П. Д. Характеристика заболеваемости раком головы и шеи, потенциально ассоциированным с вирусом папилломы человека, в России в 2007—2018 гг.. *Профилактическая медицина*. 2021;24(2):30–36. DOI: 10.17116/profmed20212402130.

[2] Мерабишвили В. М., Дятченко О. Т. Статистика рака легкого (заболеваемость, смертность, выживаемость). *Практическая онкология*. 2000;3:3–7.

[3] Маметьева Ю. А., Завьялов Д. В., Камкина Г. В., Кашин С. В., Нестеров П. В. Колоректальный рак у лиц молодого возраста. Эпидемиологическая ситуация в Ярославской области. *Доказательная гастроэнтерология*. 2019;8(4):68–75. DOI: 10.17116/dokgastro2019804-05168.

[4] Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (первичной иммунной тромбоцитопении) у взрослых. Доступно по: https://npngo.ru/uploads/media_document/283/5eb37419-9276-4e9a-b075-0e26a788f623.pdf. Ссылка активна на 22.11.2022.

Note.

[1] Belyakova E. N., Briko N. I., Lopukhov P. D. Characteristics of the head and neck cancer incidence potentially associated with human papillomavirus in Russia in 2007—2018. *Profilakticheskaya Meditsina*. 2021;24(2):30-36. (In Russ.) DOI: 10.17116/profmed20212402130.

[2] Merabishvili V. M., Dyatchenko O. T. Lung cancer statistics (morbidity, mortality, survival). *Practical oncology*. 2000;3:3–7.

[3] Mametyeva Yu. A., Zavyalov D. V., Kamkina G. V., Kashin S. V., Nesterov P. V. Colorectal cancer in young people. Epidemiological situation in the Yaroslavl region. *Dokazatel'naya gastroenterologiya*. 2019;8(4):68–75. DOI: 10.17116/dokgastro2019804-05168. 2019;8(4):68–75. DOI: 10.17116/dokgastro2019804-05168.

[4] National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura (primary immune thrombocytopenia) in adults. Available at: https://npngo.ru/uploads/media_document/283/5eb37419-9276-4e9a-b075-0e26a788f623.pdf. Accessed: 22.11.2022.

Видно, что наибольшее количество отобранных центров – в России, наименьшее – в Белоруссии. Далее проанализирована заболеваемость по городам, где были отобраны клинические центры (таблица 4).

Видно, что заболеваемость по нозологии рака головы и шеи для одного региона составляет в абсолютных значениях от 57 до 1018 пациентов, для рака легких – от 62 до 4914 пациентов, для колоректального рака – от 53 до 2371 пациента, что значительно повышает вероятность вовлечения пациентов в клиническое исследование. По нозологии ИТП заболеваемость составляла от 0 до 8 пациентов. Согласно этому распределению можно ожидать предполагаемый набор пациентов как интегративную цифру, предложенную главным исследователем, соответствующую заболеваемости в регионе локализации клинического центра. Далее мы проанализировали предложенный набор пациентов в отобранных клинических центрах (таблица 5).

Таблица 5. Прогноз набора пациентов на этапе начала исследования (предполагаемый набор пациентов)

Table 5. Prognosis of enrollment at the start of the study (estimated enrollment)

Город City	**Код исследования** Study	**Страна** Country	**Нозология** Nosology	**Планируемый набор пациентов** Proposed recruitment
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Москва Moscow	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	5
Сочи Sochi	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	5
Санкт-Петербург Saint Petersburg	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	5
Курск Kursk	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	5
Витебск Vitebsk	CS001P3	Белоруссия Belarus	Рак головы и шеи Head and neck cancer	12
Минск Minsk	CS001P3	Белоруссия Belarus	Рак головы и шеи Head and neck cancer	12
Санкт-Петербург Saint Petersburg	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	5
Омск Omsk	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	5
Екатеринбург Ekaterinburg	CS001P3	РФ Russian Federation	Рак головы и шеи Head and neck cancer	5
Челябинск Chelyabinsk	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	12
Пенза Penza	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	6
Тула Tula	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	15
Санкт-Петербург Saint Petersburg	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	12
Москва Moscow	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	10
Сочи Sochi	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	10
Санкт-Петербург Saint Petersburg	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	12
Владивосток Vladivostok	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	5
Донецк Donetsk	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	14
Черновцы Chernivtsi	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	15
Луцк Lutsk	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	15
Запорожье Zaporozhye	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	12
Киев Kyiv	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	13

Продолжение таблицы 5

Город **City**	**Код исследования** **Study**	**Страна** **Country**	**Нозология** **Nosology**	**Планируемый набор пациентов** **Proposed recruitment**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Киев Kyiv	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	12
Волгоград Volgograd	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	18
Пятигорск Pyatigorsk	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	12
Самара Samara	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	8
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	24
Воронеж Voronezh	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	14
Ставрополь Stavropol	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	10
Кривой Рог Krivoy Rog	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	12
Сумы Sumy	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	25
Киев Kyiv	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	15
Казань Kazan	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	7
Харьков Kharkiv	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	14
Москва Moscow	STA9090	РФ Russian Federation	Рак легких Lungs' cancer	10
Днепропетровск Dnepropetrovsk	STA9090	Украина Ukraine	Рак легких Lungs' cancer	12
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Москва Moscow	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Барнаул Barnaul	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	10
Ярославль Yaroslavl	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	10
Екатеринбург Ekaterinburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Донецк Donetsk	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	6
Черкассы Cherkasy	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	10
Днепропетровск Dnepropetrovsk	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	10
Москва Moscow	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Москва Moscow	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15

Окончание таблицы 5

Город City	**Код исследования** Study	**Страна** Country	**Нозология** Nosology	**Планируемый набор пациентов** Proposed recruitment
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Тамбов Tambov	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Запорожье Zaporozhye	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	10
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Москва Moscow	LSO-OL006	РФ Russian Federation	Колоректальный рак Colorectal cancer	15
Киев Kyiv	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	8
Харьков Kharkiv	LSO-OL006	Украина Ukraine	Колоректальный рак Colorectal cancer	12
Тула Tula	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	4
Ижевск Izhevsk	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	2
Санкт-Петербург Saint Petersburg	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	4
Киев Kyiv	SM101-201	Украина Ukraine	ИТП ITP	9
Днепропетровск Dnepropetrovsk	SM101-201	Украина Ukraine	ИТП ITP	5
Одесса Odessa	SM101-201	Украина Ukraine	ИТП ITP	2
Электросталь Elektrostal	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	8
Екатеринбург Ekaterinburg	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	9
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	6
Рязань Ryazan	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	4
Краснодар Krasnodar	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	5
Сочи Sochi	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	8
Харьков Kharkiv	SM101-201	Украина Ukraine	ИТП ITP	9
Саратов Saratov	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	8
Москва Moscow	SM101-201	РФ Russian Federation	ИТП ITP	15

Графически данные таблиц 4 и 5 представлены на рисунке 1.

При сопоставлении таблиц 4 и 5 и рисунка 1 видно, что предполагаемый набор пациентов был либо значительно выше заболеваемости в регионе, либо значительно ниже. Все центры предлагали набор пациентов от 2 и выше, что объединяло их, то есть все центры имели тот или иной потенциал набора пациентов, и на основании этого мы провели типирование центров. Клинические центры (КЦ), потенциально имевшие пациентов и планировавшие набрать определенное количество пациентов, распределены в четыре группы (первое типирование):

- до 1 пациента – низкий потенциал набора пациентов;
- от 1 до 10 пациентов – умеренный потенциал набора пациентов;
- от 11 до 23 пациентов – средний потенциал набора пациентов;
- более 23 пациентов – высокий потенциал набора пациентов.

Распределение центров представлено в таблице 6.

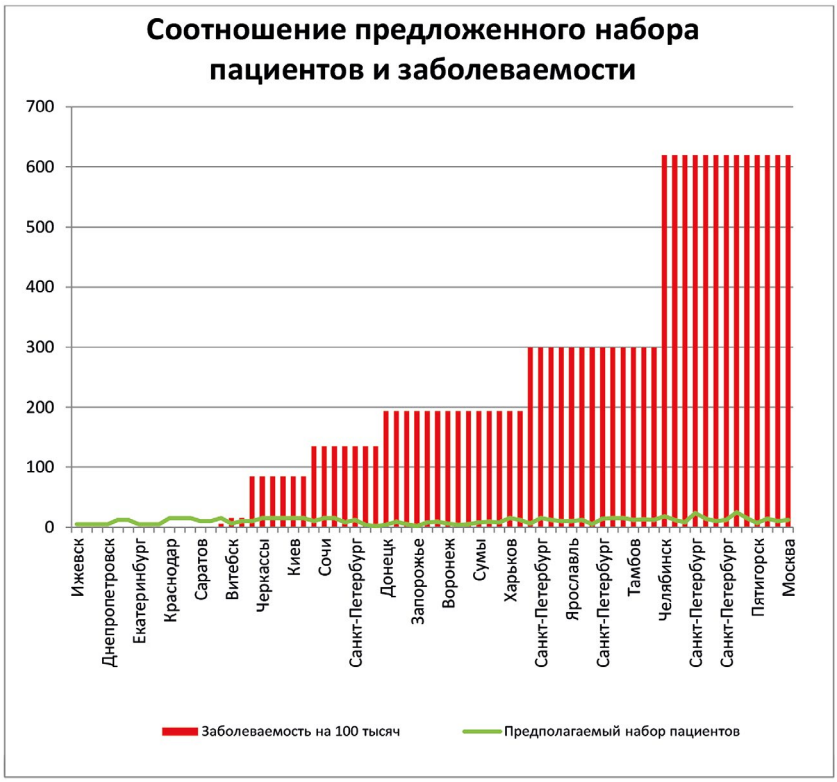


Рисунок 1. Соотношение заболеваемости и предполагаемого набора пациентов: по оси абсцисс – регион локализации клинического центра, по оси ординат – количество пациентов

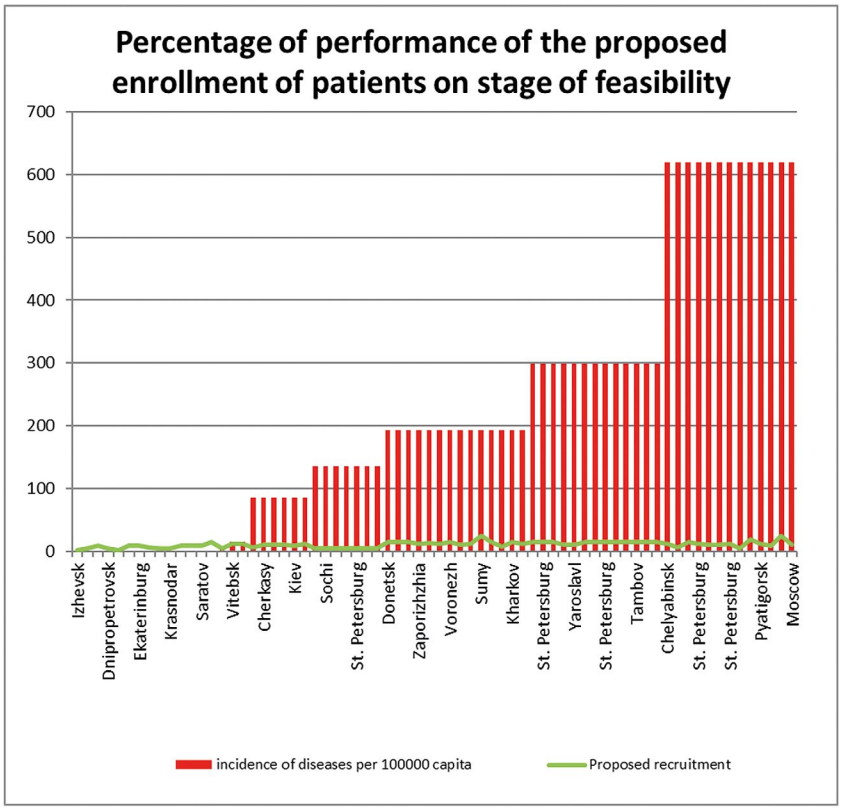


Figure 1. Correlation between the incidence and the expected number of patients – along the abscissa axis – the region of localization of the clinical center, along the ordinate axis – the number of patients

Таблица 6. Распределение клинических центров по величине предполагаемого набора пациентов

Table 6. Distribution of clinical centers by expected patient enrollment

№	Клинические центры по набору пациентов Sites on recruitment potential	Количество клинических центров Number of sites
1	2	3
1	Без пациентов Without patients	0
2	Низкий потенциал набора пациентов (потенциально низкорекрутинговые клинические центры после старта набора пациентов) Low recruitment potential (potentially low-recruiting clinical centers after the start of recruitment)	0
3	Умеренный потенциал (потенциально среднерекрутинговые центры после старта набора пациентов) Moderate potential (potentially medium recruiting centers after the start of patient recruitment)	36
4	Средний и высокий потенциал (потенциально высокорекрутинговые центры после старта набора пациентов) Medium and high potential (potentially high recruitment centers after the start of patient recruitment)	34

Зная финальный набор пациентов по каждому центру, мы проанализировали его (таблица 7).

Видно, что значительная часть клинических центров не выполнила предполагаемый набор пациентов.

Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8. Распределение клинических центров и значений набора пациентов в регионе РУБ (группа А – это клинические центры, в которых главные исследователи не выполнили предполагаемый набор пациентов, группа Б – это клинические центры, в которых предполагаемый набор выполнен, группа С – это клинические центры, в которых предполагаемый набор выполнен и перевыполнен)

Table 8. Distribution of clinical centers and enrollment values in the RUB region (Group A is the sites where the Principal Investigators did not reach their intended enrollment, Group B is the CCs where the expected recruitment was met, and Group C is the CCs where the estimated recruitment was met and exceeded)

№	Количество пациентов предполагаемых и не набранных (А) Number of proposed patients and not recruited (A)	Количество пациентов предполагаемых и набранных (Б) Number of patients expected and recruited (B)	Количество пациентов набранных, предполагаемых и выше предполагаемого (С) Number of patients recruited as expected and above estimated (C)
1	2	3	4
	249 (26 центров) 249 (26 sites)	480 (44 центра) 480 (44 sites)	622 (44 центра) 622 (44 sites)
Всего А + Б Total A + B		729	
% выполнения % performance		85 %	

Видно, что изначально предполагалось набрать на 107 (15 %) пациентов больше согласно данным опроса на этапе отбора клинических центров по параметру «предварительный набор пациентов».

Таблица 7. Распределение общего количества проживающих в стране и городе открытия центра, заболеваемости, предполагаемого (обещанного) набора пациентов и финального набора

Table 7. Distribution of the total number of people living in the country and city of the opening of the center, incidence, expected (promised) enrollment of patients and final enrollment

Город City	Код исследования Study	Заболеваемость нозологией протокола на сто тысяч населения The incidence of protocol nosology per one hundred thousand population	Планируемый набор пациентов Planned enrollment of patients	Финальное число набранных пациентов Final number of recruited patients	Процент выполнения предполагаемого (обещанного) набора пациентов Percentage of completion of the expected (promised) enrollment of patients
1	2	3	4	5	6
Москва Moscow	CS001P3	1018	5	0	0
Сочи Sochi	CS001P3	34	5	0	0
Санкт-Петербург Saint Petersburg	CS001P3	500	5	0	0
Курск Kursk	CS001P3	102	5	1	20
Витебск Vitebsk	CS001P3	57	12	22	183
Минск Minsk	CS001P3	305	12	32	267
Санкт-Петербург Saint Petersburg	CS001P3	500	5	75	1500

Продолжение таблицы 7

Город City	**Код исследования** Study	**Заболеваемость нозологией протокола на сто тысяч населения** The incidence of protocol nosology per one hundred thousand population	**Планируемый набор пациентов** Planned enrollment of patients	**Финальное число набранных пациентов** Final number of recruited patients	**Процент выполнения предполагаемого (обещанного) набора пациентов** Percentage of completion of the expected (promised) enrollment of patients
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Омск Omsk	CS001P3	177	5	60	1200
Екатеринбург Ekaterinburg	CS001P3	398	5	68	1360
Челябинск Chelyabinsk	STA9090	489	12	0	0
Пенза Penza	STA9090	221	6	0	0
Тула Tula	STA9090	202	15	0	0
Санкт-Петербург Saint Petersburg	STA9090	2294	12	0	0
Москва Moscow	STA9090	4914	10	0	0
Сочи Sochi	STA9090	155	10	0	0
Санкт-Петербург Saint Petersburg	STA9090	2294	12	0	0
Владивосток Vladivostok	STA9090	255	5	0	0
Донецк Donetsk	STA9090	411	14	0	0
Черновцы Chernivtsi	STA9090	108	15	0	0
Луцк Lutsk	STA9090	92	15	0	0
Запорожье Zaporozhye	STA9090	321	12	0	0
Киев Kyiv	STA9090	1199	13	0	0
Киев Kyiv	STA9090	1199	12	0	0
Волгоград Volgograd	STA9090	434	18	1	6
Пятигорск Pyatigorsk	STA9090	62	12	1	8
Самара Samara	STA9090	490	8	2	25
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	STA9090	541	24	2	8
Воронеж Voronezh	STA9090	385	14	1	7
Ставрополь Stavropol	STA9090	164	10	2	20
Кривой Рог Krivoy Rog	STA9090	292	12	2	17
Сумы Sumy	STA9090	123	25	2	8
Киев Kyiv	STA9090	1199	15	3	20
Казань Kazan	STA9090	496	7	11	157
Харьков Kharkiv	STA9090	610	14	12	86

Продолжение таблицы 7

Город City	**Код исследования** Study	**Заболеваемость нозологией протокола на сто тысяч населения** The incidence of protocol nosology per one hundred thousand population	**Планируемый набор пациентов** Planned enrollment of patients	**Финальное число набранных пациентов** Final number of recruited patients	**Процент выполнения предполагаемого (обещанного) набора пациентов** Percentage of completion of the expected (promised) enrollment of patients
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Москва Moscow	STA9090	4914	10	36	360
Днепропетровск Dnepropetrovsk	STA9090	416	12	34	283
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	1107	15	0	0
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	1107	15	0	0
Москва Moscow	LSO-OL006	2371	15	0	0
Барнаул Barnaul	LSO-OL006	128	10	3	30
Ярославль Yaroslavl	LSO-OL006	123	10	4	40
Екатеринбург Ekaterinburg	LSO-OL006	883	15	3	20
Донецк Donetsk	LSO-OL006	181	6	5	83
Черкассы Cherkasy	LSO-OL006	53	10	3	30
Днепропетровск Dnepropetrovsk	LSO-OL006	183	10	3	30
Москва Moscow	LSO-OL006	2257	15	7	47
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	1107	15	7	47
Москва Moscow	LSO-OL006	2371	15	11	73
Санкт-Петербург Saint Petersburg	LSO-OL006	1107	15	11	73
Тамбов Tambov	LSO-OL006	58	15	11	73
Запорожье Zaporozhye	LSO-OL006	141	10	11	110
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	LSO-OL006	261	15	33	220
Москва Moscow	LSO-OL006	2371	15	36	240
Киев Kyiv	LSO-OL006	527	8	35	438
Харьков Kharkiv	LSO-OL006	268	12	33	275
Тула Tula	SM101-201	0	4	0	0
Ижевск Izhevsk	SM101-201	0	2	0	0
Санкт-Петербург Saint Petersburg	SM101-201	4	4	0	0
Киев Kyiv	SM101-201	6	9	0	0
Днепропетровск Dnepropetrovsk	SM101-201	2	5	0	0
Одесса Odessa	SM101-201	2	2	0	0

Окончание таблицы 7

Город City	**Код исследования** Study	**Заболеваемость нозологией протокола на сто тысяч населения** The incidence of protocol nosology per one hundred thousand population	**Планируемый набор пациентов** Planned enrollment of patients	**Финальное число набранных пациентов** Final number of recruited patients	**Процент выполнения предполагаемого (обещанного) набора пациентов** Percentage of completion of the expected (promised) enrollment of patients
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Электросталь Elektrostal	SM101-201	0	8	2	25
Екатеринбург Ekaterinburg	SM101-201	3	9	6	67
Нижний Новгород Nizhny Novgorod	SM101-201	1	6	6	100
Рязань Ryazan	SM101-201	0	4	2	50
Краснодар Krasnodar	SM101-201	1	5	3	60
Сочи Sochi	SM101-201	0	8	1	13
Харьков Kharkiv	SM101-201	3	9	3	33
Саратов Saratov	SM101-201	1	8	8	100
Москва Moscow	SM101-201	8	15	8	53

Далее мы проанализировали три скорости НП, которые необходимы, чтобы получить:

- таргетный НП;
- набор пациентов, предложенный КЦ;
- фактически полученную цифру набора после завершения НП (таблицы 9 и 10).

Из таблицы 10 скорости набора пациентов можно высчитать среднюю скорость фактического набора пациентов – 0,435 пациента в месяц для всех четырех нозологий.

На основании среднего значения фактической скорости набора пациентов и разброса средних значений мы провели следующее типирование центров (в отличие от первого, на основе предполагаемого набора пациентов) и выявили следующие типы:

Таблица 9. **Количество вовлеченных пациентов**

Table 9. **Number of patients involved**

	Нозология Nosology	**Фактически набранное количество пациентов по всему миру** Actual number of patients recruited worldwide	**Фактически набранное количество пациентов в регионе РУБ** Actually recruited number of patients in the RUB region	**Таргетное количество пациентов** Target number of patients
1	**2**	**3**	**4**	**5**
1	Рак головы и шеи Head and neck cancer	982	258	784
2	Рак легких Lungs' cancer	483	109	450
3	Колоректальный рак Colorectal cancer	385	216	340 840 (две фазы: 340 и 500 человек) 840 (two phases per 340 и 500 patients)
4	Идиопатическая пурпура Idiopathic purpura	69	39	69
Всего Total		1919	622	2143

Таблица 10. Значения таргетной, предполагаемой и фактической скоростей набора пациентов

Table 10. Values of target, estimated and actual patient recruitment rates

	Нозология Nosology	**Расчетная (таргетная) скорость набора пациентов (в месяц)** Estimated (targeted) patient recruitment rate (per month)	**Предполагаемая скорость набора пациентов (в месяц) (% от таргетного – деление таргетной скорости на 100 и умножение на предполагаемую)** Estimated patient recruitment rate, months (% of the target rate – target rate divided by 100 and multiplied by the estimated one)	**Скорость набора пациентов фактическая (в месяц)** Actual patient recruitment rate, months
1	**2**	**3**	**4**	**5**
1	Рак головы и шеи Head and neck cancer	0,65	0,2 (31 %)	1,1
2	Рак легких Lungs' cancer	1,3	1,06 (81 %)	0,15
3	Колоректальный рак Colorectal cancer	0,5	1,05 (210 %)	0,43
4	Идиопатическая пурпура Idiopathic purpura	0,35	0,7 (200 %)	0,06

- молчащие сайты – со скоростью набора 0 пациентов в месяц;
- низкорекрутинговые – скорость набора от 0,01 до 0,19 пациента в месяц (то есть 1 пациент за 5 месяцев);
- среднерекрутинговые – скорость набора от 0,20 до 0,89 пациента в месяц (то есть 1 пациент за 5–1,4 месяца);
- высокорекрутинговые – скорость набора от 0,90 до 3 пациентов в месяц (то есть 1 пациент за 1,1–0,3 месяца).

Далее мы проанализировали типы центров до и после завершения набора пациентов (таблица 11).

37 % клинических центров не набрали пациентов.

Обсуждение

По данным литературы, в клинических исследованиях во II–III фазах клинические центры перед исследованием предлагают набрать одно количество пациентов, а после старта набора пациентов большинство центров не набирают ни одного пациента [14–16]. Наши данные указывают, что в успешных исследованиях по набору пациентов 37 % клинических центров не набирали пациентов.

По данным литературы, решение о включении сайта в исследование строится на основании субъективного мнения или решения, сфокусированного на исследователе, а не на наборе пациентов [17, 18]. Мы также нашли, что сайты отбираются в клиническое исследование, объективно не имея пациентов в регионе локализации.

Авторы отмечают, что одним из показателей высокого качества клинического центра является скорость набора пациентов [19]. Тем не менее градация клинических центров по скорости набора пациентов в литературе отсутствует, и мы впервые предложили оценку клинического центра по скорости набора пациентов, типировав центры по 4 группам. Также мы предложили типировать центры по набору пациентов до старта набора пациентов на основании предпола-

Таблица 11. Распределение типов клинических центров до и после завершения набора пациентов

Table 11. Distribution of types of clinical centers before and after completion of patient recruitment

№	**Клинические центры по набору пациентов** Clinical centers by patient recruitment	**До исследования** Before study	**После исследования** After the study
1	**2**	**3**	**4**
1	Молчащие Silent	0	26 (37 %)
2	Низкорекрутинговые (низкий потенциал набора пациентов) Low recruiting (low recruitment potential)	0	5 (7 %)
3	Среднерекрутинговые (умеренный потенциал) Medium recruiting (moderate potential)	36 (51 %)	22 (31 %)
4	Высокорекрутинговые (средний и высокий потенциал) Highly recruiting (medium and high potential)	34 (49 %)	16 (23 %) (6 со средним потенциалом набора) 16 (23 %) (6 with medium potential)

гаемого набора пациентов. Средняя скорость набора пациентов в США в 2007 году во всех проводимых клинических исследованиях по всем нозологиям (более 30 000 клинических исследований) составила 0,7 пациента в месяц [20]. По данным нашего анализа четырех клинических исследований, в регионе РУБ скорость набора пациентов в 2017 году составила 0,435 пациента в месяц, что требует дальнейшего изучения по более расширенным данным.

По данным литературы, в клинических исследованиях из отобранных центров только 18 % [7] и 20 % [9] выполнили обещанный набор. Наши данные составили 63 % в регионе РУБ.

По данным литературы, набор пациентов падает до 20 % от ожидаемого после старта исследования – феномен Лазанна [9]. По нашим данным, предложенный центрами набор в итоге оказался на 15 % больше, чем количество набранных пациентов. Таким образом, можно выделить следующие закономерности набора пациентов в международные мультицентровые клинические исследования:

1) до старта набора пациентов все клинические центры обладают разным потенциалом набора пациентов, который всегда больше нуля;
2) после старта набора пациентов клинические центры, не набравшие пациентов, составляют от 37 до 86 %;
3) для достижения таргетного НП предполагаемый НП должен быть больше таргетного набора пациентов не менее чем на 15 %;
4) существуют три скорости набора пациентов – предполагаемая, таргетная и фактическая.

Согласно данным различных авторов [4, 5], процесс набора пациентов подвержен влиянию многочисленных факторов, в числе которых конкурентные исследования, размер гранта, особенности организации медицинской и специализированной помощи, когда пациенты перераспределяются между клиниками и спонсор может выбрать клинику, где исходя из организации медицинской помощи мало пациентов изначально, а не из-за заболеваемости в регионе; однако мы исходили из того, что исследователь, называя цифру набора пациентов перед стартом исследования, учитывает все эти моменты, и предложенная цифра набора пациентов является интегративной и комплексной с учетом влияния указанных выше факторов. Наш подход согласуется с данными литературы [21] и, в свою очередь, имеет ограничения, влияние которых требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены некоторые закономерности набора пациентов в клинических исследованиях. Мы не затрагивали качественную сторону процесса набора. Установленные нами закономерности позволят лучше планировать проведение клинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malgorzata M.-W. Patient-Centered Recruitment and Retention. *Applied Clinical Trials*. 2022. Available at: https://www.appliedclinicaltrialsonline.com/view/patient-centered-recruitment-and-retention. Accessed: 22.11.2022.
2. Crowther M. Phase 4 research: what happens when the rubber meets the road? *Hematology*. 2013;1:5–18. DOI: 10.1182/asheducation-2013.1.15.
3. Hwang T. J., Carpenter D., Lauffenburger J. C., Wang B., Franklin J. M., Kesselheim A. S. Failure of investigational drugs in late-stage clinical development and publication of trial results. *JAMA Internal Medicine*. 2016;176(12):1826–1833. DOI: 10.1001/jamainternmed.2016.6008.
4. Fogel D. B. Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: A review. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 2018;11:156–164. DOI: 10.1016/j.conctc.2018.08.001.
5. Woodin K. E., Schneider J. C. The CRA's Guide to Monitoring Clinical Research. Third Edition. Falls Church: CenterWatch. 2011. 678 p.
6. Саватеев А. В., Белоцерковский М. В., Мосчицка К., Палумбо Д. Оценка физибильности как краеугольный камень успешного клинического исследования. *Качественная клиническая практика*. 2013;(2):37–46.
7. van den Bora R. M., Grobbee D. E., Oosterman B. J., Vaessen P. W. J., Roes K. C. B. Predicting enrollment performance of investigational centers in phase III multi-center clinical trials. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 2017;7:208–216. DOI: 10.1016/j.conctc.2017.07.004.
8. Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment or prevention of diabetes mellitus. Amsterdam: European Medicines Agency. 2018. 24 p. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-clinical-investigation-medicinal-products-treatment-prevention-diabetes-mellitus_en.pdf. Accessed: 22.11.2022.
9. Reuter S., Chiu G. R. How effective are site questionnaires in predicting site performance? *J. Clin. Res. Best Pract*. 2007;3(4).
10. Wild C. P., Weiderpass E., Stewart B. W., editors. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2020. Available at: http://publications.iarc.fr/586. Accessed: 20.11.2022.
11. 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.
12. Мерабишвили В. М., Дятченко О. Т. Статистика Рака Легкого (заболеваемость, смертность, выживаемость). *Практическая онкология*. 2000;3:3–7.
13. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
14. Cox K., McGarry J. Why patients don't take part in cancer clinical trials: an overview of the literature. *European journal of cancer care*. 2003;12(2):114–122. DOI: 10.1046/j.1365-2354.2003.00396.x.
15. Jones R. H., White H., Velazquez E. J., Shaw L. K., Pietrobon R., Panza J. A., Bonow R. O., Spoko G., O'Connor C. M., Rouleau J.-L., STICH (surgical treatment for ischemic heart failure) trial enrollment. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2010;56(6):490–498. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.11.102.
16. Bennette C. S., Ramsey S. D., McDermott C. L., Carlson J. J., Basu A., Veenstra D. L. Predicting low accrual in the National Cancer Institute's cooperative group clinical trials. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(2):djv324. DOI: 10.1093/jnci/djv324.

17. Bachenheimer B. J. F., Brescia B. A. Reinventing Patient Recruitment Revolutionary Ideas for Clinical Trial Success. New York: Routledge. 2007. 276 p.
18. Kibby M. Models for success. *Good Clinical Practice Journal*. 2005;12(6):31–33.
19. Yang E., O'Donovan C., Phillips J., Atkinson L., Ghosh K., Agrafiotis D. K. Quantifying and visualizing site performance in clinical trials. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 2018;9:108–114. DOI: 10.1016/j.conctc.2018.01.005.
20. Wolf L. Expanding good recruitment practice. *Journal of GXP compliance*. 2007. P. 36–49.
21. Corrigan M. H., Glass H. E. Physician Participation in Clinical Studies and Subsequent Prescribing of New Drugs. *Pharmacy and Therapeutics (P&T).* 2005;30(1):60–66.

REFERENCES

1. Malgorzata M.-W. Patient-Centered Recruitment and Retention. *Applied Clinical Trials*. 2022. Available at: https://www.appliedclinicaltrialsonline.com/view/patient-centered-recruitment-and-retention. Accessed: 22.11.2022.
2. Crowther M. Phase 4 research: what happens when the rubber meets the road? *Hematology*. 2013;1:5–18. DOI: 10.1182/asheducation-2013.1.15.
3. Hwang T. J., Carpenter D., Lauffenburger J. C., Wang B., Franklin J. M., Kesselheim A. S. Failure of investigational drugs in late-stage clinical development and publication of trial results. *JAMA Internal Medicine*. 2016;176(12):1826–1833. DOI: 10.1001/jamainternmed.2016.6008.
4. Fogel D. B. Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: A review. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 2018;11:156–164. DOI: 10.1016/j.conctc.2018.08.001.
5. Woodin K. E., Schneider J. C. The CRA's Guide to Monitoring Clinical Research. Third Edition. Falls Church: CenterWatch. 2011. 678 p.
6. Savateev A. V., Belotserkovsky M. V., Moscicka K., Palumbo D. Physical assessment as a cornerstone of a successful clinical trial. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*. 2013;(2):37–46. (In Russ.)
7. van den Bora R. M., Grobbee D. E., Oosterman B. J., Vaessen P. W. J., Roes K. C. B. Predicting enrollment performance of investigational centers in phase III multi-center clinical trials. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 2017;7:208–216. DOI: 10.1016/j.conctc.2017.07.004.
8. Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment or prevention of diabetes mellitus. Amsterdam: European Medicines Agency. 2018. 24 p. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-clinical-investigation-medicinal-products-treatment-prevention-diabetes-mellitus_en.pdf. Accessed: 22.11.2022.
9. Reuter S., Chiu G. R. How effective are site questionnaires in predicting site performance? *J. Clin. Res. Best Pract*. 2007;3(4).
10. Wild C. P., Weiderpass E., Stewart B. W., editors. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2020. Available at: http://publications.iarc.fr/586. Accessed: 20.11.2022.
11. Kaprin A. D., Starinsky V. V., Shakhzadova A. O. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Moscow: MNIOI im. P.A. Herzen branch of the National Medical Research Center for Radiology of the Ministry of Health of Russia. 2021. 252 p. (In Russ.)
12. Merabishvili V. M., Diatchenko O. T. Lung Cancer Statistics (incidence, mortality, survival). *Practical oncology*. 2000;3:3–7. (In Russ.)
13. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
14. Cox K., McGarry J. Why patients don't take part in cancer clinical trials: an overview of the literature. *European journal of cancer care*. 2003;12(2):114–122. DOI: 10.1046/j.1365-2354.2003.00396.x.
15. Jones R. H., White H., Velazquez E. J., Shaw L. K., Pietrobon R., Panza J. A., Bonow R. O., Spoko G., O'Connor C. M., Rouleau J.-L., STICH (surgical treatment for ischemic heart failure) trial enrollment. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2010;56(6):490–498. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.11.102.
16. Bennette C. S., Ramsey S. D., McDermott C. L., Carlson J. J., Basu A., Veenstra D. L. Predicting low accrual in the National Cancer Institute's cooperative group clinical trials. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(2):djv324. DOI: 10.1093/jnci/djv324.
17. Bachenheimer B. J. F., Brescia B. A. Reinventing Patient Recruitment Revolutionary Ideas for Clinical Trial Success. New York: Routledge. 2007. 276 p.
18. Kibby M. Models for success. *Good Clinical Practice Journal*. 2005;12(6):31–33.
19. Yang E., O'Donovan C., Phillips J., Atkinson L., Ghosh K., Agrafiotis D. K. Quantifying and visualizing site performance in clinical trials. *Contemporary Clinical Trials Communications*. 2018;9:108–114. DOI: 10.1016/j.conctc.2018.01.005.
20. Wolf L. Expanding good recruitment practice. *Journal of GXP compliance*. 2007. P. 36–49.
21. Corrigan M. H., Glass H. E. Physician Participation in Clinical Studies and Subsequent Prescribing of New Drugs. *Pharmacy and Therapeutics (P&T).* 2005;30(1):60–66.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-169-173
UDC: 616.089.844

Check for updates

CC BY 4.0

Research article / Оригинальная статья

Innervation of Facial Muscles Using an Allogeneic Biomaterial in an Experiment

Lyalya A. Musina[1], Olga R. Shangina[1], Anna I. Lebedeva[1], Alexey V. Prusakov[2], Anatoliy V. Yashin[2], Vladimir S. Ponamarev[2]✉, Vladimir D. Radnatarov[3], Alexandr M. Lunegov[2]

[1] Bashkir State Medical University, 47, Zaki Validi str., Ufa, Republic of Bashkortostan, 450077, Russia
[2] Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, 5, Chernigovskaya str., Saint Petersburg, 196084, Russia
[3] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education "Buryat State Agriculture Academy by V.R.Philippov"; FSBEI HPE Buryat SAA, 8, Pushkina str., Ulan-Ude, 670024, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir S. Ponamarev. **E-mail:** psevdopyos@mail.ru

ORCID: Lyalya A. Musina – https://orcid.org/0000-0003-1237-9284; Olga R. Shangina – https://orcid.org/0000-0003-1686-1254; Anna I. Lebedeva – https://orcid.org/0000-0002-9170-2600; Alexey V. Prusakov – https://orcid.org/0000-0001-5582-5155; Anatoliy V. Yashin – https://orcid.org/0000-0002-3614-4730; Vladimir S. Ponamarev – https://orcid.org/0000-0002-6852-3110; Vladimir D. Radnatarov – https://orcid.org/0009-0006-5115-7501; Alexandr M. Lunegov – https://orcid.org/0000-0003-4480-9488.

Received: 28.11.2022 **Revised:** 11.07.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. It is known that the problem of regeneration of damaged peripheral nerves is one of the leading problems in traumatology and neurosurgery.

Aim. Aim of the study is to determine the features of the innervation of facial muscles when using allogeneic biomaterials.

Materials and methods. The experiment was performed on Chinchilla rabbits ($n = 36$). The facial nerve was cut in the animals. In the control group ($n = 9$), the wound was sewn up, in the 1st experimental group ($n = 12$), a fragment of their masticatory muscle was sewn together with a neurovascular bundle to the denervated buccal muscle. In the 2nd experimental group ($n = 15$), dispersed allogeneic biomaterials "Regeneration stimulator" and "Vasculogenesis stimulator" were injected into the muscle junction in the operation zone. Rabbits were withdrawn from the experiment for 10, 30, 60 and 180 days. Tissue pieces from the surgery area were examined by transmission electron microscopy.

Results and discussion. In the control and 1st experimental groups, the experiment ended with scarring of the operating area and contracture of facial muscles. In the 2nd experimental group, signs of tissue revascularization and axon germination to the buccal muscle with the restoration of individual neuromuscular synapses were revealed.

Conclusion. The use of allogeneic biomaterials in operations to restore damaged peripheral nerves accompanying muscles creates conditions not only for the restoration of muscle fibers, but also the vascular bed, as well as nerve elements with neuromuscular connections.

Keywords: muscle reinnervation, allogeneic biomaterials, axon growth

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. Lyalya A. Musina, Olga R. Shangina and Anna I. Lebedeva – provision of allogeneic biomaterial, development of research methodology, literature review. Alexey V. Prusakov, Anatoliy V. Yashin, Vladimir S. Ponamarev and Alexandr M. Lunegov – conducting an experiment, sampling, designing an article, communicating with the editors. Vladimir D. Radnatarov – writing an article, literature review. All authors participated in the analysis of the obtained results.

Funding. The work was carried out within the framework of State Assignment No. 056-00124-21-00, approved on December 23, 2020.

Compliance with the principles of ethics. The study was approved by the ethical committee of the Bashkir State Medical University.

For citation: Musina L. A., Shangina O. R., Lebedeva A. I., Prusakov A. V., Yashin A. V., Ponamarev V. S., Radnatarov V. D., Lunegov A. M. Innervation of facial muscles using an allogeneic biomaterial in an experiment. *Drug development & registration*. 2023;12(3):169–173. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-169-173

Реиннервация мимических мышц с использованием аллогенного биоматериала в эксперименте

Л. А. Мусина[1], О. Р. Шангина[1], А. И. Лебедева[1], А. В. Прусаков[2], А. В. Яшин[2], В.С. Понамарёв[2]✉, В. Д. Раднатаров[3], А. М. Лунегов[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (БГМУ), 450077, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 47
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Бурятская государственная сельскохозяйственная академия имени В. Р. Филиппова», 670024, Россия, г. Улан-Удэ, ул. Пушкина, д. 8

✉ **Контактное лицо:** Понамарёв Владимир Сергеевич. **E-mail:** psevdopyos@mail.ru

ORCID: Л. А. Мусина – https://orcid.org/0000-0003-1237-9284; О. Р. Шангина – https://orcid.org/0000-0003-1686-1254; А. И. Лебедева – https://orcid.org/0000-0002-9170-2600; А. В. Прусаков – https://orcid.org/0000-0001-5582-5155; А. В. Яшин – https://orcid.org/0000-0002-3614-4730; В. С. Понамарёв – https://orcid.org/0000-0002-6852-3110; В. Д. Раднатаров – https://orcid.org/0009-0006-5115-7501; А. М. Лунегов – https://orcid.org/0000-0003-4480-9488.

Статья поступила: 28.11.2022 **Статья принята в печать:** 11.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

© Musina L. A., Shangina O. R., Lebedeva A. I., Prusakov A. V., Yashin A. V., Ponamarev V. S., Radnatarov V. D., Lunegov A. M., 2023
© Мусина Л. А., Шангина О. Р., Лебедева А. И., Прусаков А. В., Яшин А. В., Понамарёв В. С., Раднатаров В. Д., Лунегов А. М., 2023

Резюме
Введение. Известно, что проблема регенерации поврежденных периферических нервов является одной из ведущих в травматологии и нейрохирургии.
Цель. Цель исследования – определить особенности иннервации мимических мышц при использовании аллогенных биоматериалов.
Материалы и методы. Опыт выполняли на кроликах породы Шиншилла (n = 36). У животных была произведена перерезка лицевого нерва. В контрольной группе (n = 9) зашивали рану, в 1 опытной группе (n = 12) к денервированной щечной мышце подшивали фрагмент своей жевательной мышцы вместе с нервно-сосудистым пучком. Во 2 опытной группе (n = 15) в место соединения мышц в зоне операции вводили диспергированные аллогенные биоматериалы «Стимулятор регенерации» и «Стимулятор васкулогенеза». Кроликов выводили из опыта на 10, 30, 60 и 180 сутки. Кусочки тканей из зоны операции исследовали методом трансмиссионной электронной микроскопии.
Результаты и обсуждение. В контрольной и 1 опытной группе эксперимент закончился рубцеванием операционной зоны и контрактурой мимических мышц. Во 2 опытной группе были выявлены признаки реваскуляризации тканей и прорастания аксонов к щечной мышце с восстановлением отдельных нервно-мышечных синапсов.
Заключение. Использование аллогенных биоматериалов в операциях по восстановлению поврежденных периферических нервов, сопровождающих мышцы, создает условия не только для восстановления мышечных волокон, но и сосудистого русла, а также нервных элементов с нервно-мышечными соединениями.

Ключевые слова: реиннервация мышц, аллогенные биоматериалы, рост аксонов

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

Вклад авторов. Л. А. Мусина, О. Р. Шанигина и А. И. Лебедева – предоставление аллогеного биоматериала, разработка методики исследования, обзор литературы. А. В. Прусаков, А. В. Яшин, В. С. Понамарёв и А. М. Лунегов – проведение эксперимента, отбор проб, оформление статьи, общение с редакцией. В. Д. Раднатаров – написание статьи, обзор литературы. Все авторы участвовали в анализе поученных результатов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 056-00124-21-00, утвержденного 23 декабря 2020 года.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета

Для цитирования: Мусина Л. А., Шангина О. Р., Лебедева А. И., Прусаков А. В., Яшин А. В., Понамарёв В. С., Раднатаров В. Д., Лунегов А. М. Реиннервация мимических мышц с использованием аллогенного биоматериала в эксперименте. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):169–173. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-169-173

INTRODUCTION

It is known that the problem of damaged peripheral nerves regeneration is one of the leading in traumatology and neurosurgery [1, 2]. On this basis studying of nervous control recovery patterns in injured muscles under different condition has significant theoretical and practical value [3–7]. This knowledge allows improving scientific understanding of neuroplasticity and recognizing factors necessary for successful management of damaged peripheral nerves recovery processes. The choice of reconstructive intervention to restore the nerve trunk should be based not only on the size of the nerve defect, but also take into account a combination of other various factors, one of which is frequent scarring of the surgical area [8–12]. The aim of the study is to determine the features of the innervation of facial muscles when using allogeneic biomaterials.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out on 36 Chinchilla rabbits (weight 2500–3500 g). When working with animals, the international principles of the Helsinki Declaration on the Humane Treatment of Animals (2000) and the Federal Law of the Russian Federation "On the Protection of Animals from Cruelty" dated 01.01.1997 were observed.

Dispersed allogeneic biomaterials Alloplant® ("Regeneration stimulator" and "Vasculogenesis stimulator", manufactured according to specifications 9398-001-04537642-2011 at the All-Russian Center for Eye and Plastic Surgery) were used in the experiment. In all experimental animals, the right facial nerve, which innervates the buccal muscle, was transected. The separated facial nerve was exposed in the area of exit from the temporal bone. In order to exclude the possibility of germination of the fibers of the facial nerve, its trunk was ligated with a compression silk ligature. The incision of the main nerve trunk was performed along the outer edge of the ligature.

In the control group (9 rabbits), reinnervation was not performed, allogeneic biomaterials were not used, soft tissues were sutured in layers. In the 1st experimental group (12 rabbits), after nerve transection, a myoplasty operation was performed with a muscle flap (from the chewing muscle) with a neurovascular bundle. The formed muscle autograft retained the vascular and nervous structures associated with the main part

of the belly of the masticatory muscle. It was sutured to the denervated layer of mimic muscles. In the 2nd experimental group (15 rabbits), an identical myoplastic operation was performed, but a layer of dispersed Alloplant® biomaterials ("Regeneration stimulator" and "Vasculogenesis stimulator") was formed between the muscle autograft of the masticatory muscle and the mimic muscles, manufactured according to TU 9398-001-04537642-2011). Animals were taken out of the experiment on the 10th, 30th, 60th and 180th day after the operation by an overdose of anesthesia. Pieces of tissue from the operation area 1–2 mm in size were studied by electron microscopic examination. The material was fixed and poured into epon-812 using standard methods [8]. Tissue pieces were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in cacodylate buffer (pH 7.2–7.4) for 2 hours, followed by additional fixation in 1 % osmium tetroxide (OsO4) (1 hour in a refrigerator at +4 °C). The material was dehydrated in a battery of alcohols of increasing concentration (ethanol) and absolute acetone, poured into epon-812 resin with polymerization at a temperature of 37 and 60 °C in a thermostat. Ultrathin sections were prepared on an LKB-III 8800 ultramicrotome (Sweden). Sections were counterstained with 2 % aqueous solution of uranyl acetate and lead citrate, studied and photographed using a Jem-1011 electron microscope (Japan, JEOL) at magnifications of 2500–20000.

RESULTS AND DISCUSSION

Atrophic processes in muscle cells developed right after deep dystrophic changes in the control group. Muscle fibers gradually homogenized, subjected to decay (Figure 1). Thinning of the fibers, hypertrophy of the nuclei were noticed, the pattern of transverse striation was smoothed out. Synapses with nerve processes were not detected on the collapsing muscle cells. In this zone, the number of active fibroblast cells increased, which in the cytoplasm contained more dilated channels of the granular endoplasmic reticulum (GER), indicating an increase in their collagen-synthetic function. Instead of destroyed muscle fibers, bundles of collagen fibers grew. There were more of them by the end of the experiment, the processes occurring in the muscle tissue led to fibrosis or scarring of the muscle tissue left without nutrition.

Connective tissue regenerate began to form in the border zone in the 1st experimental group a month later. Single thin nerve fibers were detected, probably growing from the branches of the trigeminal nerve, in the autograft of the masticatory muscle. Despite this, the fibers of the dissected facial nerve gradually underwent Waller's degeneration, and the fibers of the buccal muscle – to destructive processes (Figure 2). The majority of the buccal muscle fibers were destroyed and atrophied, without additional innervation and nutrition six

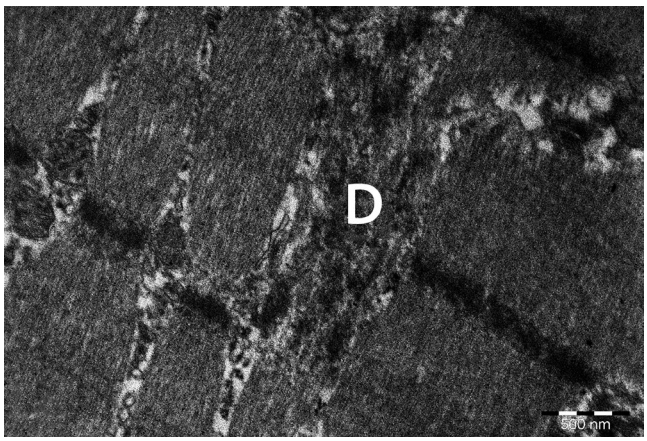


Figure 1. Ultrastructure of the denervated buccal muscle of the rabbit of the control group: destruction (D) of the muscle fiber on the 30th day after resection of the facial nerve. Magnification x20000

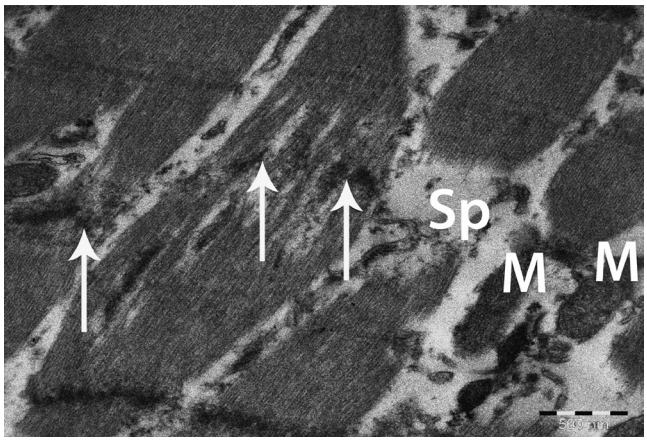


Figure 2. Ultrastructure of the denervated buccal muscle of the rabbit of the 1st experimental group after surgery without the use of allogeneic biomaterials. Destruction of buccal muscle fibers on day 60; destruction of mitochondria (M); absence of glycogen granules in the sarcoplasm (Sp), lysis of individual sarcomeres (↑). Magnification x20000

month later. In the border zone, a dense connective tissue scar was determined, and partially preserved muscle fibers near it were subjected to pronounced contraction (Figure 3).

In the 2nd experimental group, a month after the operation, the structure of the buccal muscles differed from that of the denervated muscles of the animals of the 1st experimental group in that a zone of loose connective tissue was formed in the border zone between the transected buccal muscle and the autologous flap of the supplied masticatory muscle. It contributed to the rapid germination of blood vessels and axons from the bundles of the trigeminal nerve to the denervated buccal muscle of rabbits. Two months later and in further periods of the experiment, blood capillaries and separate bundles of unmyelinated axons of neurons were detected between the regenerating muscle fibers in the connective tissue (Figure 4). In such areas on the

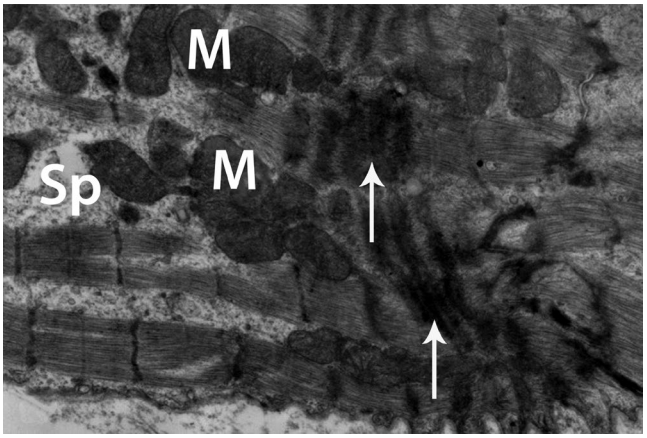


Figure 3. Ultrastructure of the denervated buccal muscle of the rabbit of the 1st experimental group after surgery without the use of allogeneic biomaterials. Contraction (↑) of the fibers of the buccal muscle near the connective tissue scar on the 180th day after the operation; Sp, sarcoplasm; M – mitochondria. Magnification x15000

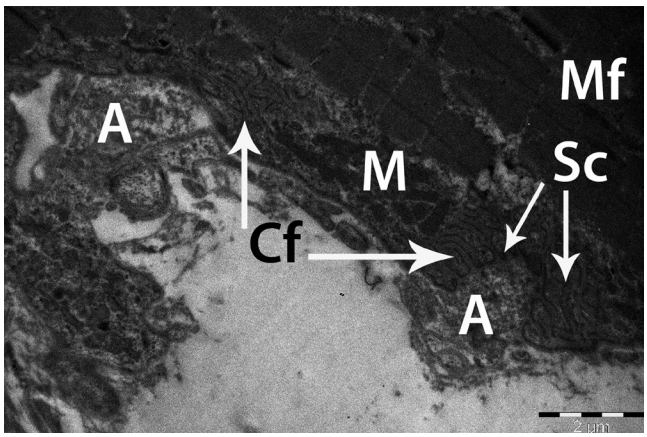


Figure 5. Neuromuscular synapses on the fiber surface of the denervated buccal muscle in a rabbit of the 2nd experimental group on day 180 after surgery using allogeneic biomaterials; Mf – striated muscle fiber; A – the end of the axon of the motor nerve; M – mitochondria: Cf (↑) – contact folds; Sc (↑) – synaptic clefts. Magnification x 8000

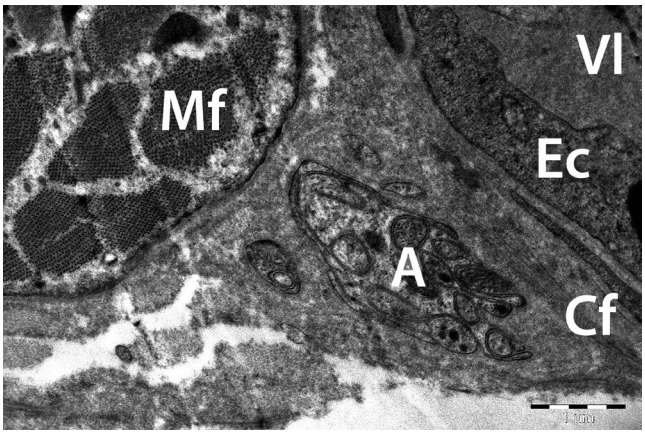


Figure 4. Surgical area in a rabbit of the 2nd experimental group using allogeneic biomaterials after 30 days. Loose connective tissue with a blood vessel and a bundle of axons along the muscle fiber. Mf – striated muscle fiber; Cf – collagen fibers; A – axons; Vl – lumen of a blood vessel; Ec – endothelial cell in the wall of a blood vessel. Magnification x 10000

surface of muscle fibers, motor end plates (neuromuscular junctions) were detected. Synapses were characterized by numerous folds and with numerous synaptic vesicles in them (Figure 5).

Around and between the synapses, clusters of optically dark oblong mitochondria were detected, since the processes occurring in the neuromuscular junctions are energy intensive. Muscle cells contained round or oval nuclei with coarse clumps of heterochromatin on the inner karyolemma. In the cytoplasm, a moderate amount of rounded mitochondria with thin cristae, short channels of the granular endoplasmic reticulum, numerous accumulations of ribosomes and polyribosomes, and star-shaped small clumps of glycogen were determined. In the muscle fibers, transverse striation was clearly visible. By day 180, the structure of the buccal muscle was identical to the normal one, and the striated striation of the tissue was clearly visible. Between the bundles of muscle fibers, the profiles of blood vessels were determined, as well as individual myelinated and unmyelinated axons lying along the muscle cells.

It is a well-known fact that after damage to the facial nerve as a result of a subsequent violation of structural and functional relationships with the buccal muscles, muscle paralysis, atrophy of muscle tissue, scarring and contracture of facial muscles most often develop, which was determined in the control group [2]. In the group where autotransplantation of a part of the masticatory muscle was performed, the processes of tissue destruction of the buccal muscle slowed down significantly. Probably, the sutured "leg" of the masticatory muscle had a certain trophic effect, but this was not enough to stimulate tissue regeneration. Destructive processes in the damaged muscle intensified, and compensatory-restorative processes also ended in fibrosis and scarring of the border zone [2]. The scar tissue prevented the germination of blood vessels and axons.

In the experimental group, where allogeneic biomaterials were used, a zone of loose connective tissue was formed between the denervated muscle and the autograft, into which blood vessels and axons from the trigeminal nerve bundles grew. Vessel profiles were determined in the interfascicular spaces, and characteristic neuromuscular synapses appeared on the regenerating muscle fibers. The results of many years of scientific research conducted at the All-Russian Center for Eye and Plastic Surgery (Ufa) showed that, when implanted into the tissues of a living organism, allogeneic biomaterials have the ability to inhibit scarring of various tissues, including muscle [13–15]. Used allogeneic biomaterials are gradually resorbed by macrophages and replaced by a newly formed fully differentiated tissue [15–20]. Non-

specific stimulation of macrophages with allogeneic biomaterial contributes to the restoration of cellular mechanisms for controlling regeneration in tissues that were disturbed during pathology, which leads to reparative processes proceeding on the basis of the laws of physiological regeneration. Therefore, the use of allogeneic biomaterials in surgical practice makes it possible to achieve full reparation and avoid scarring of tissues, including muscle tissue. Thus, the data presented by us on the reinnervation of muscle tissue are used in reconstructive operations on the auxiliary apparatus of the eye (eyelids, extraocular muscles). In particular, in the work of A. B. Nuraeva [20], using the factor of reinnervation of mimic muscles during allotransplantation, the possibility of not only anatomical, but also functional restoration of the eyelids was proved.

CONCLUSION

The use of allogeneic biomaterials in operations to restore damaged peripheral nerves accompanying muscles creates conditions not only for the restoration of muscle fibers, but also for the restoration of nerve elements with neuromuscular junctions, as well as the vascular bed of the nerve bundle.

REFERENCES

1. Zolotov A. S., Pak O. I. To the question of the history of surgical treatment of peripheral nerve injuries. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2013;69(3):162–166. (In Russ.) DOI: 10.21823/2311-2905-2013--3-162-166.
2. Margasov A. V. Actual problems of peripheral nerve injury. *RMZH*. 2018;12(1):21–24. (In Russ.)
3. Kuznetsov Yu. E., Lunegov A. M., Ponamarev V. S., Romashova E. B. Correlations between the content of total bile acids and the main biochemical parameters of blood in minks (Mustela vison Schreber, 1777). *Agricultural Biology*. 2022;57(6):1217–1224. DOI: 10.15389/agrobiology.2022.6.1217rus.
4. Ponamarev V., Yashin A., Prusakov A., Popova O. Influence of Modern Probiotics on Morphological Indicators of Pigs' Blood in Toxic Dyspepsia. Agriculture Digitalization and Organic Production. In: Proceedings of the Second International Conference, St. Petersburg, Springer. 2022. 133–142 p. DOI: 10.1007/978-981-19-7780-0_12.
5. Ozsoy U., Ogut E., Sekerci R.,Hizay A., Rink S., Angelov D. N. Effect of Pulsed and Continuous Ultrasound Therapy on the Degree of Collateral Axonal Branching at the Lesion Site, Polyinnervation of Motor End Plates, and Recovery of Motor Function after Facial Nerve Reconstruction. *The Anatomical Record*. 2019;302(8):1314–1324. DOI: 10.1002/ar.24122.
6. Buffoli B., Ferrari M., Belotti F., Lancini D., Cocchi M. A., Labanca M., Tschabitscher M., Rezzani R., Rodella L. F. The myloglossus in a human cadaver study: Common or uncommon anatomical structure? *Folia Morphologica*. 2017;76(1):74–81. DOI: 10.5603/FM.a2016.0044.
7. Musina L. A., Shangina O. R., Nigmatullin R. T., Muslimov S. A. Experimental muscle reinnervation by allogeneic biomaterial illustrates restoration of interlevel relations in human body. *Saratov Medical Journal*. 2021;2(2). DOI: 10.15275/sarmj.2021.0202.
8. 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;723:022029. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022029.
9. Stepanov I. S., Kalugniy I. I., Markova D. S., Yashin A. V., 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.
10. 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.
11. Tuturov A. O. Current trends in the restoration of extended nerve defects. Development of technologies for using the regenerative potential of nerve fibers, their essence, disadvantages and advantages. *Mezhdunarodnyj studencheskij nauchnyj vestnik*. 2017;1:10. (In Russ.)
12. Duong H.-V. Q., Westfield K. C. Alloplant implant: A novel biomaterial in the management of recalcitrant glaucoma. *The Medscape Journal of Medicine*. 2008;10(7):177.
13. Sarkisov D. S., Perov Yu. L. Microscopic technique: Guide. M.: Medicine; 1996. 544 p. (In Russ.)
14. Lebedeva A. I., Muslimov S. A., Vagapova V. Sh., Shcherbakov D. A. Morphological aspects of the regeneration of skeletal muscle tissue induced by allogeneic biomaterial. *Practical medicine*. 2019;17(1):98–102. (In Russ.) DOI: 10.32000/2072-1757-2019-1-98-102.
15. De M. Gonçalves C. S. B., Rigueiro M. P., Scarpi M. J. Morphological, comparative and qualitative tissue reaction analysis due to the implantation of alloplant™ to the eyelid and subcutaneous of rabbits. *Revista Brasileira de Oftalmologia*. 2015;74(5):279–283. DOI: 10.5935/0034-7280.20150057.
16. Muldashev E. R., Wimen T. J., Kurchatova N. N., Zimina N. P., Gur'yanov A. S., Inchenko K. S. Effect of extract from a transplant for eyelid plasty (series ALLOPLANTTM) on DNA synthesis in cultures cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1994;117(1):78–83. DOI: 10.1007/BF02444087.
17. Muslimov S. A., Musina L. A., Lebedeva A. I., Shangina O. R. Morphological bases of application of Alloplant biomaterials for tissue regeneration. *Morfologiya*. 2008;2:92–93. (In Russ.)
18. Muldashev E. R. Alloplant@ Regenerative medicine. Ufa: GUP "State Republican Publishing House "Bashkortostan"; 2014. 432 p. (In Russ.)
19. Muldashev E. R., Muslimov S. A., Nigmatullin R. T. Kiiko Y. I., Galimova V. U., Salikhov A. Y., Selsky N. E., Bulatov R. T., Musina L. A. Basic research conducted on alloplant biomaterials. *European Journal of Ophthalmology*. 1999;9(1):8–13. DOI: 10.1177/112067219900900102.
20. Nuraeva A. B. Reconstructive surgery of eyelid deformities, dislocations and colobomas using Alloplant biomaterials. [Dissertation]. Moscow; 2018. 48 p. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-174-188
УДК 615.076.9

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Фармакологическая активность облепихи крушиновидной листьев: *in silico* и *in vivo*

Н. А. Ковалёва✉, **О. В. Тринеева, А. В. Бузлама, А. Ю. Кузнецов**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Ковалёва Наталья Александровна. **E-mail:** natali-sewer@yandex.ru

ORCID: Н. А. Ковалёва – https://orcid.org/0000-0002-3507-5665; О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067; А. В. Бузлама – https://orcid.org/0000-0003-4236-2387; А. Ю. Кузнецов – https://orcid.org/0000-0002-1306-0569.

Статья поступила: 04.08.2022 **Статья принята в печать:** 13.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Облепихи крушиновидной листья являются перспективным объектом для разработки новых лекарственных растительных препаратов благодаря обширному перечню биологически активных веществ (дубильные вещества, флавоноиды, органические кислоты и др.). Однако, несмотря на активное изучение биологически активных веществ облепихи крушиновидной листьев, их применение в медицине ограничивается получением противовирусного препарата «Гипорамин», содержащего сухой очищенный экстракт из листьев данного растения.

Цель. Прогнозирование фармакологических и токсических эффектов отвара из листьев облепихи крушиновидной *in silico* и оценка его противовоспалительной активности *in vivo* в доклинических исследованиях.

Материалы и методы. С помощью интернет-ресурса PASS-online проведено прогнозирование перспективных фармакологических и возможных токсических эффектов для основных биологически активных веществ фенольного комплекса листьев облепихи крушиновидной *in silico*. В доклинических исследованиях *in vivo* (белые аутбредные конвенциональные крысы-самцы, 21 особь, 210–240 г, 3 группы по 7 особей в каждой) на модели формалинового отека лапы крыс (3,0%-й водный раствор формалина в объеме 0,1 мл субплантарно) проведена оценка противовоспалительной активности отвара листьев облепихи крушиновидной. Животным опытных групп вводили препарат сравнения – настой цветков ромашки или отвар листьев облепихи в дозе 10 мл/кг – внутрижелудочно ежедневно 7 суток.

Результаты и обсуждение. Проведенный анализ и систематизация данных о наиболее вероятных фармакологических эффектах основных биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной *in silico* с помощью платформы PASS-online позволяют считать наиболее перспективными изучение противовоспалительной, гепатопротекторной, кардиопротекторной, антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активности, что открывает перспективы для дальнейших доклинических и клинических исследований с целью расширения перечня показаний к применению извлечений из листьев облепихи крушиновидной. Проведенное прогнозирование токсических эффектов основных биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной показало, что наименьшее число вероятных токсических эффектов прогнозируется для нарциссина и кверцетина, наибольшее – для вещества стриктинин I (в т. ч. нейротоксичность, гематотоксичность, отрицательное влияние на сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечная токсичность, репродуктивная токсичность и канцерогенность), что требует подтверждения в доклинических токсикологических исследованиях. В доклинических исследованиях *in vivo* на модели отека лапы крыс доказано, что отвар листьев облепихи крушиновидной при краткосрочном пероральном курсовом применении в течение 7 суток в дозе 10 мл/кг (235 мг/кг из расчета по сухому остатку) проявляет достаточный противовоспалительный эффект, обеспечивая значительное, достоверное снижение выраженности отека лапы крыс максимально через 3 ч после введения флогогена на 36,0 % по сравнению с контролем, что превышает эффективность препарата сравнения (настой цветков ромашки).

Заключение. Установлены основные виды фармакологической активности (противовоспалительная, гепатопротекторная, кардиопротекторная, антибактериальная, противогрибковая и противовирусная) и токсических эффектов (нейротоксичность, гематотоксичность, отрицательное влияние на сердечно-сосудистую активность и желудочно-кишечный тракт). Достоверно выявлена выраженная противовоспалительная активность.

Ключевые слова: листья, облепиха крушиновидная, *Hippophaë rhamnoides* L., противовоспалительная активность, формалиновый отек лапы крыс, PASS-online, доклинические исследования

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

Вклад авторов. Н. А. Ковалёва проводила изучение видов фармакологической активности и токсических эффектов, а также совместно с А. Ю. Кузнецовым и А. В. Бузламой проводили оценку противовоспалительной активности на модели формалинового отека лапы крыс. А. В. Бузлама осуществляла консультирование по проведению исследований *in vivo*. О. В. Тринеева выполнила обработку первичных экспериментальных данных и написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке фармацевтической компании по производству лекарственных растительных препаратов «Бионорика СЕ» (Германия).

© Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Бузлама А. В., Кузнецов А. Ю., 2023
© Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Buzlama A. V., Kuznetsov A. Yu., 2023

Соответствие принципам этики. Исследование проведено с соблюдением принципов гуманности в соответствии с директивами Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации. Протокол Этического комитета по экспертизе биомедицинских исследований ФГБОУ ВО «ВГУ» № 42-01 от 24.01.2022 г.

Для цитирования: Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Бузлама А. В., Кузнецов А. Ю. Фармакологическая активность облепихи крушиновидной листьев: *in silico* и *in vivo*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):174–188. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-174-188

Pharmacological Activity of Sea Buckthorn Leaves: *In silico* and *In vivo*

Natalya A. Kovaleva✉, Olga V. Trineeva, Anna V. Buzlama, Alexandr Yu. Kuznetsov

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

✉ **Corresponding author:** Natalya A. Kovaleva. **E-mail:** natali-sewer@yandex.ru

ORCID: Natalya A. Kovaleva – https://orcid.org/0000-0002-3507-5665; Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067; Anna V. Buzlama – https://orcid.org/0000-0003-4236-2387; Alexandr Yu. Kuznetsov – https://orcid.org/0000-0002-1306-0569.

Received: 04.08.2022 **Revised:** 13.07.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Sea buckthorn leaves are a promising object for the development of new medicinal herbal preparations due to an extensive list of biologically active substances (tannins, flavonoids, organic acids, etc.). However, despite the active study of biologically active substances of buckthorn buckthorn leaves, their use in medicine is limited to obtaining an antiviral drug "Hyporamine" containing a dry purified extract from the leaves of this plant.

Aim. The aim of the work is to predict the pharmacological and toxic effects of decoction from buckthorn leaves *in silico* and to evaluate its anti-inflammatory activity in vivo in preclinical studies.

Materials and methods. With the help of the PASS-online Internet resource, the prediction of promising pharmacological and possible toxic effects for the main biologically active substances of the phenolic complex of sea buckthorn leaves *in silico* was carried out. In preclinical studies *in vivo* (white outbred conventional male rats, 21 individuals, 210–240 g, 3 groups of 7 individuals each) on a model of formalin paw edema of rats (3.0 % aqueous formalin solution, 0.1 ml subplantarly), the anti-inflammatory activity of decoction of sea buckthorn leaves was evaluated. Animals of the experimental groups were administered: a comparison drug – an infusion of chamomile flowers or a decoction of sea buckthorn leaves at a dose of 10 ml/kg intragastrically daily for 7 days.

Results and discussion. The analysis and systematization of data on the most likely pharmacological effects of the main biologically active substances of sea buckthorn leaves *in silico* using the PASS-online platform allow us to consider the most promising study of anti-inflammatory, hepatoprotective, cardioprotective, antibacterial, antifungal and antiviral activity, which opens up prospects for further preclinical and clinical studies in order to expand the list of indications for the use of extracts from the leaves of sea buckthorn. The prediction of the toxic effects of the main biologically active substances of sea buckthorn leaves showed that the smallest number of probable toxic effects is predicted for narcissin and quercetin, the largest for the substance strictinin I (including neurotoxicity, hematotoxicity, negative effects on the cardiovascular system, gastrointestinal toxicity, reproductive toxicity and carcinogenicity), which requires confirmations in preclinical toxicological studies. In preclinical studies *in vivo* on a model of rat paw edema, it was proved that a decoction of sea buckthorn leaves with a short-term oral course application of 7 days at a dose of 10 ml/kg (235 mg/kg based on the dry residue), it shows a sufficient anti-inflammatory effect, providing a significant, reliable decrease in the severity of rat paw edema, maximum 3 hours after phlogogen administration by 36.0 % compared with the control, which exceeds the effectiveness of the comparison drug (infusion of chamomile flowers).

Conclusion. The main types of pharmacological activity (anti-inflammatory, hepatoprotective, cardioprotective, antibacterial, antifungal and antiviral) and toxic effects (neurotoxicity, hematotoxicity, negative effect on cardiovascular activity and gastrointestinal tract) have been established. Pronounced anti-inflammatory activity was reliably detected.

Keywords: leaves, sea buckthorn, *Hippophaë rhamnoides* L., anti-inflammatory activity, formalin edema of rat paws, PASS-online, preclinical studies

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. Natalya A. Kovaleva conducted a study of the types of pharmacological activity and toxic effects, and together with Alexandr Yu. Kuznetsov and Anna V. Buzlama evaluated anti-inflammatory activity on a model of formalin edema of the paw of rats. Anna V. Buzlama provided consulting on in vivo research. Olga V. Trineeva processed the primary experimental data and wrote the text of the article.

Funding. The work was supported financially by "Bionorica SE" (Germany), a pharmaceutical company producing herbal medicines.

Compliance with the principles of ethics. The study was conducted in compliance with the principles of humanity in accordance with the directives of the European Community (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki. Protocol of the Ethical Committee for the Expertise of Biomedical Research of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "VSU" No. 42-01 dated January 24, 2022.

For citation: Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Buzlama A. V., Kuznetsov A. Yu. Pharmacological activity of sea buckthorn leaves: *in silico* and *in vivo*. *Drug development & registration*. 2023;12(3):174–188. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-174-188

ВВЕДЕНИЕ

Облепиха крушиновидная (*Hippophaë rhamnoides* L.) – лекарственное растение, плоды которого широко применяются в медицине [1]. Листья облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) – ценный источник дубильных веществ, витаминов (группы В, аскорбиновой кислоты и каротиноидов), флавоноидов и терпеноидных соединений [2, 3]. На сегодняшний день зарегистрирован и применяется только один лекарственный растительный препарат (ЛРП) на основе листьев – «Гипорамин»[1] (сухой очищенный экстракт из листьев облепихи крушиновидной). Данный препарат, согласно инструкции по медицинскому применению, оказывает противовирусное действие за счет содержащегося в нем комплекса дубильных веществ. Комплекс содержит галлоэллаготаннины, представляющие собой гидролизуемые таннины, имеющие общие структурные элементы в виде глюкозогаллоильного и гексагидроксифеноильного остатков. Согласно ряду исследований, извлечения из листьев облепихи крушиновидной обладают также выраженной антиоксидантной активностью [4, 5].

В соответствии с данными литературы по составу метаболома листьев облепихи крушиновидной (таблица 1) можно предположить наличие у извлечений из данного сырья и других видов фармакологической активности. В настоящее время листья являются лишь побочным продуктом при заготовке фармакопейного сырья – плодов облепихи, что следует расценивать как нерациональное использование ограниченных растительных ресурсов – ценных источников различных групп БАВ. Так, например, содержание дубильных веществ в листьях сумаха и скумпии – известных источников таннинов – составляет до 20–40 и 25–33 % соответственно. При этом листья облепихи, по литературным данным (таблица 1), могут содержать сопоставимые количества данных БАВ – до 36 %. В связи с достаточно высоким содержанием дубильных веществ и флавоноидов, предположительно, листья облепихи крушиновидной могут проявлять противовоспалительную активность и другие фармакологические эффекты.

Важным преимуществом является то, что возможен массовый сбор листьев от культивируемых растений на плантациях, что обеспечит фармацевтическую промышленность ценным сырьем. Следовательно, актуальны исследования по выявлению перспективных видов фармакологической активности комплекса БАВ листьев облепихи крушиновидной для разработки эффективных и безопасных отечественных ЛРП на основе доступного, ежегодно возобновляемого сырья, что особенно важно в рамках концепции импортозамещения.

[1] Справочник лекарственных средств VIDAL. Доступно по: https://www.vidal.ru/ Ссылка активна на 07.02.2022.

Таблица 1. Сводные данные о составе метаболома листьев облепихи крушиновидной [2–12]

Table 1. Summary data on the composition of the metabolome of sea buckthorn leaves [2–12]

№	Биологически активные вещества Biologically active substances	Диапазон содержания Content range	Источник Source
1	Хлорофиллы Chlorophylls	160–760 мг% 160–760 mg%	[2]
2	Каротиноиды Carotenoids	35–150 мг% 35–150 mg%	[2, 12]
3	Токоферолы (масло из листьев) Tocopherols (leaf oil)	90–1137 мг% 90–1137 mg%	[2]
4	Дубильные вещества Tannins	9–36 % 9–36 mg%	[6–8, 11]
5	Флавоноиды Flavonoids	0,255–2,50 % 0.255–2.5 %	[10, 11]
6	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	97–221,7 мг% 97–221.7 mg%	[10, 11]
7	Полифенолы Polyphenols	0,858 %	[10]
8	Токоферолы Tocopherols	3,90–4,10 мг% 3.90–4.1 mg%	[10]
9	Тиамин Thiamine	0,034–0,14 мг% 0.034–0.14 mg%	[10]
10	Рибофлавин Riboflavin	0,029–0,586 мг% 0.029–0.586 mg%	[10]
11	Ниацин Niacin	0,486 мг% 0.486 mg%	[10]
12	Моно- и дисахара Mono- and disahara	9,5 %	[11]
13	Углеводы Carbohydrates	2,81 %	[7, 8]
14	Витамин А Vitamin A	0,155 мг% 0.155 mg%	[7, 8]
15	Антоцианы Anthocyanins	0,055 %	[3]

Цель исследования – прогнозирование фармакологических и токсических эффектов водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной *in silico* и оценка его противовоспалительной активности *in vivo* в доклинических исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись листья облепихи крушиновидной, высушенные, собранные в период массового созревания плодов (конец августа 2021 г.) на территории Воронежской области (Острогожский район) в соответствии с правилами заготовки различных морфологических групп лекарственного растительного сырья (ЛРС). Так как листья облепихи крушиновидной имеют плотную, кожистую структуру, из них готовили отвар (1:10) согласно ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» Государствен-

ной фармакопеи (ГФ) РФ XIV издания [13]. Так как на данный объект отсутствует фармакопейная статья (ФС), значение коэффициента водопоглощения ранее было неизвестно. Поэтому предварительно экспериментально установили его значение (равен 3,0) в соответствии с ОФС.1.5.3.0012.15 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента ЛРС» ГФ РФ XIV издания [13]. В качестве препарата сравнения использовали цветки ромашки аптечной (клинико-фармакологическая группа: фитопрепарат с противовоспалительным, противомикробным и спазмолитическим действием). Использовали настой (1:10) цветков ромашки аптечной, который готовили в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» ГФ РФ XIV издания [13]. Выбор препарата сравнения обусловлен рекомендациями литературы, свидетельствующими о рациональности сопоставления эффекта ЛРП с аналогичными [14–20], так как синтетические лекарственные вещества группы НПВС заведомо обладают более выраженной противовоспалительной активностью.

На первом этапе исследования с помощью интернет-ресурса PASS-online проведено прогнозирование перспективных фармакологических и возможных токсических эффектов для основных БАВ фенольного комплекса листьев облепихи крушиновидной *in silico* [21–27]. Статистическая обработка результатов проведена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003. Значимыми считали результаты прогноза при величинах 0,700 и выше.

На втором этапе исследования в качестве одного из наиболее вероятных и перспективных фармакологических эффектов для изучения в доклинических исследованиях выбрано противовоспалительное действие отвара листьев облепихи крушиновидной. Оценку противовоспалительной активности в доклинических исследованиях проводили на модели формалинового отёка лапы крыс в соответствии с известной методикой [28, 29]. Соблюдали общепринятые нормы по гуманному обращению с животными, используемыми для экспериментальных целей, протокол Этического комитета по экспертизе биомедицинских исследований ФГБОУ ВО «ВГУ» № 42-01 от 24.01.2022 г. Исследования проведены на 21 особи белых аутбредных конвенциональных крыс-самцов массой тела 210–240 г, полученных из питомника Филиал «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». При выполнении работы животные содержались в виварии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «ВГУ» в соответствии с общепринятыми санитарными правилами и нормами. Животные были разделены на 3 группы по 7 особей в каждой: 1 – контрольная (моделировали отек лапы крыс, вводили воду очищенную в эквивалентном препаратам объеме внутрижелудочно 7 суток 1 раз в сутки), 2 – опытная группа препарата сравнения (настой цветков ромашки), 3 – опытная группа изучаемого препарата (отвар листьев облепихи). В качестве флогогена использовали 3,0%-й водный раствор формалина, который вводили каждому животному в объеме 0,1 мл субплантарно. Животным опытных групп ежедневно в течение 7 суток 1 раз в сутки утром натощак внутрижелудочно вводили изучаемые экспериментальные препараты: препарат сравнения – настой цветков ромашки или отвар листьев облепихи в дозе 1 мл на 100 г массы тела животного (10 мл/кг), что, исходя из расчета по сухому остатку (23,5 мг/мл), составило 235 мг/кг. Выбор дозы осуществляли на основании известных данных литературы по диапазону доз, в которых проявляется противовоспалительная активность других сходных извлечений из ЛРС [14–20]. Длительность эксперимента – 7 суток. На 7-е сутки эксперимента через 1 час после последнего введения исследуемых препаратов вводили флогоген (раствор формалина). Проводили измерение объема конечности в каждой из групп онкометрическим методом до введения флогогена (исходно, V_0, см^3) и затем через 1 и 3 ч после введения флогогена (V_1 – через 1 ч и V_3 – через 3 ч, см^3). Затем определяли выраженность отека лапы, которую рассчитывали в процентах как изменение объема лапы через 1 и 3 часа по сравнению со средним исходным значением (объем лапы, исходно V_0, см^3) по формуле (1):

$$O = \frac{V_n \cdot 100\,\%}{V_0}, \qquad (1)$$

где O – отек лапы в контрольной или опытных группах, %; V – объем конечности через n часов (V_1 – через 1 ч или V_3 – через 3 ч, см^3); V_0 – исходный объем конечности, см^3.

Противовоспалительную эффективность изучаемых извлечений из ЛРС оценивали по способности предотвращать развитие отека конечности, выражали в процентах и рассчитывали как разницу между исходными и последующими показателями опытной группы по сравнению с контрольной группой по формуле (2) [15]:

$$E = \frac{V_{к_n} \cdot 100\,\%}{V_0} - \frac{V_{O_n} \cdot 100\,\%}{V_0}, \qquad (2)$$

где E – эффективность изучаемого извлечения из ЛРС, %; $V_{к_n}$ – последующий объем конечности в контрольной группе через n часов (V_1 – через 1 ч или V_3 – через 3 ч, см^3); V_0 – исходный объем конечности, см^3; V_{o_n} – последующий объем конечности в опытной группе через n часов (V_1 – через 1 ч или V_3 – через 3 ч, см^3).

Проводили также измерение ректальной температуры тела (T, °С) животных при помощи электронного термометра: исходно, через 1 и 3 часа после введения флогогена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прогноз фармакологических и токсических эффектов БАВ листьев облепихи крушиновидной in silico

На первом этапе работы с помощью интернет-ресурса PASS-online проведен прогноз возможных фармакологических и токсических эффектов основных БАВ полифенольного комплекса листьев облепихи крушиновидной, перечень которых составлен на основании известных опубликованных данных профессора И. А. Самылиной с соавторами [20]: кверцетина, нарциссина, рутина, 7-рамнозидо-3-глюкозида изорамнетина, стриктинина I, изостриктинина, казуариктина, казуаринина. Полученные результаты прогноза для всех перечисленных БАВ представлены в таблице 2.

В таблицах 2 и 3 указаны вероятности проявления в эксперименте фармакологических либо токсических эффектов (Pa) или отсутствие активности (Pi), значимыми считали величины Pa > 0,7.

Прогнозируется, что 3 вещества из выбранного перечня (37,5 % веществ), такие как кверцетин, рутин и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина с максимальной долей вероятности (Pa > 0,9) являются ингибиторами проницаемости мембраны и при этом агонистами целостности мембраны. Следует предположить, что мембранопротекторный эффект может являться одним из основных механизмов реализации многих фармакологических эффектов, особенно таких, как прогнозируемые с высокой вероятностью и описанные далее гепатопротекторный, кардиопротекторный и вазопротекторный эффекты.

Установлено, что подавляющее большинство выбранных БАВ (75 % веществ) из листьев облепихи крушиновидной, в т. ч. такие, как кверцетин, рутин, стриктинин I и изостриктинин, казуариктин и казуаринин, с высокой долей вероятности (Pa > 0,7) проявляют противовоспалительную активность, которая может быть патогенетически взаимосвязана с антиоксидантным действием, вероятным для тех же веществ (75 % веществ из перечня) и хорошо известным по литературным данным. Вяжущий эффект, прогнозируемый для 1 вещества (кверцетин), может также вносить определенный вклад в обеспечение противовоспалительного действия при местном контакте с кожными покровами и слизистыми оболочками. В связи с вышеизложенным именно противовоспалительная активность была выбрана для проведения дальнейших доклинических исследований *in vivo*, выполненных на следующем этапе.

Большинство БАВ (87,5 %) из листьев облепихи крушиновидной с достаточно высокой вероятностью (Pa > 0,7) проявляют гепатопротекторную активность, механизмами которой, как известно, могут являться прогнозируемые с высокой вероятностью упомянутые выше антиоксидантные, противовоспалительные и мембранопротекторные механизмы. Определенную терапевтическую ценность при заболеваниях печени, желчного пузыря и желчевыводящих путей может иметь также слабительный эффект, прогнозируемый для 2 веществ (25 % веществ из перечня) – рутина и 7-рамнозидо-3-глюкозида изорамнетина. Следовательно, перспективно изучение возможности применения извлечений из листьев облепихи крушиновидной в составе комплексной терапии заболеваний печени и желчевыводящих путей.

Кардиопротекторная активность высоковероятна (Pa > 0,8) для 62,5 % БАВ, в т. ч. для кверцетина, рутина и 7-рамнозидо-3-глюкозида изорамнетина. Важно, что при этом вероятны также связанные фармакологические эффекты, такие как вазопротекторный (для 37,5 % БАВ), сосудорасширяющий, прогнозируемый для 1 вещества – рутина (12,5 %), а также антигиперхолестеринемический эффект, прогнозируемый с максимальной вероятностью для рутина (Pa = 0,900), что позволяет рассматривать извлечения из листьев облепихи крушиновидной в качестве перспективного компонента в составе комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Однако при этом возможно влияние на систему гемостаза, а именно для 37,5 % БАВ, таких как кверцетин, рутин и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, прогнозируется кровоостанавливающей эффект, что требует обязательного подтверждения данными клинико-лабораторных исследований и наряду с потенциальной терапевтической ценностью может, напротив, являться нежелательным при применении в составе терапии сердечно-сосудистых заболеваний из-за риска тромбообразования.

Противоинфекционный эффект (без уточнения перечня возбудителей) прогнозируется для четверти веществ из перечня выбранных БАВ (25 %), таких как рутин и 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, для этих же веществ прогнозируется противогрибковый (Pa > 0,7), антипротозойный (Pa > 0,9) и противовирусный (грипп) (Pa > 0,7) эффекты, кроме того, антибактериальный эффект прогнозируется для 1 вещества (12,5 %) – рутина. Высокая вероятность прогноза противоинфекционной, и в частности противовирусной активности, согласуется с известными литературным данными, согласно которым экстракт из листьев облепихи, а именно полифенольный комплекс в составе лекарственного препарата «Гипорамин», оказывает противовирусное действие, что используется в клинической практике для лечения и профилактики ОРВИ и гриппа [3]. Отдельно для 62,5 % веществ прогнозируется применение с целями химиопрофилактики, следовательно, можно предположить перспективность применения БАВ из листьев облепихи крушиновидной для системного и местного применения при лечении и профилактике инфекционных заболеваний различной этиологии.

Таблица 2. **Прогнозирование фармакологических эффектов основных биологически активных веществ листьев облепихи крушиновидной in silico**

Table 2. **Prediction of pharmacological effects of the main biologically active substances of sea buckthorn leaves in silico**

Фармакологическая активность Pharmacological activity	**Кверцетин** Quercetin		**Нарциссин** Narcissine		**Рутин** Routine		**7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина** 7-rhamnoside-3-glucoside of isoramnetin		**Стриктинин I** Strictinin I		**Изостриктинин** Isostrictinin		**Казуариктин** Casuarictin		**Казуаринин** Casuarinin	
	Pa	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**
Ингибитор проницаемости мембраны Membrane Permeability Inhibitor	0,938	0,003	–	–	0,990	0,000	0,961	0,002	0,647	0,063	0,636	0,068	–	–	–	–
Агонист целостности мембраны Membrane Integrity Agonist	0,973	0,002	–	–	–	–	0,936	0,004	–	–	–	–	–	–	–	–
Противовоспалительный Anti-inflammatory	0,689	0,017	–	–	0,728	0,013	–	–	0,809	0,006	0,765	0,009	0,865	0,005	0,699	0,016
Вяжущий Astringent	0,729	0,002	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Антиоксидант Antioxidant	0,872	0,003	–	–	0,923	0,003	–	–	0,840	0,003	0,844	0,003	0,932	0,003	0,658	0,004
Гепатопротектор Hepatoprotector	0,706	0,007	–	–	0,968	0,001	0,833	0,004	0,919	0,002	0,890	0,003	0,864	0,003	0,749	0,005
Лечение заболеваний печени Treatment of liver diseases	–	–	–	–	0,704	0,005	–	–	0,633	0,005	0,596	0,007	0,621	0,005	–	–
Слабительное Laxative	–	–	–	–	0,776	0,002	0,892	0,001	–	–	–	–	–	–	–	–
Кровоостанавливающий Hemostatic	0,771	0,003	–	–	0,993	0,001	0,840	0,002	–	–	–	–	–	–	–	–
Кардиопротектор Cardioprotector	0,833	0,003	–	–	0,988	0,001	0,830	0,003	–	–	–	–	–	–	–	–
Сосудорасширяющий Vasodilator	–	–	–	–	0,740	0,006	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Вазопротектор Vasoprotector	0,824	0,004	–	–	0,980	0,001	0,953	0,002	–	–	–	–	–	–	–	–
Лечение ломкости капилляров Treatment of capillary fragility	0,737	0,001	–	–	0,939	0,000	0,752	0,001	–	–	–	–	–	–	–	–
Антигиперхолестеринемический Antihypercholysterinemic	–	–	–	–	0,900	0,003	0,644	0,011	–	–	–	–	–	–	–	–
Противоинфекционный Anti-infective	–	–	–	–	0,657	0,009	0,811	0,005	–	–	–	–	–	–	–	–

Фармакологическая активность Pharmacological activity	**Кверцетин** Quercetin		**Нарциссин** Narcissine		**Рутин** Routine		**7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина** 7-rhamnoside-3-glucoside of isoramnetin		**Стриктинин I** Strictinin I		**Изостриктинин** Isostrictinin		**Казуариктин** Casuarictin		**Казуаринин** Casuarinin	
	Pa	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**
Антибактериальный Antibacterial	–	–	–	–	0,677	0,005	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Противогрибковый Antifungal	–	–	–	–	0,784	0,006	0,700	0,010	–	–	0,714	0,009	–	–	–	–
Антипротозойный Antiprotozoal	–	–	–	–	0,907	0,003	0,914	0,003	–	–	–	–	–	–	–	–
Противовирусный (грипп) Antiviral (influenza)	–	–	–	–	0,743	0,004	0,679	0,007	–	–	–	–	–	–	–	–
Химиопрофилактика Chemoprophylaxis	0,717	0,006	–	–	–	–	–	–	0,867	0,003	0,807	0,004	0,835	0,003	0,675	0,007
Противоопухолевый Antitumor	0,797	0,012	–	–	0,849	0,007	0,814	0,010	0,888	0,005	0,861	0,006	0,902	0,005	0,911	0,005
Противоопухолевый (рак легких) Antitumor (lung cancer)	–	–	0,699	0,006	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Антиканцерогенный Anticarcinogenic	0,757	0,007	–	–	0,983	0,001	0,893	0,003	0,831	0,004	0,721	0,008	–	–	–	–
Цитостатический Cytostatic	–	–	–	–	–	–	0,852	0,005	0,900	0,004	0,748	0,008	0,789	0,007	0,795	0,007
Антимутагенный Antimutagenic	0,940	0,001	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Иммунодепрессант Immunosuppressant	–	–	–	–	–	–	0,653	0,023	0,736	0,013	0,768	0,009	0,745	0,012	–	–
Лечение пролиферативных заболеваний Treatment of proliferative diseases	0,614	0,010	–	–	0,952	0,001	0,780	0,004	–	–	–	–	–	–	–	–
Радиопротектор Radioprotector	–	–	–	–	0,725	0,009	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Таблица 3. **Прогнозирование токсических эффектов основных БАВ листьев облепихи крушиновидной in silico**

Table 3. **Prediction of toxic effects of the main BAS of sea buckthorn leaves in silico**

Токсические эффекты Toxic effects	**Кверцетин** Quercetin		**Нарциссин** Narcissine		**Рутин** Routine		**7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина** 7-rhamnoside-3-glucoside of isoramnetin		**Стриктинин I** Strictinin I		**Изостриктинин** Isostrictinin		**Казуариктин** Casuarictin		**Казуаринин** Casuarinin	
	Pa	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**
Токсичный Toxic	–	–	–	–	0,851	0,019	–	–	0,906	0,011	0,897	0,012	0,865	0,017	0,872	0,015
Нейротоксический Neurotoxic	–	–	–	–	0,882	0,007	0,789	0,018	0,898	0,005	0,770	0,021	0,843	0,013	0,822	0,015
Боль Pain	–	–	–	–	–	–	–	–	0,745	0,031	–	–	–	–	–	–
Нарушение сна Sleep disturbance	–	–	–	–	0,859	0,016	0,702	0,040	0,699	0,041	0,676	0,046	–	–	–	–
Сонливость Drowsiness	–	–	–	–	0,887	0,010	–	–	0,760	0,027	–	–	–	–	–	–
Поведенческое расстройство Behavioral disorder	–	–	–	–	0,857	0,017	0,859	0,016	0,863	0,016	–	–	–	–	0,709	0,038
Атаксия Ataxia	–	–	–	–	–	–	–	–	0,717	0,020	–	–	–	–	–	–
Дискинезия Dyskinesia	–	–	–	–	–	–	–	–	0,709	0,024	–	–	–	–	–	–
Мышечная слабость Muscle weakness	–	–	–	–	–	–	0,697	0,022	0,785	0,015	0,716	0,020	–	–	–	–
Офтальмотоксичность Ophthalmotoxicity	–	–	–	–	–	–	–	–	0,810	0,019	–	–	0,669	0,041	0,737	0,032
Конъюнктивит Conjunctivitis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,773	0,025
Гематотоксический Hematotoxic	0,672	0,047	–	–	0,825	0,022	0,866	0,016	0,903	0,011	0,750	0,035	0,786	0,028	0,778	0,030
Анемия Anemia	–	–	–	–	–	–	–	–	0,859	0,009	–	–	–	–	–	–
Тромбоцитопения Thrombocytopenia	–	–	–	–	–	–	0,770	0,022	0,709	0,031	–	–	–	–	–	–

Токсические эффекты Toxic effects	**Кверцетин** Quercetin		**Нарциссин** Narcissine		**Рутин** Routine		**7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина** 7-rhamnoside-3-glucoside of isoramnetin		**Стриктинин I** Strictinin I		**Изостриктинин** Isostrictinin		**Казуариктин** Casuarictin		**Казуаринин** Casuarinin	
	Pa	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**
Токсический, сосудистый Toxic, vascular	0,797	0,018	–	–	0,817	0,014	0,809	0,015	0,784	0,021	–	–	–	–	–	–
Гипертонический Hypertensive	–	–	–	–	–	–	–	–	0,757	0,020	–	–	–	–	–	–
Гиперхолестеринемический Hypercholesterolemic	–	–	–	–	–	–	0,829	0,003	–	–	–	–	–	–	–	–
Гипотензия Hypotension	–	–	0,956	0,004	–	–	–	–	0,781	0,017	–	–	–	–	–	–
Одышка Shortness of breath	–	–	–	–	–	–	–	–	0,914	0,005	–	–	–	–	–	–
Бронхоконстриктор Bronchoconstrictor	–	–	–	–	–	–	–	–	0,873	0,006	0,713	0,015	0,778	0,009	0,762	0,010
Желудочно-кишечная токсичность Gastrointestinal toxicity	–	–	–	–	0,726	0,040	0,734	0,038	0,911	0,009	0,799	0,025	0,804	0,025	0,717	0,042
Гепатотоксический Hepatotoxic	–	–	–	–	–	–	–	–	0,880	0,011	0,822	0,018	0,775	0,024	0,790	0,022
Диарея Diarrhea	–	–	–	–	0,850	0,017	0,887	0,012	0,965	0,004	0,915	0,009	0,877	0,014	0,741	0,033
Потеря веса Weight Loss	–	–	–	–	0,702	0,022	0,702	0,022	–	–	0,708	0,021	–	–	–	–
Рвотный Emetic	–	–	–	–	–	–	0,705	0,039	0,816	0,020	–	–	–	–	–	–
Тошнота Nausea	–	–	–	–	0,669	0,047	0,700	0,041	0,809	0,022	–	–	–	–	–	–
Стоматит Stomatitis	–	–	–	–	–	–	–	–	0,761	0,022	–	–	0,697	0,029	–	–
Нефротоксический Nephrotoxic	–	–	–	–	0,761	0,019	0,776	0,016	–	–	0,728	0,024	–	–	–	–
Дерматит Dermatitis	–	–	–	–	–	–	–	–	0,819	0,020	–	–	–	–	–	–

Токсические эффекты Toxic effects	**Кверцетин** Quercetin		**Нарциссин** Narcissine		**Рутин** Routine		**7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина** 7-rhamnoside-3-glucoside of isoramnetin		**Стриктинин I** Strictinin I		**Изостриктинин** Isostrictinin		**Казуариктин** Casuarictin		**Казуаринин** Casuarinin	
	Pa	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**	**Pa**	**Pi**
Некроз Necrosis	–	–	–	–	–	–	–	–	0,789	0,018	–	–	–	–	–	–
Воспаление Inflammation	–	–	–	–	0,952	0,004	0,892	0,008	0,877	0,008	0,694	0,025	–	–	–	–
Ацидоз Acidosis	–	–	–	–	–	–	–	–	0,819	0,016	–	–	0,730	0,026	–	–
Гипотермический Hypothermic	–	–	–	–	–	–	0,740	0,011	–	–	–	–	–	–	–	–
Эндокринный деструктор Endocrine Disruptor	0,706	0,014	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Репродуктивная дисфункция Reproductive dysfunction	0,719	0,032	–	–	0,691	0,038	0,735	0,029	0,857	0,012	–	–	0,804	0,018	–	–
Эмбриотоксический Embryotoxic	–	–	–	–	0,831	0,010	0,726	0,020	0,815	0,011	0,786	0,014	–	–	–	–
Тератоген Teratogen	–	–	–	–	0,832	0,010	0,754	0,017	–	–	0,693	0,023	–	–	–	–
Генотоксичность Genotoxicity	–	–	–	–	–	–	–	–	0,889	0,003	–	–	–	–	–	–
Канцерогенный Carcinogenic	–	–	–	–	–	–	–	–	0,907	0,004	–	–	–	–	–	–

Определенный интерес вызывает тот факт, что все перечисленные БАВ (100 %) с высокой вероятностью (Pa > 0,7–0,9) проявляют противоопухолевую активность и смежные, синонимичные виды активности, такие как антиканцерогенная, прогнозируемая для 50 % веществ, и цитостатическая активность – для 62,5 % веществ. Отдельный вклад в механизмы данных видов активности может вносить иммунодепрессивный эффект, прогнозируемый для 50% веществ, и, возможно, антимутагенное действие, прогнозируемое с высокой вероятностью (Pa > 0,9) для 1 вещества (12,5 %) – кверцетина. Потенциально полезным при сочетанной химиотерапии и лучевой терапии может представляться и радиопротекторное действие, прогнозируемое для 1 вещества (12,5 %) из перечня – рутина. Однако важно подчеркнуть, что, несмотря на высокую вероятность прогноза, применение извлечений из данного ЛРС в фармакотерапии онкологических заболеваний требует особенно тщательного подтверждения и обоснования.

Проведено прогнозирование токсических эффектов выбранного перечня БАВ, содержащихся в листьях облепихи крушиновидной, результаты представлены в таблице (см. таблицу 3). Токсичность без уточнения органотропности прогнозируется для 62,5 % веществ из выбранного перечня БАВ листьев облепихи крушиновидной, в т. ч. рутина, стриктинина I и изостриктинина, казуариктина и казуаринина. Наименьшее число вероятных токсических эффектов прогнозируется для таких веществ, как нарциссин (1 наименование из перечня токсических эффектов – гипотензия) и кверцетин (4 наименования, в т. ч. гематотоксичность, сосудистая токсичность, отрицательное влияние на эндокринную систему и репродуктивная дисфункция). Наибольшее число вероятных токсических эффектов прогнозируется для вещества стриктинин I (32 наименования, в т. ч. нейротоксичность, гематотоксичность, отрицательное влияние на сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечная токсичность, репродуктивная токсичность и канцерогенность).

Нейротоксические эффекты прогнозируются для 75 % БАВ, таких как рутин, 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, стриктинин I и изостриктинин, казуариктин и казуаринин. Следует отметить, что наибольший перечень нейротоксических эффектов прогнозируется за счет вещества стриктинин I – 7 наименований, в т. ч. такие, как боль, нарушение сна, сонливость, поведенческие расстройства, атаксия, дискинезия, мышечная слабость, – все с достаточной вероятностью (Pa > 0,7). Для 37,5 % БАВ прогнозируется офтальмотоксичность, для 1 вещества (казуаринин) – конъюнктивит.

Для 87,5 % веществ прогнозируется гематотоксический эффект, анемия (для вещества стриктинин I), тромбоцитопения (для 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина и стриктинина I).

Отрицательное влияние на функции сердечно-сосудистой системы вероятно не менее чем для половины БАВ (50 %) из выбранного перечня. Гиперхолестеринемический эффект прогнозируется для 7-рамнозидо-3-глюкозида изорамнетина. Интересно, что гипертонический эффект наряду с гипотензией прогнозируется для стриктинина I, что может свидетельствовать скорее о его регулирующем влиянии на сосудистый тонус.

Бронхоконстрикторным действием, вероятно, обладает половина БАВ (50 %) из выбранного перечня, а именно: стриктинин I, изостриктинин, казуариктин, казуаринин. Вероятность одышки прогнозируется для стриктинина I.

Желудочно-кишечная токсичность вероятна для 75 % БАВ из выбранного перечня, ни одно из ее проявлений не прогнозируется только для кверцетина и нарциссина. Для всех остальных веществ вероятны гепатотоксический эффект, диарея, потеря веса, рвотный эффект, тошнота, стоматит. Следует отметить, что диарея, рвотный эффект и тошнота могут быть связаны с прокинетическим действием и, помимо отрицательного значения, вероятно, могут вносить свой вклад в реализацию терапевтически потенциально полезного слабительного эффекта, прогнозируемого для рутина и 7-рамнозидо-3-глюкозида изорамнетина (см. таблицу 2). Наибольший перечень проявлений гастроинтестинальной токсичности (6 наименований) прогнозируется для вещества стриктинин I.

Для 37,5 % веществ (рутин, 7-рамнозидо-3-глюкозид изорамнетина, изостриктинин) прогнозируется нефротоксический эффект.

Риск провоспалительных эффектов прогнозируется для половины (50 %) БАВ из листьев облепихи крушиновидной, прогноз *in silico* не уточняет характера таких изменений, однако по аналогии с побочными эффектами ЛРС следует предположить местный характер таких проявлений в зоне нанесения на кожу и слизистые оболочки. Для стриктинина I с высокой долей вероятности (Pa > 0,8) прогнозируется также дерматит и воспаление.

Ацидоз прогнозируется для стриктинина I и казуариктина.

Для 7-рамнозидо-3-глюкозида изорамнетина прогнозируется гипотермический эффект, при этом интересно, что противовоспалительный эффект для данного вещества не прогнозируется, что может свидетельствовать о центральном и, вероятно, нециклооксигеназном механизме его действия.

Репродуктивная дисфункция прогнозируется для 62,5 % БАВ (кроме нарциссина, изостриктинина и казуаринина). Для рутина, помимо этого, прогнозируется нарушение функции эндокринной системы. Эмбриотоксичность и тератогенность прогнозируется для 50 % БАВ (рутина, 7-рамнозидо-3-глюкозида изорамнетина, стриктинина I, изостриктинина). Генотоксичность и канцерогенность прогнозируются для вещества стриктинин I.

Важно подчеркнуть, что приведенный анализ перечня фармакологических и токсических эффектов

in silico является именно и только лишь количественным прогнозом вероятности проявления того или иного эффекта БАВ, позволяя оптимизировать затраты времени и ресурсов для более избирательного проведения доклинических исследований *in vitro, in vivo* и в перспективе клинических исследований, но не является их заменой.

Оценка противовоспалительной активности отвара листьев облепихи крушиновидной in vivo

На втором этапе при проведении доклинических исследований установлено, что в процессе эксперимента масса тела животных всех групп на 7-е сутки незначительно увеличилась по сравнению с исходной не более чем на 5,5 %, не имея достоверных различий между группами, что соответствует параметрам нормы для взрослых здоровых животных, свидетельствуя об отсутствии отрицательного влияния краткосрочного курсового применения отвара листьев облепихи крушиновидной на аппетит, функции ЖКТ и общее клиническое состояние животных. Данные приведены в таблице (таблица 4).

Установлено, что у животных контрольной группы на фоне модельного воздействия флогогена через 1 ч после введения формалина выявлено значительное достоверное увеличение объема конечности на 30,2 %, через 3 ч – на 57,9 % (таблица 5), что свидетельствует о развитии отека лапы крыс как проявления местного воспалительного процесса. В опытной группе (препарат сравнения) у животных, получавших ежедневно перорально на протяжении 7 суток настой цветков ромашки, отек лапы через 1 ч составил 39,5 % (эффективность отсутствует), через 3 ч – 50,5 %, что лишь незначительно (на 7,4 %) меньше по сравнению с контролем (эффективность 7,4 %).

Таблица 4. Результаты изменения массы тела животных в динамике

Table 4. Results of changes in the body weight of animals in dynamics

Масса тела, г Body weight, g	**Контрольная группа** Control group	**Настой цветков ромашки** Infusion of chamomile flowers	**Отвар листьев облепихи** Decoction of sea buckthorn leaves
Исходная (1 сут.) Initial (1 day)	225,67 ± 4,097		
Конечная (7 сут.) Final (7 days)	237,71 ± 6,837	238,00 ± 8,696	237,14 ± 5,124
Разница с исходным, % Difference from the original, %	+5,3	+5,5	+5,1

Таблица 5. Результаты определения выраженности отёка лапы крыс

Table 5. Results of determining the severity of paw edema in rats

Показатель Indicator	**Контрольная группа** Control group	**Настой цветков ромашки** Infusion of chamomile flowers	**Отвар листьев облепихи** Decoction of sea buckthorn leaves
Объём лапы, исходно, V_0, см^3 Paw volume, initially V_0, cm^3	1,03 ± 0,027		
Объём лапы через 1 ч, V_1, см^3 Paw volume after 1 h, V_1, cm^3	1,34 ± 0,024^{+++}	1,44 ± 0,053^{+++}	1,29 ± 0,033^{+++}
Объём лапы через 3 ч, V_3, см^3 Paw volume after 3 h, V_3, cm^3	1,63 ± 0,046^{+++}	1,55 ± 0,046^{+++}	1,26 ± 0,042$^{+++,***}$
Отек лапы через 1 ч, разница с исходным, % Paw edema, after 1 hour, the difference from the initial, %	+30,2	+39,5	+24,7
Отек лапы через 3 ч, разница с исходным, % Paw swelling, after 3 hours, the difference from the initial, %	+57,9	+50,5	+21,9
Эффективность (разница с контролем, 1 ч), % Efficiency (difference with control, 1 hour), %	–	–	5,5
Эффективность (разница с контролем, 3 ч), % Efficiency (difference with control, 3 hours), %	–	7,4	36,0

Примечание. $^{+}P < 0,05$; $^{++}P < 0,01$; $^{+++}P < 0,001$ – достоверность различий при сравнении опытных и контрольных показателей с исходными значениями; $^{*}P < 0,05$; $^{**}P < 0,01$; $^{***}P < 0,001$ – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателями.

Note. $^{+}P < 0.05$; $^{++}P < 0.01$; $^{+++}P < 0.001$ – reliability of differences in comparison between experimental and control indicators with initial values; $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$ – reliability of differences in comparison between experimental and control indicators.

Таблица 6. **Результаты термометрии**

Table 6. **Thermometry results**

Показатель Indicator	**Контрольная группа** Control group	**Настой цветков ромашки** Infusion of chamomile flowers	**Отвар листьев облепихи** Decoction of sea buckthorn leaves
Температура тела исходная, среднее, °С Body temperature, initial, average, °С	39,02 ± 0,106		
Температура тела через 1 ч, °С Body temperature, after 1 h, °С	38,74 ± 0,157	38,86 ± 0,095	38,84 ± 0,107
Температура тела через 3 ч, °С Body temperature, after 3 h, °С	38,09 ± 0,338	38,43 ± 0,187	38,50 ± 0,212

В опытной группе (изучаемый экспериментальный препарат) у животных, получавших ежедневно перорально в течение 7 суток отвар листьев облепихи, отек лапы через 1 ч составил 24,7 %, что на 5,5 % меньше, чем в контроле (эффективность 5,5 %), через 3 ч отек лапы составил 21,9 %, что значительно, достоверно ($P < 0,001$) на 36,0 % меньше по сравнению с контролем (эффективность 36,0 %). Результаты определения выраженности отека лапы крыс приведены в таблице 5.

Таким образом, на фоне краткосрочного, в течение 7 сут., курсового перорального применения отвара листьев облепихи крушиновидной выявлено значительное, достоверное снижение выраженности отека лапы крыс. Максимальная эффективность достигается через 3 ч после введения флогогена, составляя 36,0 %, что превышает эффективность препарата сравнения (настой цветков ромашки).

Известно, что, согласно ранее опубликованным данным исследований, проведенных в той же лаборатории ФГБОУ ВО «ВГУ» по идентичной методике, препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 8,0 мг/кг однократно внутримышечно за 1 ч до введения формалина достоверно снижал выраженность отека лапы через 1 ч на 13,8 %, а через 3 ч – на 30,1 % по сравнению с контрольной группой [29]. Следует предположить по аналогии, что противовоспалительная активность отвара листьев облепихи при краткосрочном курсовом применении внутрь в течение 7 суток, проявляющаяся как уменьшение отека лапы через 3 ч на 36,0 % по сравнению с контролем, сопоставима по выраженности с эффективностью диклофенака натрия, при этом ввиду перорального способа введения действие развивается постепенно, достигая максимума через 3 ч.

В результате эксперимента не выявлено значимого влияния отвара листьев облепихи крушиновидной на ректальную температуру тела животных, показатели во всех группах находились в пределах видово-возрастной нормы (таблица 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью платформы PASS-online проведено прогнозирование наиболее вероятных фармакологических и токсических эффектов основных БАВ листьев облепихи крушиновидной *in silico*. Проведенный анализ и систематизация данных позволяют считать наиболее перспективным изучение противовоспалительной, гепатопротекторной, кардиопротекторной, а также антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активности, что открывает перспективы для дальнейших доклинических и клинических исследований с целью расширения перечня показаний к применению извлечений из листьев облепихи крушиновидной в клинической практике. Проведено прогнозирование токсических эффектов основных БАВ листьев облепихи крушиновидной. Наименьшее число вероятных токсических эффектов прогнозируется для нарциссина и кверцетина, наибольшее – для вещества стриктинин I (32 наименования, в т. ч. нейротоксичность, гематотоксичность, отрицательное влияние на сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечная токсичность, репродуктивная токсичность и канцерогенность), что требует подтверждения в доклинических токсикологических исследованиях.

В доклинических исследованиях *in vivo* на модели отека лапы крыс доказано, что отвар листьев облепихи крушиновидной при краткосрочном курсовом пероральном применении в дозе 10 мл/кг (235 мг/кг из расчета по сухому остатку) в течение 7 суток проявляет достаточный противовоспалительный эффект, обеспечивая значительное, достоверное снижение выраженности отека лапы крыс максимально через 3 ч после введения флогогена на 36,0 % по сравнению с контролем, что превышает эффективность препарата сравнения (настой цветков ромашки).

ЛИТЕРАТУРА

1. Тринеева О. В. Комплексное исследование содержания и специфического профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной. Воронеж: Издательский дом ВГУ; 2016. 223 с.
2. Мельников О. М., Верещагин А. Л., Кошелев Ю. А. Исследование биологически активных соединений почек и листьев мужских растений облепихи крушиновидной. *Химия растительного сырья*. 2010;2:113–116.
3. Кукина Т. П., Щербаков Д. Н., Геньш К. В., Тулышева Е. А., Сальникова О. И., Гражданников А. Е., Колосова Е. А. Биоактивные компоненты древесной зелени облепихи *Hippophae rhamnoides* L. *Химия растительного сырья*. 2016;1:37–42. DOI: 10.14258/jcprm.2016011100.

4. Тарасов А. В., Бухаринова М. А., Хамзина Е. И. Определение антиоксидантной активности водных экстрактов некоторых растений Уральского региона. *Индустрия питания*. 2018;3(2):31–38.
5. Чукаев С. А., Роднаева О. А. Оценка спектра антиоксидантной активности гипорамина *in vitro*. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2009;2(66):140–142.
6. Абдыкаликова К. А., Нечипоренко Л. П. Фитохимический состав надземной части облепихи крушиновидной. *Вестник КГПИ*. 2008;4:104–107.
7. Айтуарова А. Ш., Жусупова Г. Е. Качественная и количественная оценка состава биологически активных веществ надземной части растения вида *Hippophaë rhamnoides* L. *Известия научно-технического общества «КАХАК»*. 2015;4(51):4–10.
8. Айтуарова А. Ш., Жусупова Г. Е. Выделение биологически активных веществ из надземной части растения вида *Hippophae rhamnoides* L. и возможности их использования в медицине. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2016;3:195–197.
9. Suryakumar G., Gupta A. Лекарственный и терапевтический потенциал облепихи (*Hippophaë rhamnoides* L.). *Журнал этнофармакологии*. 2011;138:268–278.
10. Jaroszewska A., Biel W. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2017;77(2):155–162. DOI: 10.4067/S0718-58392017000200155.
11. Чиркина Т. Ф., Золотарева А. М., Пластинина З. А. Перспективные растительные источники биологически активных веществ в байкальском регионе. *Техника и технология пищевых производств*. 2009;1(12):71–74.
12. Имашева Н. М., Елина В. В., Садомцева О. С., Щепетова Е. В., Шакирова В. В. Составление БАД на основе растительного сырья. *Международный академический вестник*. 2014;3(3):52–55.
13. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том 4. М.: Министерство здравоохранения РФ; 2018. 7019 с.
14. Мазко О. Н., Макарова О. Г., Кирьякова В. О., Пашков А. П. Противовоспалительная активность настоя подмаренника настоящего травы. *Бюллетень медицинской науки*. 2017;2(6):11–13. DOI: 10.31684/2541-8475.2017.2(6).11-13.
15. Бубенчикова В. Н., Старчак Ю. А. Противовоспалительная активность травы Тимьяна Палласа (*Thymus pallasianus* H. BRAUN). *Кубанский научный медицинский вестник*. 2015;5(154):25–27.
16. Горячкина Е. Г., Цыренжапов А. В., Мазунова О. И., Федосеева Г. М. Экспериментальная оценка противовоспалительной активности растений семейства астровых флоры Восточной Сибири. *Вестник Бурятского государственного университета*. 2012;S3:63–67.
17. Бубенчикова В. Н., Кондратова Ю. А. Антипролиферативная и антиэкссудативная активность водорастворимого полисахаридного комплекса шалфея горминового. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014;11(3):397–399.
18. Курманова Е. Н., Ферубко Е. В., Курманов Р. К., Мартынчик И. А. Гастропротективные и противовоспалительные свойства володушки золотистой травы экстракта сухого. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2:222–225.
19. Курманова Е. Н., Ферубко Е. В., Стрелкова Л. Б., Курманов Р. К., Шейченко О. П. Изучение противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020;64(1):108–112. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.108-112.
20. Багиров И. М. Фармакогностическое изучение растений семейства Лоховые. Дисс. … канд. фарм. наук. Москва; 2010. 24 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-rastenii-semeistva-lokhovykh. Ссылка активна на 01.08.2022.
21. Верлина А. А., Бузлама А. В., Уйманова А. С., Гудкова А. А. Прогноз видов фармакологической активности компонентов сока подорожника большого *in silico* и оценка его антиоксидантной активности *in vitro*. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2021;4:61–67.
22. Апрышко Г. Н., Жукова О. С., Фетисова Л. В., Власенкова Н. К., Пугачева Р. Б., Горюнова О. В. Изучение свойств потенциальных противоопухолевых аминокислотных производных гликозидов индолокарбазолов *in silico* и *in vitro*. *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;16(4):46–54.
23. Иванов В. С., Селезнёв А. Б., Ивченко Е. В., Черкашин Д. В., Кутелев Г. Г., Бойко Ю. Г. Исследование возможностей прогнозирования фармакодинамических свойств лекарственных препаратов *in silico* на примере сопоставления данных о клиническом применении нафазолина и результатов компьютерного моделирования. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2020;22(2):171–176. DOI: 10.17816/brmma50068.
24. Терехов Р. П., Селиванова И. А., Жевлакова А. К., Порозов Ю. Б., Дзубан А. В. Анализ физических модификаций дигидрокверцетина *in vitro* и *in silico*. *Биомедицинская химия*. 2019;65(2):152–158. DOI: 10.18097/PBMC20196502152.
25. Lafuente-Gracia L., Borgiani E., Nasello G., Geris L. Towards *in silico* Models of the Inflammatory Response in Bone Fracture Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:703725. DOI: 10.3389/fbioe.2021.703725.
26. Kandemir-Cavas C., Pérez-Sanchez H., Mert-Ozupek N., Cavas L. *In Silico* Analysis of Bioactive Peptides in Invasive Sea Grass *Halophila stipulacea*. *Cells*. 2019;8(6):557. DOI:10.3390/cells8060557.
27. Sohail M. S., Ahmed S. F., Quadeer A. A., McKay M. R. *In silico* T cell epitope identification for SARS-CoV-2: Progress and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;171:29–47. DOI: 10.1016/j.addr.2021.01.007.
28. Бузлама А. В., Николаевский В. А., Чернов Ю. Н., Сливкин А. И. Доклинические исследования лекарственных веществ. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017. 383 с.
29. Бузлама А. В., Николаевский В. А., Чернов Ю. Н., Сливкин А. И. Экспериментальная фармакология – принципы, модели, анализ. Воронеж: Издательский дом ВГУ; 2013. 362 с.

REFERENCES

1. Trineeva O. V. Comprehensive study of the content and specific profile of biologically active substances of sea buckthorn fruits. Voronezh: VSU Publishing House; 2016. 223 p. (In Russ.)
2. Mel'nikov O. M., Vereshchagin A. L., Koshelev Yu. A. Investigation of biologically active compounds of buds and leaves of male sea buckthorn plants. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2010;2:113–116. (In Russ.)
3. Kukina T. P., Shcherbakov D. N., Gen'sh K. V., Tulysheva E. A., Sal'nikova O. I., Grazhdannikov A. E., Kolosova E. A. Bioactive components of woody greenery of sea buckthorn *Hippophae rhamnoides* L. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2016;1:37–42. DOI: 10.14258/jcprm.2016011100. (In Russ.)
4. Tarasov A. V., Bukharinova M. A., Khamzina E. I. Determination of antioxidant activity of aqueous extracts of some plants of the Ural region. *Industriya pitaniya*. 2018;3(2):31–38. (In Russ.)
5. Chukaev S. A., Rodnaeva O. A. Evaluation of the spectrum of antioxidant activity of hyporamine *in vitro*. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2009;2(66):140–142. (In Russ.)
6. Abdykalikova K. A., Nechiporenko L. P. Phytochemical composition of the aboveground part of sea buckthorn. *Vestnik KGPI*. 2008;4:104–107. (In Russ.)
7. Aytuarova A. Sh., Zhusupova G. E. Qualitative and quantitative assessment of the composition of biologically active substances of the aboveground part of the plant species Nirrhae rhamnoides L. *Izvestiya nauchno-tekhnicheskogo obshchestva «KAKhAK»*. 2015;4(51):4–10. (In Russ.)
8. Aytuarova A. Sh., Zhusupova G. E. Isolation of biologically active substances from the aboveground part of a plant of the species Nirrhae rhamnoides L. and the possibilities of their use in medicine. *Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo meditsinskogo universiteta*. 2016;3:195–197. (In Russ.)
9. Suryakumar G., Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of sea buckthorn (*Nirrhae rhamnoides* L.). *Zhurnal etnofarmakologii*. 2011;138:268–278. (In Russ.)
10. Jaroszewska A., Biel W. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2017;77(2):155–162. DOI: 10.4067/S0718-58392017000200155.
11. Chirkina T. F., Zolotareva A. M., Plastinina Z. A. Promising plant sources of biologically active substances in the Baikal region. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv*. 2009;1(12):71–74. (In Russ.)

12. Imasheva N. M., Elina V. V., Sadomtseva O. S., Shchepetova E. V., Shakirova V. V. Preparation of dietary supplements based on plant raw materials. *Mezhdunarodnyy akademicheskiy vestnik*. 2014;3(3):52-55. (In Russ.)
13. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. Volume 4. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. 7019 p. (In Russ.)
14. Mazko O. N., Makarova O. G., Kiryakova V. O., Pashkov A. P. Anti-inflammatory activity of galium verum herb infusion. *Bulletin of Medical Science*. 2017;2(6):11–12. (In Russ.) DOI: 10.31684/2541-8475.2017.2(6).11-13.
15. Bubenchikova V. N., Starchak Yu. A. nti-inflammatory activity of Thyme Pallas herb (*Thymus pallasianus* H. BRAUN). *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*. 2015;5(154):25–27. (In Russ.)
16. Goryachkina E. G., Tsyrenzhapov A. V., Mazunova O. I., Fedoseeva G. M. Experimental evaluation of the anti-inflammatory activity of plants of the aster family of the flora of Eastern Siberia. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012;S3:63–67. (In Russ.)
17. Bubenchikova V. N., Kondratova Yu. A. Antiproliferative and antiexudative activity of the water-soluble polysaccharide complex of sage gormin. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2014;11(3):397–399. (In Russ.)
18. Kurmanova E. N., Ferubko E. V., Kurmanov R. K., Martynchik I. A. Gastroprotective and anti-inflammatory properties of volodushka golden grass extract dry. *Drug development & registration*. 2017;2:222–225. (In Russ.)
19. Kurmanova E. N., Ferubko E. V., Strelkova L. B., Kurmanov R. K., Sheychenko O. P. Study of the anti-inflammatory activity of Moldovan snakehead extract. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2020;64(1):108–112. (In Russ.) DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.108-112.
20. Bagirov I. M. Pharmacognostic study of plants of the Lochaceae family. [Dissertation]. Moscow; 2010. 24 p. Available at: https://www.dissercat.com/content/farmakognosticheskoe-izuchenie-rastenii-semeistva-lokhovykh. Accessed: 01.08.2022. (In Russ.)
21. Verlina A. A., Buzlama A. V., Uymanova A. S., Gudkova A. A. Forecast of the types of pharmacological activity of the components of plantain juice in silico and evaluation of its antioxidant activity *in vitro*. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2021;4:61–67. (In Russ.)
22. Apryshko G. N., Zhukova O. S., Fetisova L. V., Vlasenkova N. K., Pugacheva R. B., Goryunova O.V. Studying the properties of potential antitumor amino acid derivatives of indolocarbazole glycosides *in silico* and *in vitro*. *Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(4):46–54. (In Russ.)
23. Ivanov V. S., Seleznev A. B., Ivchenko E. V., Cherkashin D. V., Kutelev G. G., Boyko Yu. G. Predictability study of the pharmacodynamic properties of drugs *in silico* by the example of comparing data on the naphazoline clinical use and the results of computer modeling. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2020;22(2):171–176. (In Russ.) DOI: 10.17816/brmma50068.
24. Terekhov R. P., Selivanova I. A., Zhevlakova A. K., Porozov Yu. B., Dzuban A. V. Analysis of physical modifications of dihydroquercetin *in vitro* and *in silico*. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2019;65(2):152–158. (In Russ.) DOI: 10.18097/PBMC20196502152.
25. Lafuente-Gracia L., Borgiani E., Nasello G., Geris L. Towards *in silico* Models of the Inflammatory Response in Bone Fracture Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:703725. DOI: 10.3389/fbioe.2021.703725.
26. Kandemir-Cavas C., Pérez-Sanchez H., Mert-Ozupek N., Cavas L. *In Silico* Analysis of Bioactive Peptides in Invasive Sea Grass *Halophila stipulacea*. *Cells*. 2019;8(6):557. DOI:10.3390/cells8060557.
27. Sohail M. S., Ahmed S. F., Quadeer A. A., McKay M. R. *In silico* T cell epitope identification for SARS-CoV-2: Progress and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;171:29–47. DOI: 10.1016/j.addr.2021.01.007.
28. Buzlama A. V., Nikolaevskiy V. A., Chernov Yu. N., Slivkin A. I. Preclinical studies of medicinal substances. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. 383 p. (In Russ.)
29. Buzlama A. V., Nikolaevskiy V. A., Chernov Yu. N., Slivkin A. I. Experimental pharmacology – principles, models, analysis. Voronezh: VSU Publishing House; 2013. 362 p. (In Russ.)

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

50 лет ГИЛС и НП

GMP VIII ВСЕРОССИЙСКАЯ GMP - КОНФЕРЕНЦИЯ

VIII ВСЕРОССИЙСКАЯ GMP-КОНФЕРЕНЦИЯ

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

27–29 СЕНТЯБРЯ 2023 г.

МВЦ «ЕКАТЕРИНБУРГ-ЭКСПО»

Успейте зарегистрироваться.
Количество мест ограничено

www.gosgmp.ru

Генеральный партнер Binnopharm group

Оператор:
ООО «ЦКК С-ГРУП»
Тел.: +7(495) 120-53-33
E-mail: conference@sgr.com.ru

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-190-194
УДК 615.015.11

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Оценка антистафилококковой активности пиримидинового производного

А. А. Цибизова[1], А. Л. Ясенявская[1]✉, И. Н. Тюренков[2], А. А. Озеров[2], О. А. Башкина[1], М. А. Самотруева[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России), 414000, Россия, Астраханская область, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России), 400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, зд. 1

✉ **Контактное лицо:** Ясенявская Анна Леонидовна. **E-mail:** yasen_9@mail.ru

ORCID: А. А. Цибизова – https://orcid.org/0000-0002-9994-4751; А. Л. Ясенявская – https://orcid.org/0000-0003-2998-2864;
И. Н. Тюренков – https://orcid.org/0000-0001-7574-3923; А. А. Озеров – https://orcid.org/0000-0002-4721-0959; О. А. Башкина – https://orcid.org/0000-0003-4168-4851;
М. А. Самотруева – https://orcid.org/0000-0001-5336-4455.

Статья поступила: 22.06.2022 **Статья принята в печать:** 19.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Разработка безопасных и эффективных лекарственных препаратов с антимикробной активностью в настоящее время является приоритетной задачей современной фармакологии. Необходимость получения новых противомикробных средств связана с наличием проблем, основной из которых является развитие полирезистентности патогенного возбудителя к существующим антибактериальным препаратам. Особый интерес в качестве основы для создания лекарственных препаратов представляют пиримидиновые соединения, которые обладают широким спектром фармакологических эффектов, а именно: психо- и нейротропным, метаболическим, противовоспалительным, антиоксидантным, противоопухолевым, иммунотропным и др. Также преимуществом пиримидинов является и простота синтеза новых соединений на их основе путем присоединения различных функциональных групп к гетероциклу.

Цель. Оценка антистафилококковой активности нового производного пиримидина в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Антистафилококковая активность пиримидинового производного 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-он (VMA-13-13) изучалась в условиях *in vitro* с использованием тест-культуры штамма стафилококка золотистого (*Staphylococcus aureus*) с применением метода серийных разведений. *St. aureus* был выделен из мокроты пациентов, проходивших лечение в стационарных условиях ГБУЗ АО «Городская клиническая больница № 3 им. С. М. Кирова» (г. Астрахань). В исследовании определялась минимальная подавляющая концентрация (МПК) 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-она в отношении *St. aureus*. В условиях *in vivo* были проведены исследования противомикробной активности на модели генерализованной инфекции, вызванной интраперитонеальным введением мышам 1 мл препарата *St. aureus,* содержащего 1×10^8 КОЕ/мл. Лабораторные животные были разделены на несколько групп: контроль I – животные, получавшие эквивалентный объем воды для инъекций (интактные); контроль II – животные, инфицированные *St. aureus*; опытные группы – мыши, получавшие препарат сравнения цефтриаксон (ОАО «Биосинтез», Россия) в средней терапевтической дозе 50 мг/кг, и мыши, получавшие пиримидиновое производное, смешанное с водой для инъекций, в дозе 27 мг/кг, начиная со дня заражения в течение 7 суток. В исследовании оценивали влияние пиримидинового производного на выживаемость животных. По завершении эксперимента проводили подсчет индекса обсемененности крови, селезенки, печени и легких.

Результаты и обсуждение. В исследовании было установлено, что МПК цефтриаксона, при которой данный препарат оказывал бактериостатическую активность в отношении штамма *St. aureus*, соответствовала 1 мкг/мл, тогда как для пиримидинового производного VMA-13-13 МПК составила 16 мкг/мл; бактерицидное действие препарат сравнения вызывал в минимальной концентрации 32 мкг/мл, а изучаемая субстанция – в концентрации 64 мкг/мл. Формирование генерализованной стафилококковой инфекции привело к снижению выживаемости животных в группе нелеченого контроля до 30 %; при введении цефтриаксона и пиримидинового производного – до 80 % в сравнении с интактным контролем. При оценке антистафилококковой активности производного пиримидина в группе животных, инфицированных *St. aureus*, наблюдалось нарастание индекса бактериальной обсемененности внутренних органов и крови относительно контрольной интактной группы. Введение цефтриаксона и соединения VMA-13-13 привело к снижению данного показателя в легких и крови в 6,6 ($p \leq 0{,}01$) раза в сравнении с инфицированной группой животных; в печени и селезенке стафилококк не высевался.

Заключение. Таким образом, установлено, что соединение пиримидиновой природы 2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-он оказывает бактерицидное действие в отношении *Staphylococcus aureus* и способствует повышению выживаемости лабораторных животных в условиях генерализованной стафилококковой инфекции.

Ключевые слова: производные пиримидина, антистафилококковая активность, минимально подавляющая концентрация, генерализованная стафилококковая инфекция

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

Вклад авторов. А. А. Цибизова – сбор данных, оценка, обоснование и статистическая обработка полученных данных, подготовка черновика рукописи. А. Л. Ясенявская – сбор данных, оценка, обоснование и статистическая обработка полученных данных, подготовка черновика рукописи. И. Н. Тюренков – разработка концепции и дизайна исследования, планирование исследования, анализ полученных результатов. А. А. Озеров – разработка концепции и дизайна исследования, планирование исследования. О. А. Башкина – разработка концепции и дизайна исследования, планирование исследования. М. А. Самотруева – разработка концепции и дизайна исследования, планирование исследования, анализ полученных результатов.

© Цибизова А. А., Ясенявская А. Л., Тюренков И. Н., Озеров А. А., Башкина О. А., Самотруева М. А., 2023
© Tsibizova A. A., Yasenyavskaya A. L., Tyurenkov I. N., Ozerov A. A., Baskina O. A., Samotrueva M. A., 2023

Финансирование. Научная статья выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ в части проведения НИР по теме «Поиск и разработка перспективных соединений с антибактериальной активностью среди производных пиримидина для создания лекарственных препаратов» 48.2-2021.

Для цитирования: Цибизова А. А., Ясенявская А. Л., Тюренков И. Н., Озеров А. А., Башкина О. А., Самотруева М. А. Оценка антистафилококковой активности пиримидинового производного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):190–194. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-190-194

Evaluation of the Antistaphylococcal Activity of the Pyrimidine Derivative

Alexandra A. Tsibizova[1], Anna L. Yasenyavskaya[1]✉, Ivan N. Tyurenkov[2], Alexandr A. Ozerov[2], Olga A. Baskina[1], Marina A. Samotrueva[1]

[1] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Astrakhan State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 121, Bakuskaya str., Astrakhan, Astrakhan Region, 414000, Russia
[2] Volgograd State Medical University, 1, Pavshih Borcov Square, Volgograd, 400066, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna L. Yasenyavskaya. **E-mail:** yasen_9@mail.ru

ORCID: Alexandra A. Tsibizova – https://orcid.org/0000-0002-9994-4751; Anna L. Yasenyavskaya – https://orcid.org/0000-0003-2998-2864;
Ivan N. Tyurenkov – https://orcid.org/0000-0001-7574-3923; Alexandr A. Ozerov – https://orcid.org/0000-0002-4721-0959; Olga A. Baskina – https://orcid.org/0000-0003-4168-4851;
Marina A. Samotrueva – https://orcid.org/0000-0001-5336-4455.

Received: 22.06.2022 **Revised:** 19.07.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. The development of safe and effective drugs with antimicrobial activity is currently a priority task of modern pharmacology. The need to obtain new antimicrobial agents is associated with the presence of problems, the main of which is the development of polyresistance of the pathogenic pathogen to existing antibacterial drugs. Of particular interest as a basis for the creation of drugs are pyrimidine compounds, which have a wide range of pharmacological effects, namely psycho- and neurotropic, metabolic, anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, immunotropic, etc. Also, the advantage of pyrimidines is the simplicity of the synthesis of new compounds based on them by attaching various functional groups to the heterocycle.

Aim. Evaluation of antistaphylococcal activity of a new pyrimidine derivative *in vitro* and *in vivo*.

Materials and methods. Antistaphylococcal activity of pyrimidine derivative 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazolin-4(3H)-oh (VMA-13-13) was studied in vitro using a test culture of a strain of Staphylococcus aureus (*Staphylococcus aureus*) using the method of serial dilutions. *St. aureus* was isolated from the sputum of patients treated in inpatient conditions of GBUZ JSC "City Clinical Hospital No. 3 named after S. M. Kirov" (Astrakhan). The minimum suppressive concentration (MPC) of 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl) was determined in the studyquinazoline-4(3H)-oh in relation to *St. aureus*. *In vivo*, antimicrobial activity studies were conducted on a model of generalized infection caused by intraperitoneal administration of 1 ml of *St. aureus* drug containing 1×10^8 CFU/ml to mice. Laboratory animals were divided into several groups: control I – animals receiving an equivalent volume of water for injection; control II – animals infected with *St. aureus*; experimental groups – receiving the comparison drug ceftriaxone (Biosynthesis JSC, Russia) at an average therapeutic dose of 50 mg/kg; and mice treated with a pyrimidine derivative mixed with water for injection, at a dose of 1/10 of the molecular weight of 27 mg/kg, starting from the day of infection for 7 days. The study evaluated the effect of pyrimidine derivative on animal survival. At the end of the experiment, the index of contamination of blood, spleen, liver and lungs was calculated.

Results and discussion. In the study, it was found that the MPC of ceftriaxone, in which this drug had bacteriostatic activity against the *St. aureus* strain, corresponded to 1 mcg/ml, whereas for the pyrimidine derivative VMA-13-13, the MPC was 16 mcg/ml; the bactericidal effect of the comparison drug was caused at a minimum concentration of 32 mcg/ml, and the substance under study is in a concentration of 64 micrograms/ml. The formation of generalized staphylococcal infection led to a decrease in the survival rate of animals in the untreated control group up to 30 %; with the introduction of ceftriaxone and pyrimidine derivative – up to 80 % compared with the intact control. When evaluating the antistaphylococcal activity of pyrimidine derivative in the untreated control group, in comparison with the intact control, an increase in the index of bacterial contamination of internal organs and blood was observed. The introduction of ceftriaxone and the compound VMA-13-13 led to a decrease in this indicator in the lungs and blood by 6.6 ($p \leq 0.01$) times compared with the infected group of animals; staphylococcus was not sown in the liver and spleen.

Conclusion. Thus, it was established that the compound of pyrimidine nature is 2-Methyl-3-(2-phenyl-2-oxoethyl)quinazoline-4(3H)-it has a bactericidal effect against *Staphylococcus aureus* and helps to increase the survival rate of laboratory animals in conditions of generalized staphylococcal infection.

Keywords: pyrimidine derivatives, antistaphylococcal activity, minimally suppressive concentration, generalized staphylococcal infection

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. Alexandra A. Tsibizova – data collection, evaluation, justification and statistical processing of the received data, preparation of the draft manuscript. Anna L. Yasenyavskaya – data collection, evaluation, justification and statistical processing of the received data, preparation of the draft manuscript. Ivan N. Tyurenkov – development of the concept and design of the study, research planning, analysis of the results obtained. Alexandr A. Ozerov – development of the concept and design of the study, planning of the study. Olga A. Bashkina – development of the research concept and design, research planning. Marina A. Samotrueva – development of the research concept and design, research planning, analysis of the results obtained.

Funding. The scientific article was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Health of the Russian Federation in terms of conducting research on the topic "Search and development of promising compounds with antibacterial activity among pyrimidine derivatives for the creation of medicines" 48.2-2021.

For citation: Tsibizova A. A., Yasenyavskaya A. L., Tyurenkov I. N., Ozerov A. A., Baskina O. A., Samotrueva M. A. Evaluation of the antistaphylococcal activity of the pyrimidine derivative. *Drug development & registration*. 2023;12(3):190–194. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-190-194

ВВЕДЕНИЕ

Разработка безопасных и эффективных лекарственных препаратов с антимикробной активностью в настоящее время является приоритетной задачей современной фармакологии. Необходимость получения новых противомикробных средств связана с наличием проблем, основной из которых является развитие полирезистентности патогенного возбудителя к существующим антибактериальным препаратам [1–3].

Особый интерес в качестве основы для создания лекарственных препаратов представляют пиримидиновые соединения, которые, являясь структурными единицами нуклеотидов и нуклеозидов, принимают непосредственное участие в синтезе белковых молекул, коферментов, витаминов, макроэргических соединений, что и определяет поливалентность их фармакологической активности [4, 5]. В исследованиях установлено, что пиримидиновые соединения оказывают психо- и нейротропное, метаболическое, противовоспалительное, антиоксидантное, противоопухолевое, иммунотропное и др. виды действия. Доказано, что производные пиримидина способны обеспечивать и противомикробный, противовирусный, противогрибковый, противопротозойный эффекты [6–11]. Наряду с плейотропностью эффектов преимуществом пиримидинов является и простота синтеза новых соединений на их основе путем присоединения различных функциональных групп к гетероциклу [12, 13]. Так, в настоящее время учеными Волгоградского государственного медицинского университета синтезированы соединения пиримидиновой структуры, являющиеся перспективными источниками лекарственных средств с антибактериальным действием.

Целью данного исследования явилась оценка антистафилококковой активности нового производного пиримидина в условиях *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антистафилококковая активность пиримидинового производного 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-он (VMA-13-13) изучалась в условиях *in vitro* с использованием тест-культуры штамма стафилококка золотистого (*Staphylococcus aureus)* с применением метода серийных разведений. *St. aureus* был выделен из мокроты пациентов, проходивших лечение в стационарных условиях ГБУЗ АО «Городская клиническая больница № 3 им. С. М. Кирова» (г. Астрахань). В мясо-пептонном бульоне формировали ряды в пробирках с концентрацией исследуемого соединения 128 мкг/мл; 64 мкг/мл; 32 мкг/мл; 16 мкг/мл; 8 мкг/мл; 4 мкг/мл; 2 мкг/мл; 1 мкг/мл и инкубировали в течение суток при температуре 37 °С, затем центрифугировали и осадок пересеивали на мясо-пептонный агар (МПА), после чего визуальным методом определяли наличие характерного роста (ХР) *St. aureus* в виде ровных круглых колоний S-формы диаметром 3 мм кремового цвета. В качестве положительного контроля использовали чашку Петри с МПА с внесенной культурой *St. aureus*. Контрольные ряды формировали серийными разведениями различной концентрацией препарата сравнения – цефтриаксона. В исследовании определялась минимальная подавляющая концентрация (МПК) 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-она в отношении стафилококка золотистого.

В условиях *in vivo* были проведены исследования противомикробной активности на модели генерализованной инфекции, вызванной интраперитонеальным введением мышам 1 мл препарата *St. aureus,* содержащего 1×10^8 КОЕ/мл. Лабораторные животные были разделены на несколько групп: контроль I – животные, получавшие эквивалентный объем воды для инъекций; контроль II – животные, инфицированные *St. aureus*; опытные группы – мыши, получавшие препарат сравнения цефтриаксон (ОАО «Биосинтез», Россия) в средней терапевтической дозе 50 мг/кг, и мыши, получавшие пиримидиновое производное, смешанное с водой для инъекций, в дозе 27 мг/кг, начиная со дня заражения в течение 7 суток (минимально активная доза определена в эксперименте, составила 1/10 от молекулярной массы, выбрана после проведенного исследования острой токсичности, где было установлено, что соединение относится к нетоксичным веществами). В исследовании оценивали влияние пиримидинового производного на выживаемость животных. По завершении эксперимента проводили подсчет индекса обсемененности крови, селезенки, печени и легких [8].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета Excel и программного обеспечения BIOSTAT, с учетом критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми различия считали при $p \leq 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке противомикробной активности цефтриаксона и пиримидинового производного 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3Н)-он были получены следующие результаты: положительный контроль показал наличие 100 % характерного роста *St. aureus*; в разведениях от 128 до 32 мкг/мл цефтриаксон показал высокую активность, тогда как пиримидиновое соединение было активно в разведениях 128 и 64 мкг/мл; наличие характерного роста штаммов микроорганизма менее 25 % наблюдалось у препарата сравнения в разведениях 16 и 8 мкг/мл, а у изучаемого соединения – в 32 и 16 мкг/мл; в концентрациях от 4 до 1 мкг/мл цефтриаксон показал среднюю степень активности, тогда как пиримидиновое производное – в концентрации 8 мкг/мл; пиримидиновое соединение в концентрациях от 4 до 1 мкг/мл показало малую активность в отношении *St. aureus*.

В исследовании было установлено, что минимальная подавляющая концентрация цефтриаксона, при которой данный препарат оказывал бактериостатическую активность в отношении штамма стафилокок-

ка золотистого, соответствовала 1 мкг/мл, тогда как для пиримидинового производного VMA-13-13 МПК составила 16 мкг/мл; бактерицидное действие препарат сравнения вызывал в минимальной концентрации 32 мкг/мл, а изучаемая субстанция – в концентрации 64 мкг/мл.

Формирование генерализованной стафилококковой инфекции привело к снижению выживаемости животных в группе нелеченого контроля до 30 %; при введении цефтриаксона и пиримидинового производного – до 80 % в сравнении с интактным контролем.

Оценка бактериальной обсемененности крови и внутренних органов лабораторных животных показала, что в группе интактного контроля не отмечался характерный рост стафилококка; в группе нелеченного контроля был зарегистрирован рост микроорганизмов в крови и внутренних органах; при введении цефтриаксона и пиримидинового соединения был установлен рост *St. aureus* в крови и легких у двух особей (таблица 1).

Результаты определения индекса бактериальной обсемененности, который рассчитывается как отношение положительных проб посева ко всем пробам посева крови и внутренних органов, представлены в таблице 2.

При оценке антистафилококковой активности производного пиримидина *in vivo* в группе нелеченого контроля отмечался рост индекса бактериальной обсемененности внутренних органов и крови в сравнении с интактным контролем. Введение цефтриаксона и соединения VMA-13-13 привело к снижению данного показателя в легких и крови в 6,6 ($p \leq 0{,}01$) раза в сравнении с инфицированной группой животных; в печени и селезенке стафилококк не высевался.

Таким образом, в исследовании была установлена антистафилококковая активность производного пиримидина 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он в условиях *in vitro*: бактериостатическую активность соединение показало в разведении 16 мкг/кг и бактерицидную – в разведении 64 мкг/кг. Полученные результаты сопоставимы с показателями, полученными при исследовании препарата сравнения – цефтриаксона.

Таблица 1. Влияние производного пиримидина VMA-13-13 на бактериальную обсемененность крови и внутренних органов

Table 1. Effect of pyrimidine derivative VM A-13-13 on bacterial contamination of blood and internal organs

Экспериментальные группы / Experimental groups	Особи / Individuals	Печень / Liver	Селезенка / Spleen	Легкие / Lungs	Кровь / Blood
Контроль I / Control I	1–10	–	–	–	–
Контроль II / Control II	1–3	+	+	+	+
Цефтриаксон (50 мг/кг) / Ceftriaxone (50 mg/kg)	1–2	–	–	–	–
	3–6	–	–	–	–
	7–8	–	–	+	+
VM A-13-13 (27 мг/кг) / VM A-13-13 (27 mg/kg)	1–3, 6–8	–	–	–	–
	4–5	–	–	+	+

Примечание. «+» – характерный рост *St. aureus.* «–» – нет роста *St. aureus.*

Note. «+» – characteristic growth of *St. aureus.* «–» – no growth of *St. aureus.*

Результаты оценки противомикробной активности изучаемого пиримидинового соединения 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он в условиях *in vivo* свидетельствуют о способности увеличивать выживаемость лабораторных животных в условиях генерализованной стафилококковой инфекции.

Анализ научной литературы показал, что соединения пиримидиновой природы оказывают противомикробную, в том числе антистафилококковую, активность за счет введения в их химическую формулу различных радикалов, что подтверждено исследованиями по изучению новых соединений [5, 14]. В экспериментальных работах показано, что субстанция N-фенил-2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропанамид, содержащая метильную группу и фенильный радикал, активна в отношении *St. aureus* и проявляет

Таблица 2. Влияние производного пиримидина VMA-13-13 на индекс бактериальной обсемененности крови и внутренних органов

Table 2. Effect of pyrimidine derivative VM A-13-13 on the index of bacterial contamination of blood and internal organs

Экспериментальные группы / Experimental groups	Печень / Liver	Селезенка / Spleen	Легкие / Lungs	Кровь / Blood
Контроль I / Control I	0	0	0	0
Контроль II / Control II	1,0 ± 0,08***	1,0 ± 0,08***	1,0 ± 0,08***	1,0 ± 0,08***
Цефтриаксон (50 мг/кг) / Ceftriaxone (50 mg/kg)	0###	0###	0,15 ± 0,03***	0,15 ± 0,03***
VM A-13-13 (27 мг/кг) / VM A-13-13 (27 mg/kg)	0###	0###	0,15 ± 0,02***	0,15 ± 0,02***

Примечание. *** и ### – $p < 0{,}01$ по отношению к показателям группы контроля I и контроля II.

Note. *** and ### – $p < 0.01$ in relation to the indicators of control group I and control II.

бактериостатический эффект. Установлены бактериостатический эффект вещества 3-[2-(2-нафтил)-2-оксоэтил]-4(3H)-хиназолинон в отношении *Kl. pneumoniae* и бактерицидная активность в отношении *E. coli*. Показана бактерицидная активность соединения 3-[2-[(4-диметиламинофенил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он, содержащего диметиламинозамещенный фенильный радикал, в отношении *E. coli* и *Kl. Pneumoniae* [14].

Принимая во внимание вышеописанные данные, можно предположить, что противомикробная, в частности антистафилококковая, активность изучаемого производного пиримидина обусловлена наличием фенильного радикала, отвечающего за биоцидную активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что соединение пиримидиновой природы 2-метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он оказывает бактерицидное действие в отношении *Staphylococcus aureus* и способствует повышению выживаемости лабораторных животных в условиях генерализованной стафилококковой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aslam B., Wang W., Arshad M. I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M. H., Nisar M. A., Alvi R. F., Aslam M. A., Qamar M. U., Salamat M. K. F., Baloch Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*. 2018;11:1645–1658. DOI: 10.2147/IDR.S173867.
2. Павленко Н. В., Козонова З. Г. Проблемы и возможность повышения эффективности антибиотиков. *Тенденции развития науки и образования*. 2020;68(2):63–66. DOI: 10.18411/lj-12-2020-68.
3. Mobarki N., Almerabi B., Hattan A. Antibiotic resistance crisis. *International Journal of Medicine in Developing Countries*. 2019;3(6):561–564. DOI: 10.24911/IJMDC.51-1549060699.
4. Cruz J. S., de Aguiar A. P. Overview of the Biological Activities of Pyrimido[4,5-d]pyrimidines. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2021;21(15):2138–2168. DOI: 10.2174/1389557521666210219160115.
5. Zarenezhad E., Farjam M., Iraji A. Synthesis and biological activity of pyrimidines-containing hybrids: Focusing on pharmacological application. *Journal of Molecular Structure*. 2021;1230:129833. DOI: 10.1016/J.MOLSTRUC.2020.129833.
6. Verma V., Joshi C. P., Agarwal A., Soni S., Kataria U. A review on pharmacological aspects of pyrimidine derivatives. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020;10(5):358–361. DOI: 10.22270/jddt.v10i5.4295.
7. Löffler M., Carrey E. A., Zameitat E. New perspectives on the roles of pyrimidines in the central nervous system. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2018;37(5):290–306. DOI: 10.1080/15257770.2018.1453076.
8. Abdellatif K. R., Bakr R. B. Pyrimidine and fused pyrimidine derivatives as promising protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Medicinal Chemistry Research*. 2021;30(1):31–49. DOI: 10.1007/s00044-020-02656-8.
9. Hussain M. M. M., Bharthi D. R., Revanasiddappa B. C., Kumar H. Synthesis and Antioxidnat activity of novel 2-Mercapto Pyrimidine Derivatives. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2020;13(3):1224–1226. DOI: 10.5958/0974-360x.2020.00225.5.
10. Zhuang J., Ma S. Recent Development of Pyrimidine-Containing Antimicrobial Agents. *ChemMedChem*. 2020;15(20):1875–1886. DOI: 10.1002/cmdc.202000378
11. Kumar S., Deep A., Narasimhan B. A review on synthesis, anticancer and antiviral potentials of pyrimidine derivatives. *Current Bioactive Compounds*. 2019;15(3):289–303. DOI: 10.2174/1573407214666180124160405.
12. Tolba M. S., Sayed M., Abdel-Raheem S. A. A., Gaber T. A., Kamal El-Dean A. M., Ahmed M. Synthesis and spectral characterization of some new thiazolopyrimidine derivatives. *Current Chemistry Letters*. 2021;10(4):471–478. DOI: 10.5267/j.ccl.2021.4.004.
13. Ur Rashid H., Martines M. A. U., Duarte A. P., Jorge J., Rasool S., Muhammad R., Ahmad N., Umar M. N. Research developments in the syntheses, anti-inflammatory activities and structure–activity relationships of pyrimidines. *RSC Advances*. 2021;11(11):6060–6098. DOI: 10.1039/d0ra10657g.
14. Самотруева М. А., Озеров А. А., Старикова А. А., Габитова Н. М., Мережкина Д. В., Цибизова А. А., Тюренков И. Н. Изучение антимикробной активности новых хиназолин-4(3H)-онов по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):318–329. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-318-329.

REFERENCES

1. Aslam B., Wang W., Arshad M. I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M. H., Nisar M. A., Alvi R. F., Aslam M. A., Qamar M. U., Salamat M. K. F., Baloch Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*. 2018;11:1645–1658. DOI: 10.2147/IDR.S173867.
2. Pavlenko N. V., Kozonova Z. G. Problems and the possibility of improving the effectiveness of antibiotics. *Trends in the development of science and education*. 2020;68(2):63–66. (In Russ.) DOI: 10.18411/lj-12-2020-68.
3. Mobarki N., Almerabi B., Hattan A. Antibiotic resistance crisis. *International Journal of Medicine in Developing Countries*. 2019;3(6):561–564. DOI: 10.24911/IJMDC.51-1549060699.
4. Cruz J. S., de Aguiar A. P. Overview of the Biological Activities of Pyrimido[4,5-d]pyrimidines. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2021;21(15):2138–2168. DOI: 10.2174/1389557521666210219160115.
5. Zarenezhad E., Farjam M., Iraji A. Synthesis and biological activity of pyrimidines-containing hybrids: Focusing on pharmacological application. *Journal of Molecular Structure*. 2021;1230:129833. DOI: 10.1016/J.MOLSTRUC.2020.129833.
6. Verma V., Joshi C. P., Agarwal A., Soni S., Kataria U. A review on pharmacological aspects of pyrimidine derivatives. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020;10(5):358–361. DOI: 10.22270/jddt.v10i5.4295.
7. Löffler M., Carrey E. A., Zameitat E. New perspectives on the roles of pyrimidines in the central nervous system. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2018;37(5):290–306. DOI: 10.1080/15257770.2018.1453076.
8. Abdellatif K. R., Bakr R. B. Pyrimidine and fused pyrimidine derivatives as promising protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Medicinal Chemistry Research*. 2021;30(1):31–49. DOI: 10.1007/s00044-020-02656-8.
9. Hussain M. M. M., Bharthi D. R., Revanasiddappa B. C., Kumar H. Synthesis and Antioxidnat activity of novel 2-Mercapto Pyrimidine Derivatives. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2020;13(3):1224–1226. DOI: 10.5958/0974-360x.2020.00225.5.
10. Zhuang J., Ma S. Recent Development of Pyrimidine-Containing Antimicrobial Agents. *ChemMedChem*. 2020;15(20):1875–1886. DOI: 10.1002/cmdc.202000378
11. Kumar S., Deep A., Narasimhan B. A review on synthesis, anticancer and antiviral potentials of pyrimidine derivatives. *Current Bioactive Compounds*. 2019;15(3):289–303. DOI: 10.2174/1573407214666180124160405.
12. Tolba M. S., Sayed M., Abdel-Raheem S. A. A., Gaber T. A., Kamal El-Dean A. M., Ahmed M. Synthesis and spectral characterization of some new thiazolopyrimidine derivatives. *Current Chemistry Letters*. 2021;10(4):471–478. DOI: 10.5267/j.ccl.2021.4.004.
13. Ur Rashid H., Martines M. A. U., Duarte A. P., Jorge J., Rasool S., Muhammad R., Ahmad N., Umar M. N. Research developments in the syntheses, anti-inflammatory activities and structure–activity relationships of pyrimidines. *RSC Advances*. 2021;11(11):6060–6098. DOI: 10.1039/d0ra10657g.
14. Samotrueva M. A., Ozerov A. A., Starikova A. A., Gabitova N. M., Merezhkina D. V., Tsibizova A. A., Tyurenkov I. N. Antimicrobial activity study of new quinazolin-4(3h)-ones against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):318–329. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-318-329.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-195-201
УДК 615.322:574.24

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Исследование элементного состава лекарственного растительного сырья Воронежской области

Н. А. Дьякова✉

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Дьякова Нина Алексеевна. **E-mail:** Ninochka_V89@mail.ru

ORCID: Н. А. Дьякова – https://orcid.org/0000-0002-0766-3881.

Статья поступила: 17.01.2022 **Статья принята в печать:** 19.07.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Имеющиеся сведения об элементном составе лекарственного растительного сырья Воронежской области показали, что исследования проводятся преимущественно по нескольким элементам, что не позволяет определить полный минеральный комплекс лекарственных растений и описать специфику накопления в них отдельных элементов.

Цель. Изучение макро- и микроэлементного состава лекарственного растительного сырья Воронежской области на примере заповедной зоны.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали фармакопейные виды лекарственного растительного сырья: листья крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), листья подорожника большого (*Plantago major* L.), цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), цветки липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.), траву пустырника пятилопастного (*Leonurus quinquelobatus* Gilib.), траву полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.), траву тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), траву горца птичьего (*Polygonum aviculare* L.), корни лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.), корни одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg). Заготовку сырья осуществляли в соответствии с фармакопейными правилами в естественных зарослях в Воронежском государственном природном биосферном заповеднике имени В. М. Пескова в Рамонском районе. Микроэлементный состав образцов изучали масс-спектроскопически на приборе ELAN DRC (PerkinElmer Instruments, США) после кислотно-микроволнового разложения.

Результаты и обсуждение. В каждом растительном образце количественно определено 59 элементов. Содержание общего элементного комплекса в изучаемых видах ЛРС варьирует от 1,91 до 7,68 % в пересчете на сухое сырье. Изучаемые виды сырья в наибольшей степени (более 84 %) накапливают макроэлементы. Эссенциальные микроэлементы в наибольшей степени накапливаются в листьях крапивы двудомной (более 9 мг/г). Из эссенциальных микроэлементов в наибольшей степени всеми изучаемыми видами сырья аккумулируются кремний и железо. Содержание нормируемых токсичных микроэлементов не превышает требований фармакопеи.

Заключение. Результаты исследования показали сложный макро- и микроэлементный состав изучаемого лекарственного растительного сырья, что может быть использовано в медицинской и фармацевтической практике создания фитопрепаратов и биологически активных добавок для коррекции физиологических норм содержания элементов в организме человека. Наиболее количественно богатый элементный состав отмечен для травы пустырника пятилопастного, листьев крапивы двудомной и подорожника большого (более 50 мг/г).

Ключевые слова: Воронежская область, микроэлементы, макроэлементы, минеральный комплекс, лекарственное растительное сырье

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

Вклад авторов. Н. А. Дьякова придумала и разработала эксперимент, написала статью.

Для цитирования: Дьякова Н. А. Исследование элементного состава лекарственного растительного сырья Воронежской области. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):195–201. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-195-201

Examination of Elemental Composition of Herbal Medicinal Raw Materials of Voronezh Region

Nina A. Dyakova✉

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

✉ **Corresponding author:** Nina A. Dyakova. **E-mail:** Ninochka_V89@mail.ru

ORCID: Nina A. Dyakova – https://orcid.org/0000-0002-0766-3881.

Received: 17.01.2022 **Revised:** 19.07.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. The available information on the elemental composition of medicinal plant raw materials of the Voronezh region showed that studies are carried out mainly on several elements, which does not allow determining the complete mineral complex of medicinal plants and describing the specifics of the accumulation of individual elements in them.

Aim. The purpose of the study is to study the macro- and microelement composition of medicinal plant raw materials of the Voronezh region on the example of a protected area.

© Дьякова Н. А., 2023
© Dyakova N. A., 2023

Materials and methods. Pharmacopoeic types of medicinal vegetal raw materials were used as subjects of investigation: nettle leaves dioecious (*Urtica dioica* L.), plantain leaves large (*Plantago major* L.), common pajma flowers (*Tanacetum vulgare* L.), heart-shaped linden flowers (*Tilia cordata* Mill.), herb of five-lobed dumplings (*Leonurus quinquelobatus* Gilib.), grass of bitter wormwood (*Artemisia absinthium* L.), common millennium grass (*Achillea millefolium* L.), bird mountain grass (*Polygonum aviculare* L.), roots of the common bladder (*Arctium lappa* L.), roots of the dandelion drug (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg). Raw material harvesting was carried out in accordance with pharmacopoeic rules in natural thickets in the Voronezh State Natural Biosphere Reserve named after V. M. Peskov in the Ramonsky district. The microelement composition of the samples was studied mass-spectroscopically on an ELAN DRC device (PerkinElmer Instruments, USA) after acid-microwave decomposition.
Results and discussion. In each plant sample, 59 elements were quantified. The content of the total elemental complex in the studied types of LRs varies from 1.91 to 7.68 % in terms of dry raw materials. The studied raw materials accumulate macroelements to the greatest extent (more than 84 %). Essential trace elements accumulate most in dioecious nettle leaves (more than 9 mg/g). Of the essential trace elements, silicon and iron accumulate most of all the studied raw materials. Content of regulated toxic trace elements does not exceed requirements of pharmacopoeia.
Conclusion. The results of the study showed a complex macro- and microelement composition of the studied medicinal vegetal raw materials, which can be used in the medical and pharmaceutical practice of creating phytopreparations and biologically active additives for correcting physiological norms of the content of elements in the human body. The most quantitatively rich elemental composition is noted for the grass of five-lobed dumplings, nettle leaves of dioecious and large plantain (more than 50 mg/g).

Keywords: Voronezh region, trace elements, macroelements, mineral complex, medicinal plant raw materials

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 an experiment, wrote an article.

For citation: Dyakova N. A. Examination of elemental composition of herbal medicinal raw materials of Voronezh region. *Drug development & registration*. 2023;12(3):195–201. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-195-201

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все большее внимание уделяется изучению содержания в лекарственном растительном сырье (ЛРС) не только биологически активных веществ органической природы, но и веществ минерального происхождения, оказывающих влияние на ход жизненно важных процессов в организме, принимая участие в различных биохимических реакциях [1–3]. Известна значительная биологическая активность различных химических элементов (в частности, цинка, меди, марганца, хрома и др.), для которых установлено участие в потенцировании фармакологического действия лекарственных растительных препаратов и стимуляции биосинтеза вторичных метаболитов в растительном организме [4–8].

Известно, что биохимический состав ЛРС зависит от ряда антропогенных и абиотических факторов, в частности от особенностей грунта и сроков заготовки. При этом элементный профиль сырья несет в себе информацию об экологическом состоянии региона и минеральном составе почв [9–13]. При этом анализ имеющихся данных литературы показал, что лекарственные растения Центрального Черноземья практически не изучены на предмет содержания всего комплекса содержащихся в них элементов. Преимущественно исследования посвящаются накоплению тяжелых металлов (свинца, кадмия, ртути, никеля и др.), что объясняется ежегодно возрастающей антропогенной нагрузкой на окружающую среду, влекущей за собой увеличение содержания в ЛРС токсичных микроэлементов. Подобные исследования способности накопления различных химических элементов ЛРС дает возможность судить о безопасности его использования в медицинских целях [14–16].

Имеющиеся сведения об элементном составе ЛРС Воронежской области показали, что исследования проводятся преимущественно по нескольким элементам, что не позволяет определить полный минеральный комплекс лекарственных растений и описать специфику накопления в них отдельных элементов. Детальные исследования элементного состава дикорастущего сырья являются значимыми в силу высокой биологической доступности содержащихся в растениях макро- и микроэлементов [16–19]. В связи с этим актуальным является изучение элементного состава ЛРС на примере различных дикорастущих объектов заповедной зоны Воронежской области.

Цель исследования – изучение макро- и микроэлементного состава ЛРС естественного биоценоза Воронежской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали фармакопейные виды ЛРС: листья крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), листья подорожника большого (*Plantago major* L.), цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), цветки липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.), траву полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.), траву пустырника пятилопастного (*Leonurus quinquelobatus* Gilib.), траву тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), траву горца птичьего (*Polygonum aviculare* L.), корни лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.), корни одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg). В иссле-

дования представлены разные виды ЛРС, включающие в себя различные органы или группы органов растений (листья, цветки, трава, корни) от разных форм производящих растений – травянистых и древесных форм растительности. Заготовку лекарственного растительного сырья осуществляли по фармакопейным правилам [20] в экологически чистом месте в естественных зарослях в Воронежском государственном природном биосферном заповеднике имени В. М. Пескова в Рамонском районе Воронежской области. Из измельченного сырья отбирались образцы для анализа, которые подвергались кислотному разложению смесью кислот с использованием систем микроволновой пробоподготовки. Навеску образца помещали во фторопластовый вкладыш и добавляли 5 мл смеси азотной и плавиковой кислоты. Автоклав с пробой во вкладыше помещали в микроволновую печь и разлагали пробу, используя программу разложения, рекомендованную производителем печи. Растворенную пробу количественно переносили в пробирку объемом 15 мл, троекратно встряхивая вкладыш с крышкой с 1 мл деионизованной воды и перенося каждый смыв в пробирку, доводили объем до 10 мл деионизованной водой, закрывали и перемешивали. Автоматическим дозатором со сменным наконечником отбирали аликвотную часть 1 мл и доводили до 10 мл 0,5%-й азотной кислотой, закрывали защитной лабораторной пленкой. Для контроля правильности определения использовался метод добавок. Рабочие стандартные растворы для этого готовили путем смешивания нескольких опорных многоэлементных стандартных растворов для масс-спектрометрии («Perkin-Elmer»), содержащие разные группы элементов. Элементный состав ЛРС определяли методом масс-спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе ELAN DRC (Perkin-Elmer Instruments, США) в соответствии с МУК 4.1.1483-03 «Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные при изучении элементного состава ЛРС, приведены в таблице 1 и на рисунке 1.

Масс-спектроскопически определено 59 элементов, условно разделенных на макроэлементы, содержащиеся в значительных количествах (более 0,1 % массы тела человека); микроэлементы, содержание которых варьирует в пределах от 0,001 до 0,00001 %. Среди микроэлементов особую группу составляют эссенциальные микроэлементы, для которых установлена роль в обеспечении жизнедеятельности. Токсичные и малоизученные микроэлементы включают элементы, для которых биологическая роль недостаточно изучена, многие из них обладают значительной токсичностью [7–9].

Таблица 1. Элементный состав ЛРС, мкг/г

Table 1. Elemental composition of LRS, μg/g

Элемент Element	**Цветки пижмы обыкновенной** Common linden flowers	**Цветки липы сердцевидной** Heart-shaped flowers	**Листья подорожника большого** Big plantain leaves	**Листья крапивы двудомной** Nettle dioecious leaves	**Трава тысячелистника обыкновенного** Millennial herb	**Трава пустырника пятилопастного** Five-bladed dummy grass	**Трава полыни горькой** Bitter wormwood grass	**Трава горца птичьего** Mountain bird Grass	**Корни лопуха обыкновенного** Burdock common roots	**Корни одуванчика лекарственного** Dandelion medicine roots
Всего определено Total defined	42252,00	38530,97	61499,84	76757,19	32770,50	58065,73	43978,78	37045,59	48063,02	19063,72
Макроэлементы *Macrocells*										
K	29489,1	16505	26656,8	26565	14534,9	30612,1	25932,7	21498,2	31978,9	9226,2
Ca	5430,9	14203,9	24142,9	26089,5	10937,8	16905,4	10008,7	7028,6	6605,4	2414,5
Mg	2627,1	2810,6	3616,5	9227,3	2406,8	4018,9	1982,9	3237,1	1896,4	1109
Na	38,9	37,6	261,4	105,9	38,8	56,4	40,6	682,7	3041,8	911,3
P	3822,8	3521,5	3415,3	4690,6	2813,4	4329,6	4267,3	1782,5	1976,5	2478,1
Итого Total	41408,8	37078,6	58092,9	66678,3	30731,7	55922,4	42232,2	34229,1	45499,0	16139,1
Эссенциальные микроэлементы *Essential trace elements*										
Co	0,23	0,19	0,41	0,22	0,21	0,56	0,2	0,83	3,73	4,25
Cr	0,17	0,19	2,87	1,49	0,38	0,34	0,59	1,22	3,07	3,29
Cu	2,25	1,98	3,77	5,83	6,55	6,47	12,54	5,02	8,46	5,25

Продолжение таблицы 1

Элемент Element	Цветки пижмы обыкновенной Common linden flowers	Цветки липы сердцевидной Heart-shaped flowers	Листья подорожника большого Big plantain leaves	Листья крапивы двудомной Nettle dioecious leaves	Трава тысячелистника обыкновенного Millennial herb	Трава пустырника пятилопастного Five-bladed dummy grass	Трава полыни горькой Bitter wormwood grass	Трава горца птичьего Mountain bird Grass	Корни лопуха обыкновенного Burdock common roots	Корни одуванчика лекарственного Dandelion medicine roots
Fe	62,8	117,2	713,7	329,6	114,8	192,1	185	527,5	508,6	278,2
Li	0,599	0,049	0,628	0,071	1,644	0,284	0,074	0,578	0,929	0,316
Mn	41,5	28,4	49,88	90,76	38,3	60,3	45,67	24,78	28,79	19,7
Mo	0,37	1,36	1,817	7,696	1,15	0,67	0,925	0,552	0,754	0,21
Ni	0,98	0,95	1,6	1,68	0,86	1,39	1,09	1,91	2,29	1,03
Se	0,004	0,006	0,16	0,35	0,028	0,03	0,041	0,021	0,32	0,24
Si	641	1119,3	1012,4	9278,7	1622,7	1498,6	1262,4	1239,7	686,4	2070,6
V	0,54	0,28	1,79	0,54	0,58	0,76	0,25	3,33	3,18	1,16
Zn	12,8	13	18,22	17,52	19,6	27	25,27	25,76	32,43	29,5
Итого Total	763,24	1282,91	1807,25	9734,46	1806,80	1788,50	1534,05	1831,20	1278,95	2413,75
Нормируемые токсичные микроэлементы Normalized toxic trace elements										
As	0,03	0,012	0,332	0,098	0,21	0,19	0,364	0,08	0,281	0,13
Cd	0,003	0,002	0,027	0,012	0,022	0,034	0,025	0,093	0,053	0,034
Hg	0,0002	0,0001	0,0064	0,0626	0,0027	0,0041	0,0045	0,0027	0,0051	0,0025
Pb	0,12	0,13	0,65	0,44	0,27	0,23	0,35	0,28	0,61	1,95
Итого Total	0,15	0,14	1,02	0,61	0,50	0,46	0,74	0,46	0,95	2,12
Другие малоизученные и токсичные элементы Other little-studied and toxic elements										
Ag	0,02	0,026	0,029	0,015	0,073	0,028	0,014	0,01	0,018	0,021
Al	14,6	78,8	1256,6	128,4	116,5	191,4	135,6	869,7	1036,8	447,7
Au	0,0059	0,0039	0,026	0,0014	0,0013	0,0032	0,0055	0,0022	0,0021	0,0025
Ba	4,18	15,3	145,7	31,16	9,31	70,3	11,98	12	38,36	9,69
Be	0,08	0,005	0,037	0,006	0,008	0,015	0,001	0,028	0,028	0,015
Bi	0,002	0,012	0,009	0,008	0,012	0,001	0,004	0,005	0,011	0,005
Ce	0,017	0,081	0,99	0,12	0,13	0,18	0,15	0,72	0,661	0,46
Cs	0,0084	0,0082	0,09	0,01	0,022	0,019	0,04	0,06	0,075	0,042
Dy	0,009	0,009	0,066	0,006	0,011	0,011	0,01	0,049	0,052	0,031
Er	0,005	0,004	0,036	0,003	0,005	0,0069	0,005	0,024	0,026	0,015
Eu	0,004	0,002	0,018	0,004	0,002	0,001	0,003	0,017	0,015	0,0069
Ga	0,027	0,049	0,296	0,078	0,044	0,069	0,065	0,202	0,21	0,15
Gd	0,007	0,0082	0,092	0,008	0,0102	0,019	0,012	0,071	0,069	0,049
Ge	0,001	0,017	0,029	0,016	0,002	0,0087	0,003	0,028	0,021	0,015
Hf	0,002	0,0022	0,035	0,003	0,0077	0,015	0,006	0,028	0,018	0,018
Ho	0,005	0,005	0,012	0,001	0,006	0,007	0,002	0,009	0,01	0,0053
La	0,012	0,04	0,51	0,06	0,065	0,086	0,07	0,34	0,346	0,23
Lu	0,001	0,001	0,006	0,001	0,002	0,003	0,001	0,004	0,004	0,0025
Nb	0,0027	0,012	0,208	0,017	0,017	0,029	0,024	0,133	0,082	0,06
Nd	0,012	0,047	0,422	0,046	0,08	0,11	0,061	0,315	0,327	0,28
Pr	0,0024	0,0086	0,11	0,013	0,015	0,021	0,016	0,083	0,078	0,054
Rb	24,1	3,18	7,1	21,5	9,5	5,68	27,66	7,46	7,36	3,39
Sb	0,014	0,011	0,068	0,032	0,023	0,031	0,061	0,034	0,021	0,019
Sc	0,009	0,002	0,72	0,65	0,84	0,92	0,54	0,32	0,62	0,51
Sm	0,004	0,012	0,094	0,01	0,017	0,047	0,011	0,063	0,069	0,045
Sn	0,037	0,03	0,4	1,354	0,33	0,42	0,46	2,149	2,86	1,27
Sr	27,6	59,9	117,69	156,78	81,6	65,2	24,95	33,51	157,9	17,1
Tb	0,004	0,004	0,013	0,001	0,006	0,005	0,002	0,01	0,01	0,0057
Th	0,003	0,0045	0,126	0,011	0,016	0,016	0,021	0,11	0,105	0,068

Окончание таблицы 1

Элемент Element	Цветки пижмы обыкновенной Common linden flowers	Цветки липы сердцевидной Heart-shaped flowers	Листья подорожника большого Big plantain leaves	Листья крапивы двудомной Nettle dioecious leaves	Трава тысячелистника обыкновенного Millennial herb	Трава пустырника пятилопастного Five-bladed dummy grass	Трава полыни горькой Bitter wormwood grass	Трава горца птичьего Mountain bird Grass	Корни лопуха обыкновенного Burdock common roots	Корни одуванчика лекарственного Dandelion medicine roots
Ti	8,97	11,6	64,5	3,26	12,5	19,2	9,52	55,32	36,75	26,6
Tl	0,0042	0,0024	0,0095	0,0074	0,0032	0,0069	0,0016	0,0134	0,015	0,0105
Tm	0,001	0,001	0,006	0,001	0,004	0,003	0,001	0,004	0,004	0,004
Ta	0,0005	0,0004	0,01	0,008	0,001	0,0017	0,002	0,014	0,004	0,0042
Te	0,003	0,001	0,057	0,001	0,061	0,053	0,004	0,4	0,033	0,041
U	0,002	0,0034	0,037	0,003	0,0052	0,0069	0,016	0,03	0,073	0,019
W	0,0052	0,0068	0,12	0,04	0,0098	0,0096	0,15	0,06	0,023	0,025
Y	0,006	0,022	0,367	0,045	0,043	0,069	0,054	0,249	0,251	0,17
Yb	0,001	0,001	0,033	0,002	0,005	0,005	0,005	0,023	0,024	0,016
Zr	0,035	0,103	2,009	0,134	0,21	0,36	0,257	1,231	0,779	0,61
Итого Total	79,80	169,33	1598,68	343,82	231,50	354,37	211,79	984,83	1284,11	508,76

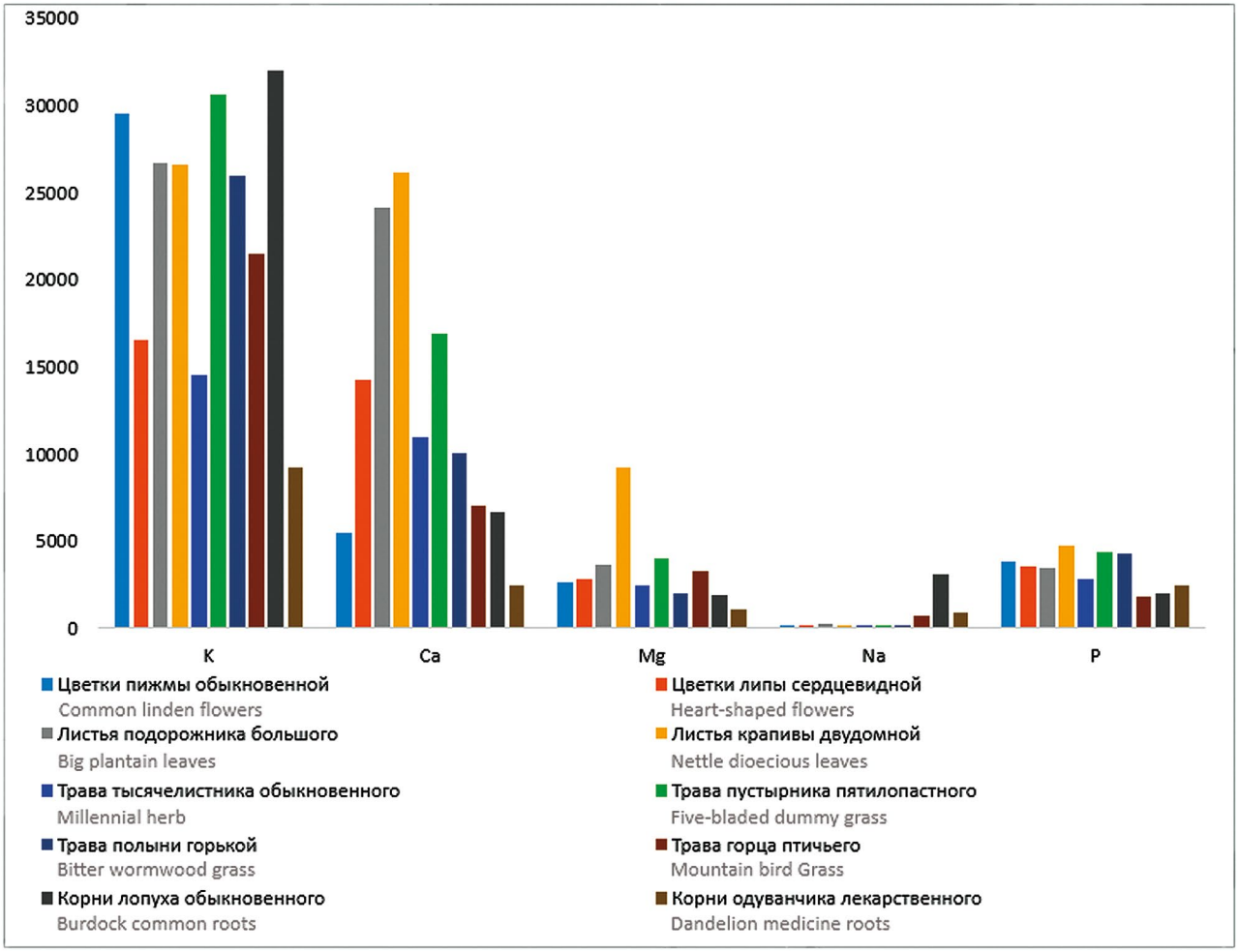


Рисунок 1. Содержание макроэлементов, мкг/г

Figure 1. Content of macroelements, μg/g

Общее определенное содержание элементов в изучаемых видах ЛРС варьирует от 1,91 до 7,68 % в пересчете на сухое сырье, наиболее богатый минеральный состав отмечен для травы пустырника пятилопастного, листьев крапивы двудомной и подорожника большого (более 50 мг/г) (см. таблица 1).

Изучаемые виды ЛРС в наибольшей степени (более 84 %) накапливают макроэлементы, что объясняется высокой биологической потребностью в них растений (см. таблица 1, рисунок 1). Наибольшие концентрации калия (более 30 мг/г) выявлены в траве пустырника пятилопастного и корнях лопуха обыкновенного (см. таблица 1, рисунок 1). Лидерами по содержанию кальция (более 20 мг/г) являются листья подорожника большого и крапивы двудомной. Резко выделяющейся на общем фоне высокой концентрацией натрия (более 3 мг/г) обладают корни лопуха обыкновенного. Лидером по содержанию магния являются листья крапивы двудомной (более 9 мг/г). Наибольшие концентрации фосфора (более 4 мг/г) отмечены в листьях крапивы двудомной, травах полыни горькой и пустырника пятилопастного.

Эссенциальные микроэлементы в наибольшей степени накапливаются в листьях крапивы двудомной (более 9 мг/г), для остальных видов ЛРС данный показатель составил менее 2,4 мг/г. Из эссенциальных микроэлементов в наибольшей степени всеми изучаемыми видами ЛРС аккумулируется кремний, варьируя от 1,01 мг/г до 9,0 мг/г. Лидером по содержанию данного элемента являются листья крапивы двудомной. Также высоким оказалось содержание железа: в наибольшей степени оно присутствовало в листьях подорожника большого (более 0,7 мг/г), наименьшая концентрация отмечена для цветков пижмы обыкновенной – около 0,06 мг/г. По содержанию марганца наибольшие результаты (более 0,06 мг/г) получены для травы пустырника пятилопастного и листьев крапивы двудомной. Цинк эффективно концентрировался в корнях изучаемых растений – 30 мкг/г и более.

Относительно высокое содержание молибдена отмечено в листьях крапивы двудомной (более 7 мкг/г), меди – в траве полыни горькой (более 12 мкг/г), лития – в траве тысячелистника обыкновенного (более 1,6 мкг/г). Кобальт и хром активно накапливаются в корнях изучаемых растений (более 3 мкг/г), ванадий –в траве горца птичьего и корнях лопуха обыкновенного (более 3 мкг/г), селен – в листьях крапивы двудомной и корнях лопуха обыкновенного (более 0,3 мкг/г).

Содержание нормируемых в ЛРС токсичных микроэлементов не превышает требований Государственной фармакопеи (ГФ). Наибольшая концентрация свинца выявлена в корнях одуванчика лекарственного (1,95 мкг/г), ртути – в листьях крапивы двудомной (0,06 мкг/г). Мышьяк эффективнее всего накапливался в траве полыни горькой и листьях подорожника большого (более 0,3 мкг/г), а кадмий – в корнях лопуха обыкновенного и траве горца птичьего (более 0,05 мкг/г).

Высокое содержание в ЛРС отмечено для стронция, который в наибольшей степени аккумулируется в корнях лопуха обыкновенного, листьях крапивы двудомной, листьях подорожника большого (более 0,1 мг/г). Титан наиболее эффективно накапливается в листьях подорожника большого и траве горца птичьего (более 0,05 мг/г). Наибольшая концентрация бария выявлена в листьях подорожника большого (более 0,14 мг/г).

Наиболее высокое содержание рубидия выявлено в цветках пижмы обыкновенной, траве полыни горькой, листьях крапивы двудомной (более 0,02 мг/г). В листьях подорожника большого накапливается относительно высокое количество тория (0,12 мкг/г) и циркония (более 2 мкг/г). Вольфрам эффективнее всего накапливается в траве полыни горькой и листьях подорожника большого (более 0,12 мкг/г); олово – в траве горца птичьего и корнях лопуха обыкновенного (более 2 мкг/г), а также в корнях одуванчика лекарственного и листьях крапивы двудомной (1,27–1,35 мкг/г); иттрий – в корнях одуванчика лекарственного, листьях подорожника большого, траве горца птичьего (более 0,25 мкг/г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали сложный макро- и микроэлементный состав изучаемого ЛРС, что может быть использовано в медицинской и фармацевтической практике создания фитопрепаратов и биологически активных добавок для коррекции физиологических норм содержания элементов в организме человека. В каждом растительном образце количественно определено 59 элементов. Содержание общего элементного комплекса в изучаемых видах ЛРС варьирует от 1,91 до 7,68 % в пересчете на сухое сырье. Наиболее количественно богатый элементный состав отмечен для травы пустырника пятилопастного, листьев крапивы двудомной и подорожника большого (более 50 мг/г). Изучаемые виды ЛРС в наибольшей степени (более 84 %) накапливают макроэлементы. Эссенциальные микроэлементы в наибольшей степени накапливаются в листьях крапивы двудомной (более 9 мг/г). Из эссенциальных микроэлементов в наибольшей степени всеми изучаемыми видами сырья аккумулируется кремний и железо. Содержание нормируемых токсичных микроэлементов не превышает требований Государственной фармакопеи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попов А. И. Фронтальный элементный анализ цветков пижмы. *Фармация*. 1993;32(1):51–53.
2. Попов А. И. Фронтальный элементный анализ листьев подорожника большого. *Химико-фармацевтический журнал*. 1993;11:50–52.
3. Попов А. И. Минеральные вещества травы горца птичьего. *Вопросы питания*. 1994;1(2):38–39.

4. Hill C. H., Matrone G. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Federation Proceedings*. 1970;29(4):1474–1481.
5. Li J., Assmann S. M. Mass Spectrometry. An Essential Tool in Proteome Analysis. *Plant Physiology*. 2000;123(3):807–810.
6. Wada O., Yanagisawa H. Trace elements, with special reference to the usefulness and safety of zinc. *Medicine and Drug Journal*. 1997;33(12):126–134.
7. Скальный А. В., Рудаков И. А. Биоэлементология – новый термин или новое научное направление? *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2005;2:4–8.
8. Скальный А. В. Микроэлементы: бодрость, здоровье, долголетие. Москва: Перо; 2019. 294 с.
9. Скальный А. В., Скальная М. Г., Киричук А. А., Тиньков А. А. Медицинская элементология. Москва: Наука; 2021. 199 с.
10. Гравель И. В., Иващенко Н. В., Самылина И. А. Микроэлементный состав спазмолитического сбора и его компонентов. *Фармация*. 2011;1:9–11.
11. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Сливкин А. И., Сорокина А. А. Сравнительное изучение минерального комплекса травы горца почечуйного (*Polygonum persicaria* L.) и горца войлочного (*Persicaria tomentosa* (Schrank) E.P. Bicknell). *Микроэлементы в медицине*. 2019;20(1):35–42. DOI: 10.19112/2413-6174-2019-20-1-35-42.
12. Рудая М. А., Тринеева О. В., Сливкин А. И. Исследование элементного состава плодов облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) различных сортов. *Микроэлементы в медицине*. 2018;19(3):49–59. DOI: 10.19112/2413-6174-2018-19-3-49-59.
13. Куркин В. А. Фармакогнозия. Самара: Офорт; 2004. 1179 с.
14. Баяндина И. И., Загуская Ю. В. Взаимосвязь вторичного метаболизма и химических элементов в лекарственных растениях. *Сибирский медицинский журнал*. 2014;8:107–111.
15. 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.
16. Дьякова Н. А. Накопление тяжелых металлов цветками липы сердцевидной, произрастающей в агро- и урбоэкосистемах Воронежской области. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*. 2020;5:70–79. DOI: 10.17076/eco1150.
17. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П. Оценка содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье Центрального Черноземья и их влияния на накопление биологически активных веществ. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(6):49–53. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-6-49-53.
18. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Чупандина Е. Е., Гапонов С. П. Выявление допустимых зон заготовки лекарственного растительного сырья вблизи транспортных магистралей. *Химия растительного сырья*. 2020;4:179–186. DOI: 10.14258/jcprm.2020047609.
19. Дьякова Н. А., Самылина И. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Мындра А. А. Анализ взаимосвязи между накоплением поллютантов и основных биологически активных групп веществ в лекарственном растительном сырье на примере травы горца птичьего (*Polygonum aviculare* L.) и листьев подорожника большого (*Plantago major* L.). *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(6):25–28.
20. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XIV. Том 4. М.: ФЭМБ; 2018. 1883 с.

REFERENCES

1. Popov A. I. Frontal elemental analysis of tansy flowers. *Pharmacy*. 1993;32(1):51–53. (In Russ.)
2. Popov A. I. Frontal elemental analysis of plantain leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1993;11:50–52. (In Russ.)
3. Popov A. I. Mineral substances of the herb mountaineer bird. *Nutrition issues*. 1994;1(2):38–39. (In Russ.)
4. Hill C. H., Matrone G. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Federation Proceedings*. 1970;29(4):1474–1481.
5. Li J., Assmann S. M. Mass Spectrometry. An Essential Tool in Proteome Analysis. *Plant Physiology*. 2000;123(3):807–810.
6. Wada O., Yanagisawa H. Trace elements, with special reference to the usefulness and safety of zinc. *Medicine and Drug Journal*. 1997;33(12):126–134.
7. Skalny A. V, Rudakov I. A. Bioelementology – a new term or a new scientific direction? *Bulletin of the Orenburg State University*. 2005;2:4–8. (In Russ.)
8. Skalny A. V. Trace elements: cheerfulness, health, longevity. Moscow: Pero; 2019. 294 p. (In Russ.)
9. Skalny A. V., Skalnaya M.G., Kirichuk A.A., Tinkov A.A. Medical elementology. Moscow: Nauka; 2021.199 p. (In Russ.)
10. Gravel I. V., Ivashchenko N. V., Samylina I. A. Trace element composition of antispasmodic collection and its components. *Pharmacy*. 2011;1:9–11. (In Russ.)
11. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Slivkin A. I., Sorokina A. A. Comparative study of the mineral complex *Polygonum persicaria* L. and *persicaria tomentósa* (Schrank) E.P. Bicknell). *Trace Elements in Medicine.* 2019;20(1):35–42. (In Russ.) DOI: 10.19112/2413-6174-2019-20-1-35-42.
12. Rudaya M. A., Trineeva O. V., Slivkin A. I. Research of element composition of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruits of various cultivars. *Trace Elements in Medicine.* 2018;19(3):49–59. (In Russ.) DOI: 10.19112/2413-6174-2018-19-3-49-59.
13. Kurkin V. A. *Farmakognoziya* [Pharmacognosy]. Samara: Ofort; 2004. 1179 p. (In Russ.)
14. 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.)
15. Korolyov A. S., Gladyshev A. A., Yutkina I. S. Features of the accumulation of bioelements in the aerial part of *Artemisia absinthium* L. in the sludge field of the cryolite plant. *News of the Orenburg State Agrarian University*. 2014;5(49):159–161. (In Russ.)
16. Dyakova N. A. Accumulation of heavy metals and arsenic in flowers of the small–leaved lime growing in agricultural and urban ecosystems of the Voronezh region. *Proceedings of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences*. 2020;5:70–79. (In Russ.) DOI: 10.17076/eco1150.
17. D'yakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P. Assessment of maintenance of radionuclides in medicinal vegetable raw materials of the central black earth and their influence on accumulation of biologically active agents. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2020;54(6): 49–53. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-6-49-53.
18. Dyakov N. A., Slivkin A. I., Chupandina Y. Y., Gaponov S. P. Identification of permissible areas of preparation of medicinal vegetable raw materials near transport lines. *Chemistry of plant raw materials.* 2020;4:179–186. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2020047609.
19. D'yakova N. A., Samylina I. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P., Myndra A. A. Analysis of relationship between the accumulation of pollutants and main biologically active groups of substances in medicinal plant raw materials by example of the herbs of knotweed (*Polygonum aviculare* L.) and the leaves of waybread (*Plantago major* L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2015;49(6):25–28. (In Russ.)
20. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Edition XIV. Volume 4. Moscow: FEMB; 2018. 1883 p. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-202-211
УДК 611.127.018.6:616.127-002.17-08

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Улучшение структуры миокарда после развившегося фиброзного перерождения в условиях применения аллогенного биоматериала

А. И. Лебедева[1], С. А. Афанасьев[2], Е. М. Гареев[1], Д. С. Кондратьева[2], Л. А. Мусина[1], С. В. Попов[2], А. В. Прусаков[3], А. В. Яшин[3], В. С. Понамарёв[3]✉, В. Д. Раднатаров[4]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (БГМУ), 450077, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3
[2] Научно-исследовательский институт кардиологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (НИИ кардиологии Томского НИМЦ), 634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, д. 111а
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (СПбГУВМ), 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Бурятская государственная сельскохозяйственная академия имени В. Р. Филлипова» (ФГБОУ ВО Бурятская ГСХА), 670024, Россия, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Пушкина, д. 8

✉ **Контактное лицо:** Понамарёв Владимир Сергеевич. **E-mail:** psevdopyos@mail.ru

ORCID: А. И. Лебедева – https://orcid.org/0000-0002-9170-2600; С. А. Афанасьев – https://orcid.org/0000-0001-6066-3998; Е. М. Гареев – https://orcid.org/0000-0002-6561-0892; Д. С. Кондратьева – https://orcid.org/0000-0002-4004-2497; Л. А. Мусина – https://orcid.org/0000-0003-1237-9284; С. В. Попов – https://orcid.org/0000-0002-9050-4493; А. В. Прусаков – https://orcid.org/0000-0001-5582-5155; А. В. Яшин – https://orcid.org/0000-0002-3614-4730; В. С. Понамарёв – https://orcid.org/0000-0002-6852-3110; В. Д. Раднатаров – https://orcid.org/0009-0006-5115-7501.

Статья поступила: 28.11.2022 **Статья принята в печать:** 02.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Вопрос о возможности восстановления постишемического миокарда остается актуальным.

Цель. Целью исследования явилось изучение влияния диспергированного децеллюляризированного аллогенного внеклеточного матрикса (аллогенного биоматериала, ДАБ) на развившееся фиброзное перерождение миокарда, а также раскрытие возможных механизмов клеточной регенерации.

Материалы и методы. Мышечная стенка сердца крыс была подвергнута криодеструкции. Через 45 суток крысам основной группы в область поражённого миокарда интрамиокардиально вводили суспензию аллогенного биоматериала, а крысам контрольной группы – физиологический раствор.

Результаты и обсуждение. В опытной группе происходил регресс сформировавшейся волокнистой соединительной ткани, хемоаттракция прогениторных клеток, их дифференциация и интеграция в миокард. Толщина мышечной части стенки левого желудочка была на три порядка выше, чем в контрольной группе.

Заключение. Анализ результатов исследования свидетельствует о том, что сердце у взрослых млекопитающих обладает мощным регенеративным резервом. Вполне вероятно, что на основе использования ДАБ может быть разработан протокол, позволяющий восстанавливать сердечную мышцу даже в условиях уже развившегося фиброзного перерождения.

Ключевые слова: экстрацеллюлярный межклеточный матрикс, кардиомиогенные клетки, аллогенный биоматериал, рубец, миокард, регенерация

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

Вклад авторов. А. И. Лебедева, Е. М. Гареев и Л. А. Мусина – предоставление аллогеного биоматериала, разработка методики исследования, обзор литературы. С. А. Афанасьев, Д. С. Кондратьева, С. В. Попов – выполнение гистологического исследования проб, предоставление фотографий, анализ результатов. А. В. Прусаков, А. В. Яшин, В. С. Понамарёв – проведение эксперимента, отбор проб, оформление статьи, общение с редакцией. В. Д. Раднатаров– написание статьи, обзор литературы.

Благодарность. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 056-00124-21-00, утвержденного 23.12.2020.

Для цитирования: Лебедева А. И., Афанасьев С. А., Гареев Е. М., Кондратьева Д. С., Мусина Л. А., Попов С. В., Прусаков А. В., Яшин А. В., Понамарёв В. С., Раднатаров В. Д. Улучшение структуры миокарда после развившегося фиброзного перерождения в условиях применения аллогенного биоматериала. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):202–211. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-202-211

Improvement of Myocardial Structure after Developed Fibrous Degeneration Under the Use of Allogenic Biomaterial

Anna I. Lebedeva[1], Sergey A. Afanasiev[2], Evgeny M. Gareev[1], Dina S. Kondratieva[2], Lyalya A. Musina[1], Sergey V. Popov[2], Alexey V. Prusakov[3], Anatoliy V. Yashin[3], Vladimir S. Ponamarev[3]✉, Vladimir D. Radnatarov[4]

© Лебедева А. И., Афанасьев С. А., Гареев Е. М., Кондратьева Д. С., Мусина Л. А., Попов С. В., Прусаков А. В., Яшин А. В., Понамарёв В. С., Раднатаров В. Д., 2023
© Lebedeva A. I., Afanasiev S. A., Gareev E. M., Kondratieva D. S., Musina L. A., Popov S. V., Prusakov A. V., Yashin A. V., Ponamarev V. S., Radnatarov V. D., 2023

[1] Bashkir State Medical University (BSMU), 3, Lenina str., Ufa, Republic of Bashkortostan, 450077, Russia
[2] Cardiology Research Institute, Federal State Budgetary Scientific Institution "Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences", 111a, Kievskaya str., Tomsk, 634012, Russia
[3] Saint-Petersburg State University of Veterinary Medicine, 5, Chernigovskaya str., Saint Petersburg, 196084, Russia
[4] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education "Buryat State Agriculture Academy by V. R. Philippov"; FSBEI HPE Buryat SAA, 8, Pushkina str., Ulan-Ude, Republic of Buryatia, 670024, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir S. Ponamarev. **E-mail:** psevdopyos@mail.ru

ORCID: Anna I. Lebedeva – https://orcid.org/0000-0002-9170-2600; Sergey A. Afanasiev – https://orcid.org/0000-0001-6066-3998; Evgeny M. Gareev – https://orcid.org/0000-0002-6561-0892; Dina S. Kondratieva – https://orcid.org/0000-0002-4004-2497; Lyalya A. Musina – https://orcid.org/0000-0003-1237-9284; Sergey V. Popov – https://orcid.org/0000-0002-9050-4493; Alexey V. Prusakov – https://orcid.org/0000-0001-5582-5155; Anatoliy V. Yashin – https://orcid.org/0000-0002-3614-4730; Vladimir S. Ponamarev – https://orcid.org/0000-0002-6852-3110; Vladimir D. Radnatarov – https://orcid.org/0009-0006-5115-7501.

Received: 28.11.2022 **Revised:** 02.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. The question of the possibility of recovery of postischemic myocardium remains relevant.

Aim. The aim of the study was to study the effect of dispersed decellularized allogeneic extracellular matrix (allogeneic biomaterial, DAB) on the developed fibrous degeneration of the myocardium, as well as to reveal the possible mechanisms of cellular regeneration.

Materials and methods. The muscular wall of the heart of rats was subjected to cryodestruction. After 45 days, the rats of the main group were intramyocardially injected with a suspension of allogeneic biomaterialinto the area of the affected myocardium, and the rats of the control group were injected with saline.

Results and discussions. In the experimental group, there was a regression of the formed fibrous connective tissue, chemoattraction of progenitor cells, their differentiation and integration into the myocardium. The thickness of the muscular part of the wall of the left ventricle was three orders of magnitude higher than in the control group.

Conclusion. Analysis of the results of the study indicates that the heart in adult mammals has a powerful regenerative reserve. It is likely that, based on the use of DAB, a protocol can be developed that allows the restoration of the heart muscle even in conditions of already developed fibrous degeneration.

Keywords: extracellular extracellular matrix, cardiomyogenic cells, allogeneic biomaterial, scar, myocardium, regeneration

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 I. Lebedeva, Evgeny M. Gareev, Lyalya A. Musina – provision of allogeneic biomaterial, development of research methodology, literature review. Sergey A. Afanasiev, Dina S. Kondratieva, Sergey V. Popov – performing a histological examination of samples, providing photographs, analyzing the results. Alexey V. Prusakov, Anatoliy V. Yashin, Vladimir S. Ponamarev – conducting an experiment, sampling, designing an article, communicating with the editors. Vladimir D. Radnatarov – writing an article, literature review.

Acknowledgment. The work was carried out within the framework of State Assignment No. 056-00124-21-00, approved on December 23, 2020.

For citation: Lebedeva A. I., Afanasiev S. A., Gareev E. M., Kondratieva D. S., Musina L. A., Popov S. V., Prusakov A. V., Yashin A. V., Ponamarev V. S., Radnatarov V. D. Improvement of myocardial structure after developed fibrous degeneration under the use of allogenic biomaterial. *Drug development & registration*. 2023;12(3):202–211. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-202-211

ВВЕДЕНИЕ

Ремоделирование ишемически поврежденного миокарда, как правило, заканчивается развитием фиброза и приводит к хронической сердечной недостаточности [1]. Признано, что сердце является постмитотическим органом, в котором клеточная регенерация затруднительна [2]. Однако существует и противоположная точка зрения, где обсуждается возможность регенераторного клеточного потенциала [3–8]. С целью стимуляции восстановительных процессов в ишемически поврежденных органах используют различные методы: генно- и тканеинженерные конструкции, клеточную терапию, имплантацию экстрацеллюлярного матрикса, биопринтинг и т. д. [9–11]. Индукция эндогенной пролиферации кардиомиоцитов исследуется в последнее время как потенциальный подход к созданию миокарда *de novo*. Одним из перспективных подходов к реорганизации кардиосклеротических трансформаций является применение децеллюляризированных аллогенных биоматериалов (ДАБ), изготовленных на основе внеклеточного матрикса.

Целью данного исследования явилось изучение влияния аллогенного биоматериала на уже развившееся фиброзное перерождение миокарда, а также раскрытие возможных механизмов клеточной регенерации при использовании ДАБ в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар, массой 200–250 г. Животных содержали в условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Манипуляции с животными проводили, руководствуясь положениями приказа Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказ

Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755).

Было оказано криодеструктивное воздействие на миокард всех животных. Для этого животных наркотизировали (раствор золетила в дозе 1 мг/кг внутримышечно) и выполняли левостороннюю торакотомию. К верхушке сердца на 10 с прикладывали массивный металлический стилет, охлажденный до температуры жидкого азота. Рабочей поверхностью являлся плоский торец стилета диаметром 6 мм. Затем рану послойно зашивали [12]. Такое деструктивное воздействие обеспечивает получение у всех лабораторных животных практически одинаковых по объему и локализации очагов поражения (рисунок 1).

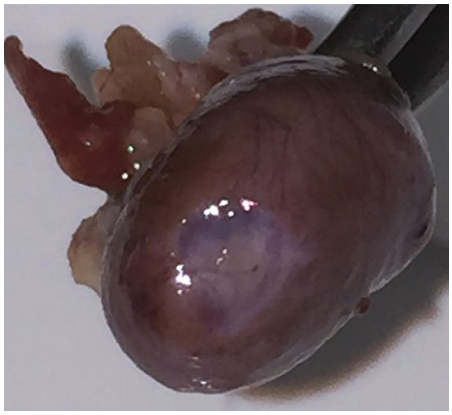


Рисунок 1. Зона криодеструкции миокарда через 45 суток после применения жидкого азота. Макропрепарат

Figure 1. Zone of myocardial cryodestruction 45 days after the application of liquid nitrogen. macropreparation

Животные были разделены на две группы – контрольную ($n = 40$) и основную ($n = 40$). Через 45 суток после криодеструкции при повторной торакотомии в основной группе в пограничные области фиброзного участка, сформировавшегося на месте криогенного некроза, вводили суспензию ДАБ. Каждому животному выполняли 6 интрамиокардиальных инъекций, содержащих 0,5 мг сухого вещества и объемом не более 10 мкл. Доза была выбрана в соответствии с ранее проведенными исследованиями (Лебедева и др., 2018). Суспензию ДАБ в 0,9%-м физиологическом растворе готовили непосредственно перед проведением инъекций. В качестве ДАБ использовали измельченную форму биоматериала Аллоплант® с размером частиц 50–80 мкм, разработанного в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ г. Уфы. Биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР № 87 901-87 от 22.07.1987 года. Для настоящего исследования биоматериал был изготовлен из экстрацеллюлярного матрикса сухожилий крыс. Животным контрольной группы вводили 0,9%-й физиологический раствор в том же объеме.

Через 3, 7, 14, 45 суток после введения ДАБ или физиологического раствора крыс выводили из эксперимента. На каждую точку исследования приходилось по 10 животных. Сердца животных, выведенных из эксперимента, фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), окрашивали их гематоксилином и эозином по Ван Гизону и по Маллори. Для иммуногистохимических исследований парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первых антител применяли MMP-9, Pecam-1, c-kit, Gata-4 в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), сердечный тропонин I тип 3 в разведении 1:150 (ООО «БелкиАнтитела», Россия). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Определяли толщину мышечной стенки левого желудочка.

Анализ осуществлялся с применением непараметрических (ранговых) методов – однофакторного дисперсионного анализа по Крускелу – Уоллесу и сравнения некоррелированных данных методом Манна – Уитни [13]. Использовались медианы (Me) и границы вариации (Min-Max). Построение диаграммы осуществляли в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологические исследования миокарда крыс контрольной группы, выведенных из эксперимента в различные сроки после введения физиологического раствора, не выявили значимых внутригрупповых различий. На рисунке 1 представлен типичный вид миокарда таких крыс. Определялась плотная волокнистая аваскулярная соединительная ткань. Выявлялись мышечные волокна, «запечатанные» коллагеновыми волокнами. В перифокальной зоне, на границе мышечной и плотной волокнистой соединительной ткани, определялись признаки интерстициального фиброза. Количество кровеносных сосудов было снижено, а капиллярные сети отсутствовали или были резко редуцированы.

Принципиально иначе выглядел миокард крыс основной группы, где плотная волокнистая соединительная ткань трансформировалась в рыхлую. Реактивная зона была представлена тонкими коллагеновыми волокнами с расширенными межволоконными пространствами, содержащими аморфное вещество.

При этом уже по прошествии 3 суток отмечалась выраженная макрофагальная инфильтрация пограничных участков. На рисунке 2, А видно, что центром «притяжения» для макрофагов в этот период являются частицы ДАБ. Именно вокруг них отмечалась наиболее выраженная концентрация этих клеток. Использование окраски по Хейлу показало, что в цитоплазме макрофагальных клеток присутствуют гликозаминогликаны (ГАГ) (рисунок 2, Б).

Для оценки изменения ангиогенного потенциала поврежденные участки миокарда были проанализированы на присутствие Pecam-1-позитивных клеток и разрастание недифференцированных кровеносных сосудов. В основной группе Pecam$^+$-клетки наблюдались в стенке сосудов, а также в виде сосудистых почек роста. Впервые выявление этих клеток становится возможным по прошествии семи суток после инъекции ДАБ (рисунок 3, А). Просветы недифференцированных сосудов были свободные и расширенные.

Эффективный рост гемокапилляров возможен только при соответствующем микроокружении, представленном продуктами биодеградации ДАБ в поврежденном миокарде. Мы исследовали экспрессию инфильтрирующими клетками фермента металлопротеиназы-9 (ММР-9), являющегося представителем целого семейства структурно связанных протеолитических ферментов. Оказалось, что в основной групе уже в ранние сроки (3 суток) инфильтрирующие ДАБ макрофаги были позитивны к данному ферменту. Фермент выявлялся как в цитоплазме клеток, так и в виде отложений на коллагеновых волокнах (рисунок 3, Б). Для животных, выведенных из эксперимента в период 7–14 суток, была

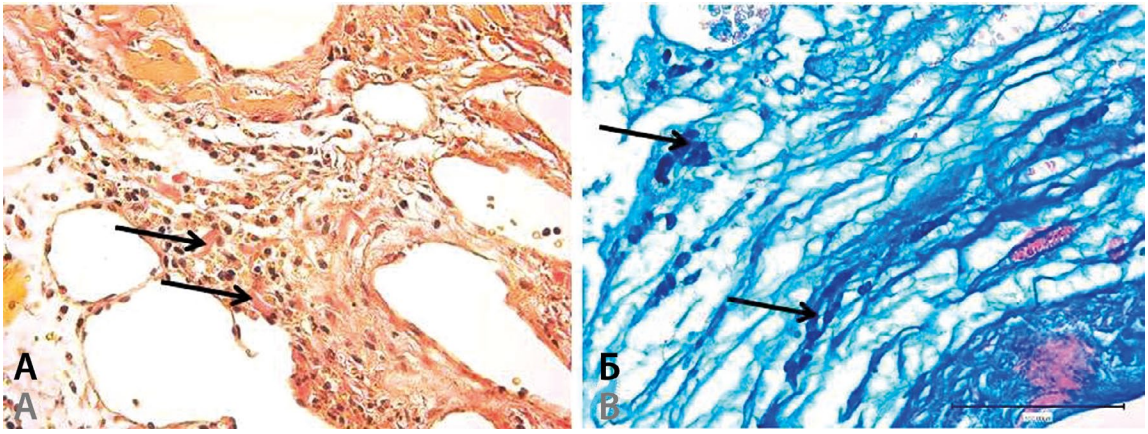


Рисунок 2. Клеточная реакция в ответ на введение ДАБ через 3 суток.

А – инфильтрация макрофагами частиц ДАБ (↑). Окраска по Ван Гизону; Б – Хейл-позитивная реакция макрофагов (↑). Окраска по Хейлу

Figure 2. Cellular response to DAB administration after 3 days.

A – infiltration of DAB particles by macrophages (↑). Coloring according to Van Gieson; B – Hale-positive reaction of macrophages (↑). Hale coloring

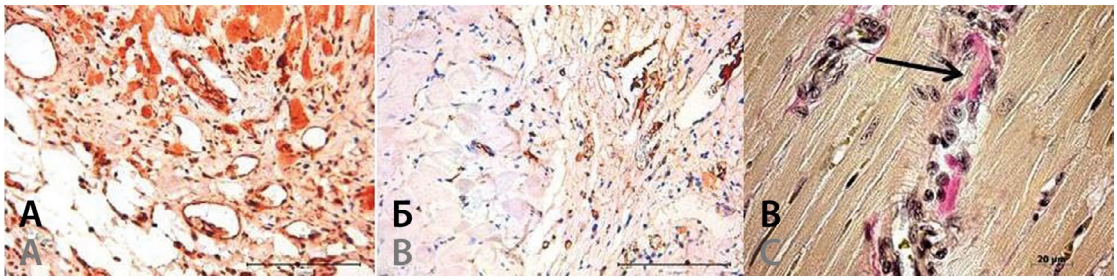


Рисунок 3. Реорганизация миокардиального рубца.

А – новообразованные гемокапилляры после введения ДАБ через 7 суток. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления Pecam$^+$ с докраской гематоксилином; Б – экспрессия ММР-9 через 3 суток после введения ДАБ в рубец. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления ММР-9 с докраской гематоксилином; В – фрагментация коллагеновых волокон (↑) макрофагами и фиброкластами. Окраска по Ван Гизону

Figure 3. Reorganization of the myocardial scar.

A – newly formed hemocapillaries after the introduction of DAB after 7 days. Indirect immunoperoxidase method for the detection of Pecam$^+$ with additional staining with hematoxylin; B – MMP-9 expression 3 days after DAB injection into the scar. Indirect immunoperoxidase method for the detection of MMP-9 with additional staining with hematoxylin; C – fragmentation of collagen fibers (↑) by macrophages and fibroclasts. Coloring according to Van Gieson

характерна экспрессия MMP-9, которая прямо пропорционально коррелировала с численностью макрофагальных клеток. Наряду с завершением резорбции и утилизацией аллогенного биоматериала снижалось количество макрофагов и, соответственно, содержание MMP-9.

В основной группе при исследовании подвергшихся фиброзному перерождению участков миокарда были обнаружены зоны с фрагментированными коллагеновыми волокнами (рисунок 3, В). Фрагменты волокон были набухшие, но сохраняли свои тинкториальные свойства – фуксинофилию. Возле них определялась макрофагально-фиброкластическая инфильтрация.

При исследовании состава клеточного инфильтрата, формирующегося в миокарде крыс после инъекции ДАБ, было обнаружено присутствие малодифференцированных c-kit$^+$/GATA-4$^+$-клеток (рисунок 4, А). Эти клетки выявлялись спустя 7 суток в реактивной зоне, граничащей с сохранившимся миокардом, и в субэпикардиальном пространстве. Клетки имели неправильную полиморфную форму. На электронограммах в цитоплазме этих клеток были видны многочисленные овальные митохондрии с параллельно ориентированными ламеллярными кристами и умеренно плотным матриксом. Определялись диссоциированные миофиламенты, на концах которых фиксировались осмиофильные гранулы гликогена, участвующие в сборке сократительных элементов. Обнаруживались полисомы и единичные рибосомы, а также мелкие везикулы и пиноцитозные пузырьки по периферии цитолеммы. Клетки не имели миофибрилл с поперечной исчерченностью. Однако между собой эти клетки были способны формировать вставочные диски (рисунок 4, Б).

Еще одной особенностью клеточного инфильтрата миокарда крыс основной группы было присутствие клеток, позитивных к сердечному тропонину I. Такие клетки выявлялись уже через 3 суток, где сердечный тропонин I локализовался в них в виде цитоплазматических гранул. К 7 суткам эти клетки приобретали удлиненные формы, имели малую форму, в их цитоплазме четко проявлялась поперечная исчерченность. Клетки были разрозненны и не образовывали между собой контактов. По прошествии 14 суток позитивные к сердечному тропонину I клетки образовывали между собой контакты и выявлялись в виде функционального синцития. Но ядерно-цитоплазматическое отношение было практически равно единице. Новые миоциты были малых размеров и имели одновекторное направление. К 45 суткам клетки увеличивались в размерах. Ядерно-цитоплазматическое отношение смещалось и становилось меньше единицы. Происходила гипертрофия клеток как концентрическая (утолщение миофибриллярных пучков), так и эксцентрическая (удлинение кардиомиоцитов за счет присоединения саркомеров). Клетки имели центрально расположенные ядра и концентрировались в виде кластеров (рисунок 5).

Морфометрический анализ показал, что через 45 суток в основной группе толщина мышечной части стенки левого желудочка оказалась значимо (Z = 2,6, p < 0,008) выше, чем в контрольной: Me = 0,906 мм [0,730–1,580] против Me = 0,330 мм [0,222–0,455] (рисунок 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях данной экспериментальной модели хронической фазы инфаркта миокарда была рассмотрена способность ДАБ инициировать регресс фиб-

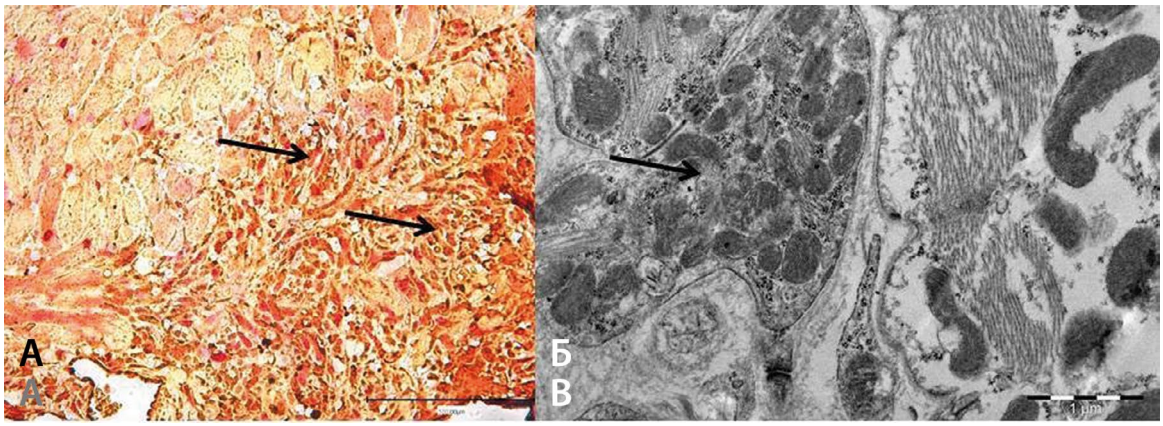


Рисунок 4. Малодифференцированные кардиомиогенные клетки через 7 суток после введения ДАБ в рубец.

А – c-kit/GATA-4. Двойной непрямой иммунопероксидазный метод выявления c-kit/GATA-4 с докраской гематоксилином; Б – кардиомибласты. Электронограмма

Figure 4. Poorly differentiated cardiomyogenic cells 7 days after DAB injection into the scar.

A – s-set/GATA-4. Double indirect immunoperoxidase chain c-kit/GATA-4 with pre-staining hematoxylin; B – cardiomyoblasts. Electrongram

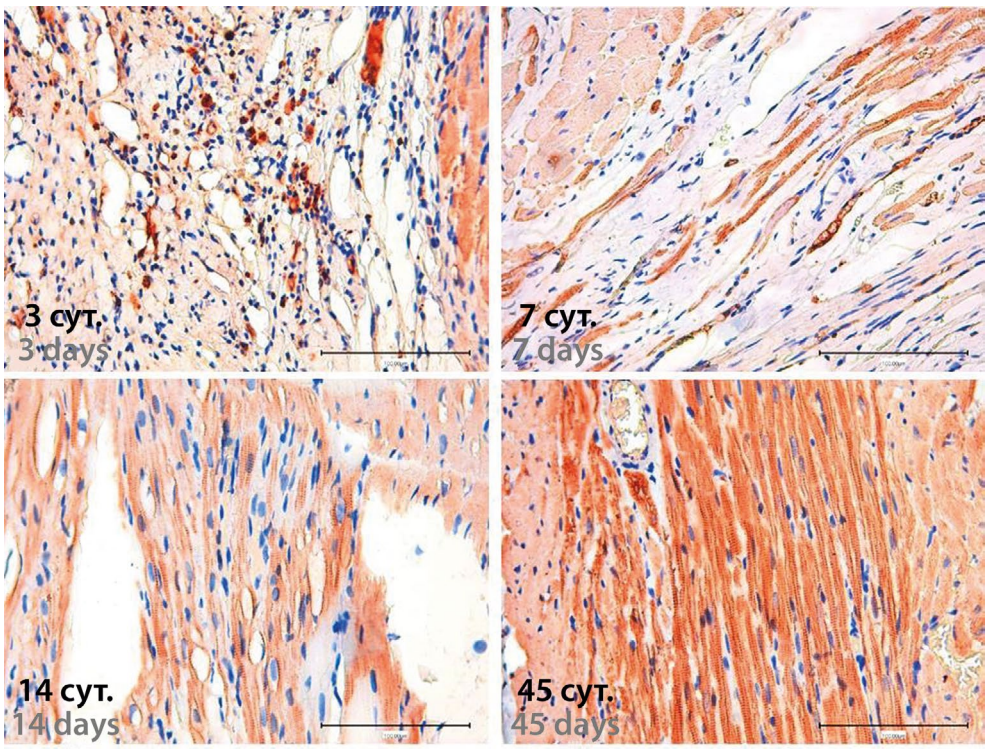


Рисунок 5. Сердечный тропонин I после введения ДАБ в различные сроки. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления сердечного тропонина I с докраской гематоксилином

Figure 5. Cardiac troponin I after DAB administration at various times. Indirect immunoperoxidase method for the detection of cardiac troponin I with additional staining with hematoxylin

розного перерождения миокарда, развившегося в результате криодеструкции. На основании проведенных морфометрических исследований можно сказать, что интрамиокардиальные инъекции суспензии аллогенного биоматериала в зоне кардиосклероза способствовали утолщению мышечной части стенки левого желудочка. Такой эффект является результатом целого комплекса изменений, инициированных присутствием на границе сохранного и пораженного миокарда частиц ДАБ.

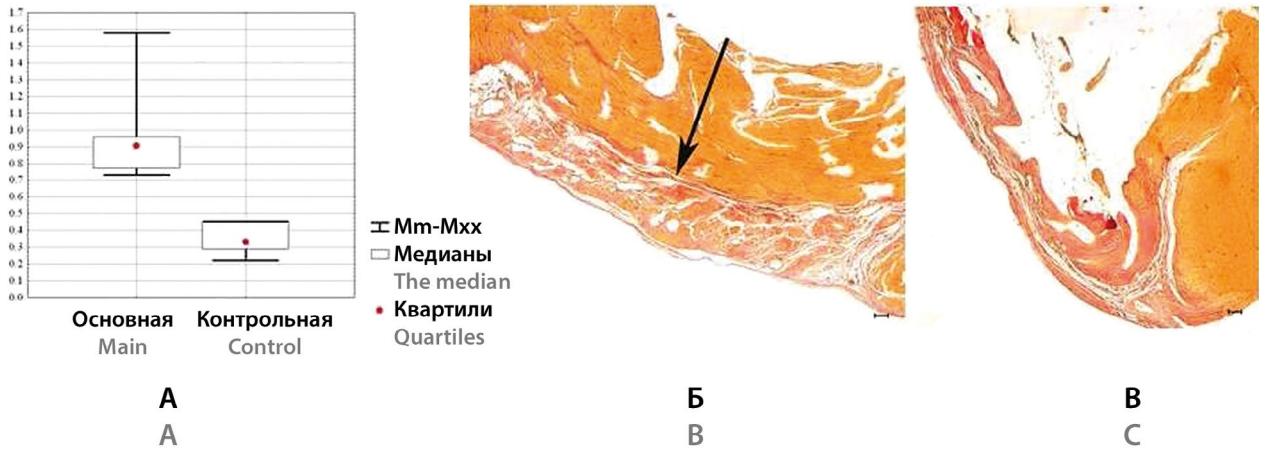


Рисунок 6. Толщина мышечной стенки в основной и контрольной группах крыс через 45 суток после введения физ. раствора.

А – по оси абсцисс – экспериментальные группы. По оси ординат – толщина мышечной стенки миокарда (мм); Б – толщина мышечной части стенки левого желудочка сердца через 45 суток после введения ДАБ (основная группа); В – стенка левого желудочка сердца через 45 суток после введения физ. раствора (контрольная группа). Окраска по Ван Гизону

Figure 6. The thickness of the muscle wall in the main and control groups of rats 45 days after the introduction of physical. solution.

A – along the abscissa axis - experimental groups. On the y-axis - the thickness of the muscle wall of the myocardium (mm); B – the thickness of the muscular part of the wall of the left ventricle of the heart 45 days after the introduction of DAB (main group); C – the wall of the left ventricle of the heart 45 days after the introduction of physical. solution (control group). Coloring according to Van Gieson

В нашем исследовании реакция миокарда на имплантацию ДАБ выражалась в активной макрофагальной инфильтрациии, особенно возле его частиц. Эта реакция в основной группе наблюдалась уже в ранние сроки и отсутствовала в контрольной группе. Известно, что макрофаги – гетерогенная популяция, включающая различные фенотипы клеток. Они могут проявлять свои функции в зависимости от течения раневого процесса и влияния прочих экзогенных факторов: быть классически активированными (провоспалительными) – М1 и альтернативно активированными (противовоспалительными) – М2 [14]. В нашем исследовании на фоне инъекции ДАБ показано присутствие макрофагов, в цитоплазме которых содержатся гликозаминогликаны. Присутствие таких ГАГ$^+$-макрофагов было зафиксировано и в ранее проведенных исследованиях, выполненных с использованием ДАБ. Отмечалось, что эти клетки имеют большое значение в ремоделировании грануляционной ткани, регуляции гомеостаза и формировании зрелого регенерата, который организуется на месте биодеградируемого биоматериала [3–6]. Ранее нами было показано, что инъекции суспензии ДАБ, выполненные в связи с воспалительно-деструктивными и дегенеративными заболеваниями различных тканей и органов, включая острую и подострую фазу ишемического поражения миокарда, ингибируют развитие фиброза в реактивных зонах [3, 4]. При этом также отмечалось присутствие макрофагов, содержащих гликозаминогликаны. Известно, что гликозаминогликаны, связываясь с белковой составляющей, формируют протеогликаны, а эти комплексы играют основную роль в передаче сигналов от внеклеточного матрикса к клетке и служат своеобразными рецепторами клетки к адгезивным молекулам внеклеточного матрикса [15–18]. Именно с ними связывают способность клетки взаимодействовать с микросредой, обеспечивая межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия. Кроме этого, они участвуют в гидратации тканей, фибриллообразовании коллагена, модулируют эффекты факторов роста, цитокинов, влияют на пролиферацию, адгезию клеток, репаративные процессы [19].

Хорошо известно, что функциональная состоятельность любой ткани во многом определяется в том числе и ее адекватным кровоснабжением. Реализация репаративного потенциала любого органа также возможна лишь при его достаточной оксигенации. В нашем исследовании о повышении васкуляризации свидетельствует факт появления Pecam-1-позитивных клеток и разрастания недифференцированных кровеносных сосудов. Известно, что Pecam-1 в высокой степени экспрессируется на эндотелиальных клетках [20]. Эти явления наблюдались только в миокарде основной группы животных и после инъекций ДАБ. Обнаруженный в этом исследовании факт стимуляции неоангиогенеза хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о более интенсивном формировании нового микроциркуляторного русла после интрамиокардиальных инъекций ДАБ при экспериментальном инфаркте миокарда [21].

Одна из сложностей рассматриваемого вопроса заключается в том, что приходится воздействовать уже на состоявшееся фиброзное перерождение сердечной мышцы. Именно это неблагоприятное окружение препятствует реализации программы органоспецифичной регенерации. Проведенные исследования показали, что росту гемокапилляров предшествует трансформация плотной волокнистой соединительной ткани в рыхлую. Показано, что этому процессу способствует разрушение толстых пучков коллагеновых волокон под воздействием определенных факторов, например активации металлопротеиназ [22]. Такой механизм, вероятно, вполне мог реализоваться и в нашем исследовании. Это предположение хорошо согласуется с тем, что уже по прошествии 3 суток после инъекции ДАБ выявлялись участки с выраженной трансформацией плотной волокнистой соединительной ткани в рыхлую. При этом была зафиксирована нарастающая экспрессия ММР-9. Протеолитический фермент ММР-9 относится к коллагеназам и отвечает за деструкцию коллагена, а именно этот белок составляет основу ДАБ и соединительной ткани, формирующейся на месте пораженного миокарда. Вероятно, этим объясняется резорбция частиц биоматериала и трансформация плотной волокнистой соединительной ткани в рыхлую. Важным является то обстоятельство, что, согласно полученным данным, в резорбции коллагена были задействованы как макрофаги, так и фибробластические клетки – фиброкласты. Известно, что фиброкласты участвуют в резорбции самих коллагеновых волокон, а макрофаги утилизируют деструктивные, лизированные, разрушенные волокна в виде детрита [23]. Этот результат свидетельствует о том, что при использовании ДАБ происходит, вероятно, максимально полная активация эндогенных механизмов, направленных на регресс фиброзных образований, возникших на месте повреждения миокарда.

Говоря о желательности формирования органоспецифичного регенерата, нужно представлять, какие клетки способны составить его основу. Этот вопрос остается открытым. В проведенном исследовании были рассмотрены наиболее известные маркеры (C-kit и GATA-4) региональных прогениторных клеток. При этом тот факт, что антитела C-kit и GATA-4 имеют разную внутриклеточную локализацию, позволяет проводить их комбинированную идентификацию. В настоящее время C-kit$^+$-клетки не рассматриваются как возможные предшественники кардиомиобластов [7]. Однако признается, что GATA-4 выполняет функцию ключевого регулятора кардиальных генов,

участвует в контроле сборки саркомеров в кардиомиоцитах и в их дифференцировке [24]. В связи с этим c-kit+/GATA-4+-клетки можно отнести к малодифференцированным кардиомиогенным формам и коммитированным клеткам, что подтверждается их ультраструктурными особенностями – высокой энергоемкостью, белок- и углеводсинтетической активностью, синтезом диссоциированных филаментов [25]. Помимо этого, были обнаружены и прослежены хронологические этапы дифференциации позитивных клеток к сердечному трононину I – кардиоспецифичному белку сокращающихся кардиомиоцитов [26].

Известно, что резидентные прогениторные клетки миокарда локализованы в стволовых нишах, в субэпикардиальном пространстве, не отрицается способность эпителиально-мезенхимальных переходов, а также хемоаттракция стволовых клеток из костного мозга [27]. Ранее выявлено, что ДАБ является аттрактантом мезенхимальных стволовых клеток $CD45^{-}/CD90^{+}$ [28]. Эти данные хорошо согласуются с представлением о том, что внеклеточный матрикс, как основной компонент ДАБ, влияет на фенотип и поведение клеток, их эпителиально-мезенхимальный переход или переход в эндотелии сосудов. Считается, что эти переходы определяют общность механизмов, работающих как в эмбриогенезе, так и при заживлении ран. Исходя из того, что в нашем исследовании $c\text{-}kit^{+}/GATA\text{-}4^{+}$-клетки были обнаружены уже по прошествии 3 суток и в непосредственной близости кардиомиоцитов, можно предположить, что источником выявленных скоплений кардиомиобластов являются клеточные ниши резидентных стволовых кардиомиогенных клеток. Это предположение не противоречит данным о том, что в сердце клеточные ниши расположены в зонах с низкой гемодинамической нагрузкой: в предсердиях и в верхушке сердца [29]. В нашем исследовании именно верхушка сердца и была подвергнута воздействию криодеструкции с последующими инъекциями суспензии ДАБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов исследования свидетельствует о том, что сердце у взрослых млекопитающих обладает мощным регенеративным резервом. И при восстановлении поврежденного миокарда нужно изменить эндогенную программу регенерации. При этом имплантация ДАБ обеспечивает хемоаттракцию макрофагов, способствующих резорбции плотных коллагеновых волокон и активации неоангиогенеза, а также появлению малодифференцированных кардиомиогенных клеток с их дальнейшей дифференцировкой в полноценные рабочие кардиомиоциты. Вполне вероятно, что на основе использования ДАБ может быть разработан протокол, позволяющий восстанавливать сердечную мышцу даже в условиях уже развившегося фиброзного перерождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Travers J. G., Kamal F. A., Robbins J., Yutzey K. E., Blaxall B. C. Cardiac fibrosis. *Circulation Research*. 2016;118(6):1021–1040. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.
2. Soonpaa M. H., Kim K. K., Pajak L., Franklin M., Field L. J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996;271(5):H2183–H2189. DOI: 10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2183.
3. Лебедева А. И. Биоматериал Аллоплант при регенерации миометрия рога матки экспериментальных животных – стимулятор макрофагов мезенхимного происхождения. *Биомедицина*. 2016;2:45–53.
4. Лебедева А. И., Муслимов С. А., Гареев Е. М., Попов С. В., Афанасьев С. А., Кондратьева Д. С. Экспериментальный кардиомиогенез в условиях применения различных доз аллогенного биоматериала. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018;165(6):753–756.
5. Лебедева А. И., Муслимов С. А., Гареев Е. М., Попов С. В., Афанасьев С. А. Стимуляция аутологичныхпрогениторных и коммитированных клеток в ишемически поврежденном миокарде. *Российский кардиологический журнал*. 2018;23(11):123–129.
6. Лебедева А. И., Муслимов С. А., Мусина Л. А., Гареев Е. М., Кадыров Р. З., Кондратьева Д. С., Афанасьев С. А., Попов С. В. Эффект интрамиокардиального введения аллогенного биоматериала на уровень ангиогенеза и ремоделирования постишемического рубца у крыс. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020;22(3):156–166.
7. Парфенова Е. В. Стволовые клетки сердца: факт или фантазия? *Российский кардиологический журнал*. 2019;24(11):84–90.
8. Belostotskaya G., Sonin D., Galagudza M. Intracellular development of resident cardiac stem cells: an overlooked phenomenon in myocardial self-renewal and regeneration. *Life*. 2021;11(8):723. DOI: 10.3390/life11080723.
9. Попов С. В., Рябов В. В., Суслова Т. Е., Штатолкина М. А., Веснина Ж. В., Крылов А. Л., Афанасьев С. А., Марков В. А., Карпов Р. С. Фундаментальные и прикладные аспекты клеточных технологий в кардиологии и кардиохирургии. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2008;28(4):5–15.
10. Пронина Е. А., Попыхова Э. Б., Степанова Т. В., Иванов А. Н. Современные направления и перспективы развития регенеративной медицины. *Современные проблемы науки и образования*. 2019;3.
11. Bolli R., Mitrani R. D., Hare J. M., Pepine C. J., Perin E. C., Willerson J. T., Traverse J. H., Henry T. D., Yang P. C., Murphy M. P., March K. L., Schulman I. H., Ikram S., Lee D. P., O'Brien C., Lima J. A., Ostovaneh M. R., Ambale-Venkatesh B., Lewis G., Khan A., Bacallao K., Valasaki K., Longsomboon B., Gee A. P., Richman S., Taylor D. A., Lai D., Sayre S. L., Bettencourt J., Vojvodic R. W., Cohen M. L., Simpson L., Aguilar D., Loghin C., Moyé L., Ebert R. F., Davis B. R., Simari R. D. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRN CONCERT-HF trial. *European Journal of Heart Failure*. 2021;23(4):661–674.
12. Афанасьев С. А., Роговская Ю. В., Фалалеева Л. П., Свиридов И. Н., Шахов В. П., Попов С. В. Сравнительная оценка ремоделирования сердца крысы после экспериментального стеноза коронарной артерии и криодеструкции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009;6:631–634.
13. Кузнецов Ю. Е., Лунегов А. М., Понамарев В. С., Ромашова Е. Б. Корреляционные взаимозависимости между содержанием общих желчных кислот и основными биохимическими показателями крови у норок (Mustela vison Schreber, 1777). *Сельскохозяйственная биология*. 2022;57(6):1217–1224. DOI: 10.15389/agrobiology.2022.6.1217rus.
14. Гомбожапова А. Э., Роговская Ю. В., Ребенкова М. С., Кжышковская Ю. Г., Рябов В. В. Фенотипическая гетерогенность сердечных макрофагов в постинфарктной регенерации миокарда:

перспективы клинических исследований. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2018;33(2):70–76. DOI: 10.29001/2073-8552-2018-33-2-70-76.
15. Ponamarev V., Yashin A., Prusakov A., Popova O. Influence of Modern Probiotics on Morphological Indicators of Pigs' Blood in Toxic Dyspepsia. In: Agriculture Digitalization and Organic Production: Proceedings of the Second International Conference. St. Petersburg: Springer. 2022. 133–142. DOI: 10.1007/978-981-19-7780-0_12.
16. 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.
17. Stepanov I. S., Kalugniy I. I., Markova D. S., Yashin A. V., 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: Agriculture, field cultivation, animal husbandry, forestry and agricultural products*. 2021;723(2):022030. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022030.
18. 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: Agriculture, field cultivation, animal husbandry, forestry and agricultural products*. 2021;723:022029.
19. Bassat E., Mutlak Y. E., Genzelinakh A., Shadrin I. Y., Umansky K. B., Yifa O., Kain D., Rajchman D., Leach J., Bassat D. R., Udi Y., Sarig R., Sagi I., Martin J. F., Bursac N., Cohen Sh., Tzahor E. The extracellular matrix protein agrinpromotes heart regeneration in mice. *Nature*. 2017;13(547(7662)):179–184. DOI: 10.1038/nature22978.
20. Avari H., Rogers K. A., Savory E. J. Quantification of Morphological Modulation, F-Actin Remodeling and PECAM-1 (CD-31) Re-distribution in Endothelial Cells in Response to Fluid-Induced Shear Stress under Various Flow Conditions. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2019;141(4). DOI: 10.1115/1.4042601.
21. Lebedeva A. I., Muslimov S. A., Gareev E. M., Afanasiev S. A., Condratyeva D. S., Popov S. V. Macrophages as homeostatic regulators in the ischemically damaged myocardium after use of allogenic biomaterial. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020;19(1):67–75.
22. Протасов М. В., Смагина Л. В., Галибин О. В., Пинаев Г. П., Воронкина И. В. Зависимость активности ММП в раневом экссудате крыс от состояния тканей раны на начальных этапах раневого процесса. *Цитология*. 2008;50(10):882–886.
23. Шехтер А. Б., Милованова З. П. Фибробласт-фиброкласт: ультраструктурные механизмы резорбции коллагеновых волокон при инволюции соединительной ткани. *Архив патологии*. 1975;37(3):13–19.
24. Oka T., Maillet M., Watt A., Schwartz R. J., Aronow B. J., Duncan S. A., Molkentin J. D. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation Research*. 2006;98(6):837–845. DOI: 10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4.
25. Хлопонин П. А. Малодифференцированные кардиомиоциты в нормальном и репаративном кардиомиогенезе. Вопросы морфологии XXI в. Выпуск 3. СПб.: Издательство ДЭАН. 2012. С. 88–94.
26. Katrukha I. A. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Moscow)*. 2013;78(13):1447–1465. DOI: 10.1134/S0006297913130063.
27. Kuhn E. N., Wu S. M. Origin of cardiac progenitor cells in the developing and postnatal heart. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):321–325.
28. Курчатова Н. Н., Сибиряк С. В., Хасанов Р. А., Юсупова Р. Ш., Яковлева В. Г., Нигматуллина Э. А., Мулдашев Э. Р. Миграция мезенхимальных стволовых клеток в биоматериалы Alloplant: предварительные данные. *Иммунология Урала*. 2005;1(4):17.
29. Linke A., Muller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D. Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Böhm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze Th. H, Kajstura J., Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102:8966–8971.

REFERENCES

1. Travers J. G., Kamal F. A., Robbins J., Yutzey K. E., Blaxall B. C. Cardiac fibrosis. *Circulation Research*. 2016;118(6):1021–1040. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.
2. Soonpaa M. H., Kim K. K., Pajak L., Franklin M., Field L. J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996;271(5):H2183–H2189. DOI: 10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2183.
3. Lebedeva A. I. Biomaterial Alloplant in the regeneration of the myometrium of the uterine horn of experimental animals is a macrophage stimulator of mesenchymal origin. *Journal Biomed*. 2016;2:45–53. (In Russ.)
4. Lebedeva A. I., Muslimov S. A., Gareev E. M., Popov S. V., Afanasiev S. A., Kondratieva D. S. Experimental cardiomyogenesis under conditions of application of various doses of allogeneic biomaterial. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;165(6):753–756. (In Russ.)
5. Lebedeva A. I., Muslimov S. A., Gareev E. M., Popov S. V., Afanasiev S. A. Stimulation of autologous progenitor and committed cells in ischemic damaged myocardium. *Russian Journal of Cardiology*. 2018;23(11):123–129. (In Russ.)
6. Lebedeva A. I., Muslimov S. A., Musina L. A., Gareev E. M., Kadyrov R. Z., Kondratieva D. S., Afanasiev S. A., Popov S. V. The effect of intramyocardial administration of allogeneic biomaterial on the level of angiogenesis and remodeling of the postischemic scar in rats. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020;22(3):156–166. (In Russ.)
7. Parfenova E. V. Heart stem cells: fact or fantasy? *Russian Journal of Cardiology*. 2019;24(11):84–90. (In Russ.)
8. Belostotskaya G., Sonin D., Galagudza M. Intracellular development of resident cardiac stem cells: an overlooked phenomenon in myocardial self-renewal and regeneration. *Life*. 2021;11(8):723. DOI: 10.3390/life11080723.
9. Popov S. V., Ryabov V. V., Suslova T. E., Shtatolkina M. A., Vesnina Zh. V., Krylov A. L., Afanasiev S. A., Markov V. A., Karpov R. S. Fundamental and applied aspects of cellular technologies in cardiology and cardiac surgery. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. 2008;28(4):5–15. (In Russ.)
10. Pronina E. A., Popykhova E. B., Stepanova T. V., Ivanov A. N. Modern directions and prospects for the development of regenerative medicine. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2019;3. (In Russ.)
11. Bolli R., Mitrani R. D., Hare J. M., Pepine C. J., Perin E. C., Willerson J. T., Traverse J. H., Henry T. D., Yang P. C., Murphy M. P., March K. L., Schulman I. H., Ikram S., Lee D. P., O'Brien C., Lima J. A., Ostovaneh M. R., Ambale-Venkatesh B., Lewis G., Khan A., Bacallao K., Valasaki K., Longsomboon B., Gee A. P., Richman S., Taylor D. A., Lai D., Sayre S. L., Bettencourt J., Vojvodic R. W., Cohen M. L., Simpson L., Aguilar D., Loghin C., Moyé L., Ebert R. F., Davis B. R., Simari R. D. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRN CONCERT-HF trial. *European Journal of Heart Failure*. 2021;23(4):661–674.
12. Afanasiev S. A., Rogovskaya Yu. V., Falaleeva L. P., Sviridov I. N., Shakhov V. P., Popov S. V. Comparative evaluation of rat heart remodeling after experimental coronary artery stenosis and cryodestruction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009;6:631–634. (In Russ.)
13. Kuznetsov Yu. E., Lunegov A. M., Ponamarev V. S., Romashova E. B. Correlations between the content of total bile acids and the main biochemical parameters of blood in minks (Mustela vison Schreber, 1777). *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*. 2022;57(6);1217–1224. (In Russ.) DOI: 10.15389/agrobiology.2022.6.1217rus.
14. Gombozhapova A. E., Rogovskaya Yu. V., Rebenkova M. S., Kzhyshkowska J. G., Ryabov V. V. Phenotypic heterogeneity of cardiac macrophages during wound healing following myocardial infarction: perspectives in clinical research. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2018;33(2):70–76. (In Russ.) DOI: 10.29001/2073-8552-2018-33-2-70-76.

15. Ponamarev V., Yashin A., Prusakov A., Popova O. Influence of Modern Probiotics on Morphological Indicators of Pigs' Blood in Toxic Dyspepsia. In: Agriculture Digitalization and Organic Production: Proceedings of the Second International Conference. St. Petersburg: Springer. 2022. 133–142. DOI: 10.1007/978-981-19-7780-0_12.
16. 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.
17. Stepanov I. S., Kalugniy I. I., Markova D. S., Yashin A. V., 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: Agriculture, field cultivation, animal husbandry, forestry and agricultural products*. 2021;723(2):022030. DOI: 10.1088/1755-1315/723/2/022030.
18. 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: Agriculture, field cultivation, animal husbandry, forestry and agricultural products*. 2021;723:022029.
19. Bassat E., Mutlak Y. E., Genzelinakh A., Shadrin I. Y., Umansky K. B., Yifa O., Kain D., Rajchman D., Leach J., Bassat D. R., Udi Y., Sarig R., Sagi I., Martin J. F., Bursac N., Cohen Sh., Tzahor E. The extracellular matrix protein agrinpromotes heart regeneration in mice. *Nature*. 2017;13(547(7662)):179–184. DOI: 10.1038/nature22978.
20. Avari H., Rogers K. A., Savory E. J. Quantification of Morphological Modulation, F-Actin Remodeling and PECAM-1 (CD-31) Re-distribution in Endothelial Cells in Response to Fluid-Induced Shear Stress under Various Flow Conditions. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2019;141(4). DOI: 10.1115/1.4042601.
21. Lebedeva A. I., Muslimov S. A., Gareev E. M., Afanasiev S. A., Condratyeva D. S., Popov S. V. Macrophages as homeostatic regulators in the ischemically damaged myocardium after use of allogenic biomaterial. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020;19(1):67–75.
22. Protasov M. V., Smagina L. V., Galibin O. V., Pinaev G. P., Voronkina I. V. Dependence of MMP activity in rat wound exudate on the state of wound tissues at the initial stages of the wound process. *Citologiya*. 2008;50(10):882–886. (In Russ.)
23. Shekhter A. B., Milovanova Z. P. Fibroblast-fibroclast: ultrastructural mechanisms of collagen fiber resorption during connective tissue involution. *Pathology Archive*. 1975;37(3):13–19. (In Russ.)
24. Oka T., Maillet M., Watt A., Schwartz R. J., Aronow B. J., Duncan S. A., Molkentin J. D. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation Research*. 2006;98(6):837–845. DOI: 10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4.
25. Khloponin P. A. Poorly differentiated cardiomyocytes in normal and reparative cardiomyogenesis. Questions of morphology of the XXI century. Issue 3. Saint Petersburg: Izdatel'stvo DEAN. 2012. P. 88–94. (In Russ.)
26. Katrukha I. A. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Moscow).* 2013;78(13):1447–1465. DOI: 10.1134/S0006297913130063.
27. Kuhn E. N., Wu S. M. Origin of cardiac progenitor cells in the developing and postnatal heart. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):321–325.
28. Kurchatova N. N., Sibiryak S. V., Khasanov R. A., Yusupova R. Sh., Yakovleva V. G., Nigmatullina E. A., Muldashev E. R. Migration of mesenchymal stem cells into Alloplant biomaterials: preliminary data: *Immunologiya Urala*. 2005;1(4):17. (In Russ.)
29. Linke A., Muller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D. Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Böhm M., Quaini F., Urbanek K., Leri A., Hintze Th. H, Kajstura J., Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102:8966–8971.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-212-217
УДК 615.22

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Противоаритмическая активность аминокислотосодержащих производных нибентана на моделях ранних окклюзионных и реперфузионных аритмий

С. М. Напалкова✉, **О. В. Буюклинская**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

✉ **Контактное лицо:** Напалкова Светлана Михайловна. **E-mail:** svetlana.napalkova@pharminnotech.com

ORCID: С. М. Напалкова – https://orcid.org/0000-0002-9216-8673; О. В. Буюклинская – https://orcid.org/0000-0002-4453-1079.

Статья поступила: 04.04.2023 **Статья принята в печать:** 03.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Фармакотерапия нарушений сердечного ритма является одной из актуальных проблем современной медицины. Наличие серьезных побочных эффектов, в частности аритмогенного действия, ограничивает применение антиаритмических средств в клинической практике. Одним из путей снижения токсичности фармакологических агентов является использование их в виде комплексных соединений с аминокислотами.

Цель. Изучение влияния производных нибентана, содержащих в качестве аниона магниевую соль L-аспарагиновой кислоты и глицин, на течение ранних окклюзионных и реперфузионных аритмий.

Материалы и методы. Аминокислотосодержащие производные нибентана были изучены на моделях окклюзионных и реперфузионных аритмий у крыс. Активность препаратов оценивали по частоте возникновения желудочковых экстрасистол (ЖЭС), желудочковой тахикардии (ЖТ), фибрилляции желудочков (ФЖ), по длительности данных нарушений ритма, латентному периоду, средней длительности ЖТ и по количеству ЖЭС на 1 животное.

Результаты и обсуждение. Производные нибентана на моделях ранних окклюзионных и реперфузионных аритмий не уступали по противоаритмической активности лидокаину и нибентану по способности предупреждать нарушения сердечного ритма. Производное нибентана, содержащее в составе магниевую соль L-аспарагиновой кислоты (соединение ЛХТ-53-91), на модели окклюзионных аритмий в дозе, составляющей 2 % $ЛД_{50}$, полностью предупреждало нарушения сердечного ритма у подопытных животных. Производное нибентана, содержащее в составе глицин (соединение ЛХТ-20-92), в дозе 1 % $ЛД_{50}$ достоверно уменьшало число случаев возникновения ЖЭС, предупреждало возникновение желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков в 100 % случаев. На модели реперфузионных аритмий ЛХТ-53-91 в дозе 1 % $ЛД_{50}$ предупреждало развитие фибрилляции желудочков и пароксизмов желудочковой тахикардии и снижало риск развития желудочковой экстрасистолии ($p < 0,05$). Повышение дозы до 2 % $ЛД_{50}$ привело к увеличению активности вещества, что выражалось в предупреждении нарушения сердечного ритма у 100 % животных. ЛХТ-20-92 в дозе 1 % $ЛД_{50}$ на данной модели нарушений сердечного ритма статистически достоверно снижало появление ЖЭС и пароксизмов ЖТ и полностью предупреждало возникновение ФЖ ($p < 0,05$).

Заключение. Включение в структуру нибентана аминокислот, экранирующих генотоксичную группировку и снижающих потенциальную тератогенность и мутагенность, не привело к уменьшению противоаритмической и противофибрилляторной активности на изученных моделях нарушений ритма.

Ключевые слова: аритмии, нибентан, аспарагиновая кислота, глицин

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

Вклад авторов. С. М. Напалкова и О. В. Буюклинская придумали и разработали эксперимент, провели экспериментальную работу и статистическую обработку результатов, а также участвовали в обсуждении результатов исследования, подготовке текста статьи.

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

Благодарность. Работа выполнена при методологической поддержке кафедры фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного университета.

Для цитирования: Напалкова С. М., Буюклинская О. В. Противоаритмическая активность аминокислотосодержащих производных нибентана на моделях ранних окклюзионных и реперфузионных аритмий. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):212–217. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-212-217

Antiarrhythmic Activity of Amino Acids Containing Nibentan Derivatives in Case of Symptoms of Occlusive and Reperfusion Arrhythmias

Svetlana M. Napalkova✉, **Olga V. Buyuclinskaya**

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Professora Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Svetlana M. Napalkova. **E-mail:** svetlana.napalkova@pharminnotech.com

ORCID: Svetlana M. Napalkova – https://orcid.org/0000-0002-9216-8673; Olga V. Buyuclinskaya – https://orcid.org/0000-0002-4453-1079.

Received: 04.04.2023 **Revised:** 03.08.2023 **Published:** 25.08.2023

© Напалкова С. М., Буюклинская О. В., 2023
© Napalkova S. M., Buyuclinskaya O. V., 2023

Abstract
Introduction. Pharmacotherapy of cardiac arrhythmias is one of the urgent problems of modern medicine. The presence of serious side effects, in particular proarrhythmic action, limits the use of known antiarrhythmics in clinical practice. One way to reduce the toxicity of pharmacological agents is to use them as complex compounds with amino acids.
Aim. Studying the effect of nibentan derivatives containing magnesium salt of L-aspartic acid and glycine as anions on the course of early occlusive and reperfusion arrhythmias.
Materials and methods. Aminoacid derivatives of nibentan have been studied in models of occlusive and reperfusion arrhythmias in rats. The activity of the drugs was assessed by the incidence of ventricular extrasystoles (VEC), ventricular tachycardia (VT), ventricular fibrillation (VF), by the latent period and duration of arrhythmias, the average duration of VT, and by the number of VEC per 1 animal.
Results and discussion. Nibentan derivatives in models of early occlusive and reperfusion arrhythmias were not inferior in antiarrhythmic activity to lidocaine and nibentan in their ability to prevent cardiac arrhythmias. The nibentan derivative containing the magnesium salt of L-aspartic acid (compound LHT-53-91) in the model of occlusive arrhythmias at a dose of 2 % LD_{50} completely prevented cardiac arrhythmias in experimental animals. A nibentan derivative containing glycine (compound LHT-20-92) at a dose of 1 % LD_{50} significantly reduced the number of cases of PVCs, prevented the occurrence of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation in 100 % of cases. In the model of reperfusion arrhythmias, LHT-53-91 at a dose of 1 % LD_{50} prevented the development of ventricular fibrillation and paroxysms of ventricular tachycardia and reduced the risk of developing ventricular extrasystole ($p < 0.05$). Increasing the dose to 2 % LD_{50} led to an increase in the activity of the substance, which was expressed in the prevention of cardiac arrhythmias in 100 % of the animals. LHT-20-92 at a dose of 1 % LD_{50} in this model of cardiac arrhythmias statistically significantly reduced the occurrence of VES and VT paroxysms and completely prevented the occurrence of VF ($p < 0.05$).
Conclusion. The inclusion of nibenthan amino acids in the structure, which shielded genotic grouping and reduced potential teratogenicity and mutagenicity, had not led to a reduction in the antiarrhythmic and antifibril-torn activity on the studied models of rhythm disorders.

Keywords: arrhythmias, nibentan, aspartic acid, glycine

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

Contribution of the authors. Svetlana M. Napalkova and Olga V. Buyuclinskaya – conceptualization, methology. Svetlana M. Napalkova and Olga V. Buyuclinskaya – experimental work and statistical processing of the results. Svetlana M. Napalkova and Olga V. Buyuclinskaya – discussion of research results, preparation of the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

Acknowledgment. This work was carried out with the methodological support of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, St. Petersburg State University.

For citation: Napalkova S. M., Buyuclinskaya O. V. Antiarrhythmic activity of amino acids containing nibentan derivatives in case of symptoms of occlusive and reperfusion arrhythmias. *Drug development & registration*. 2023;12(3):212–217. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-212-217

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения сердечного ритма являются симптомами многих заболеваний сердца. Наиболее неблагоприятны аритмии у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), провоцируемые ухудшением коронарного кровотока. Реперфузия ишемизированного миокарда также часто связана с возникновением жизнеугрожающих желудочковых аритмий [1, 2].

Действие антиаритмических препаратов на ионные каналы кардиомиоцитов изменяет их электрофизиологические свойства, что нередко сопровождается развитием проаритмогенного эффекта [3–8].

Нибентан – антиаритмическое средство III класса, разработанное АО «ВНЦ БАВ» под руководством академика М. Д. Машковского [9, 10]. Наличие аритмогенного эффекта и мутагенной активности препятствует широкому использованию соединения в клинической практике [11, 12], но, учитывая высокую эффективность нибентана, продолжается поиск безопасных антиаритмиков среди его производных.

Одним из путей снижения токсичности фармакологических агентов является использование их в виде комплексных соединений с глицином и аспарагиновой кислотой. Будучи естественными метаболитами организма, аминокислоты малотоксичны, не вызывают аллергических реакций, оказывают выраженное терапевтическое действие [13]. В ВНЦ БАВ (пос. С. Купавна, Московская обл.) под руководством профессора С. Я. Скачиловой были синтезированы производные нибентана путем включения в его структуру аминокислот с целью экранирования генотоксичной группировки и предупреждения потенциальной мутагенности и тератогенности [14].

Цель работы заключалась в изучении влияния производных нибентана, содержащих в качестве аниона магниевую соль L-аспарагиновой кислоты или глицин, на течение ранних окклюзионных и реперфузионных аритмий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на половозрелых крысах линии Wistar обоего пола массой 210–260 г, полученных из ПЛЖ «Пущино» (Московская обл.), прошедших необходимый карантин и содержавшихся в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде и корму.

Исследование выполнено в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» (решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 г. № 81). Все манипуляции, причиняющие животным боль, проводили под общим обезболиванием этаминалом натрия (40 мг/кг, внутрибрюшинно).

Методом рандомизации животные были разделены на 5 групп:

- 1-я группа – патология + раствор натрия хлорида изотонический (группа контроля);
- 2-я группа – патология + лидокаин (препарат сравнения – антиаритмическое средство I B класса);
- 3-я группа – патология + нибентан;
- 4-я группа – патология + производное нибентана, содержащее в качестве аниона магниевую соль L-аспарагиновой кислоты (соединение с лабораторным шифром ЛХТ-53-91);
- 5-я группа – патология + производное нибентана, содержащее в качестве аниона глицин (соединение с лабораторным шифром ЛХТ-20-92).

Моделирование патологии осуществляли после интубации трахеи и перевода крыс на искусственное дыхание с помощью аппарата ИВЛ «Вита-1» (ЗАО «ВНИИМП-ВИТА», Россия). Для этого вскрывали грудную клетку в четвертом межреберье слева и перевязывали нисходящую ветвь левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка левого предсердия. Через 10 мин после окклюзии восстанавливали кровообращение и продолжали наблюдение в течение 5 мин. Электрокардиограмму регистрировали с помощью электрокардиографа ЭК1Т-1/3-07 «АКСИОН» во II стандартном отведении на протяжении всего эксперимента.

Изучаемые соединения вводили в бедренную вену за 5 мин до окклюзии коронарной артерии в объеме 0,5 мл. Контрольная группа получала эквиобъемные количества 0,9%-го раствора хлорида натрия. Препарат сравнения – лидокаин – применяли в виде 2%-го раствора (АО «Ай Си Эн Полифарм», Россия).

Исследование противоаритмической активности лидокаина, нибентана и его производных как на моделях ранних окклюзионных, так и реперфузионных нарушений сердечного ритма у крыс начинали с дозы, составляющей 1 % LD_{50}. В зависимости от полученных результатов дозу увеличивали или снижали. Изучаемые дозы и количество животных в серии представлены в таблицах 1 и 2.

На модели реперфузионных нарушений сердечного ритма противоаритмическую активность соединений оценивали после внутривенного введения за 5 мин до перекрытия коронарного кровотока в тех же дозах, что и на модели ранних окклюзионных аритмий.

Активность фармакологических агентов оценивали по частоте возникновения желудочковых экстрасистол (ЖЭС), желудочковой тахикардии (ЖТ), фибрилляции желудочков (ФЖ), по длительности данных нарушений ритма, латентному периоду, средней длительности ЖТ и по количеству ЖЭС на 1 животное.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программного обеспечения STATA (StataCorp LLC, США). Проверяли нормальность распределения количественных признаков с помощью W-критерия Шапиро – Уилка. Далее оценивали значимость различий: при нормальном распределении количественных признаков – с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, при ненормальном распределении – с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса. Числовые данные приведены в таблицах как среднее арифметическое (*M*) ± ошибка среднего (*m*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При постановке контрольной серии экспериментов у животных во всех опытах через 273 ± 26 с после окклюзии коронарной артерии наблюдали развитие желудочковых нарушений ритма по типу экстрасистолии и пароксизмов желудочковой тахикардии продолжительностью 78 ± 23 с. В 5 опытах из 12, что составило 42 %, возникла фибрилляция желудочков (см. таблицу 1).

Противоаритмическую активность препарата сравнения лидокаина изучали в двух дозах. Введение препарата в дозе 2,5 мг/кг привело к статистически значимому снижению частоты возникновения ЖТ (33 % против 100 % в контрольной серии опытов). При увеличении дозы лидокаина до 5,0 мг/кг отмечалось повышение антиаритмической активности, которое выражалось в статистически значимом уменьшении случаев возникновения ЖТ (16 %) и ЖЭС (67 %) и предупреждении развития ФЖ.

Нибентан в дозе 1 мг/кг статистически значимо снижал количество и длительность пароксизмов желудочковой тахикардии, увеличивал латентный период возникновения аритмий ($p < 0,05$) и полностью предупреждал появление фибрилляции желудочков. При повышении дозы до 2 % $ЛД_{50}$ активность препарата повышалась.

Таблица 1. Антиаритмическая активность некоторых аминокислотосодержащих производных нибентана на модели ранних окклюзионных нарушений ритма у крыс

Table 1. Antiarrhythmic activity of some amino acid-containing nibentane derivatives on a model of early occlusive rhythm disturbances in rats

Испытуемое соединение Test compound	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	% $ЛД_{50}$ % LD_{50}	Количество животных Number of animals				Латентный период, с Latency period, sec	Количество ЖЭС на 1 животное Quantity VES for 1 animal	Средняя длительность ЖТ на 1 животное, с Average duration of VT per 1 animal
			В опыте In the experience	С нарушениями сердечного ритма With heart rhythm disorders					
				ЖЭС VES	ЖТ VT	ФЖ VF			
Контроль Control	–	–	12	12 (100 %)	12 (100 %)	5 (42 %)	72 ± 26	73 ± 16	78 ± 23
Лидокаин Lidocaine	2,50	1,4	6	5 (83 %)	2* (33 %)	1* (16 %)	413 ± 96	68 ± 13	1,2 ± 0,2*
	5,00	2,8	6	4* (67 %)	1* (16 %)	0*(0 %)	371 ± 78	44 ± 18	0,3 ± 0,1*
Нибентан Nibentan	1,00	1,0	6	5 (83 %)	1* (16 %)	0* (0 %)	426 ± 25*	17 ± 11*	0,3 ± 0,3*
	2,00	2,0	6	2* (33 %)	1* (16 %)	0* (0 %)	50–495	14 ± 9*	0,3 ± 0,3*
ЛХТ-53-91 LHT-53-91	0,50	0,4	6	4* (67 %)	2* (33 %)	0* (0 %)	495 ± 31*	32 ± 28	1,3 ± 1,0*
	1,26	1,0	6	3* (50 %)	0* (0 %)	0* (0 %)	458 ± 40*	14 ± 6*	–
	2,52	2,0	6	0* (0 %)	0* (0 %)	0* (0 %)	–	–	–
ЛХТ-20-92 LHT-20-92	1,00	0,9	6	5 (83 %)	1* (16 %)	0* (0 %)	384 ± 53	61 ± 26	0,3 ± 0,3*
	1,12	1,0	6	3* (50 %)	0* (0 %)	0* (0 %)	336 ± 12	22 ± 7	–

Примечание. * Статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).

Note. * Statistically significant differences with the control ($p < 0.05$).

Таблица 2. Антиаритмическая активность некоторых аминокислотосодержащих производных нибентана на модели реперфузионных нарушений ритма у крыс

Table 2. Antiarrhythmic activity of some amino acid-containing nibentane derivatives on a model of reperfusion rhythm disturbances in rats

Испытуемое соединение Test compound	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	% $ЛД_{50}$ % LD_{50}	Количество животных Number of animals				Количество ЖЭС на 1 животное Quantity VES for 1 animal	Средняя длительность аритмий, с Average duration of arrhythmias, sec	Средняя длительность ЖТ на 1 животное, с Average duration of VT per 1 animal
			В опыте In the experience	С нарушениями сердечного ритма With heart rhythm disorders					
				ЖЭС VES	ЖТ VT	ФЖ VF			
Контроль Control	–	–	12	12 (100 %)	12 (100 %)	10 (83 %)	33 ± 6	191 ± 27	118 ± 26
Лидокаин Lidocaine	2,50	1,4	6	6 (100 %)	3* (50 %)	2 (33 %)	32 ± 2	124 ± 28	5 ± 3*
	5,00	2,8	6	3* (50 %)	1* (16 %)	0* (0 %)	5 ± 2*	45 ± 12*	1 ± 1*
Нибентан Nibentan	1,00	1,0	6	5 (83 %)	2* (33 %)	0* (0 %)	7 ± 4*	16 ± 9*	2 ± 2*
	2,00	2,0	6	3* (50 %)	2* (33 %)	0* (0 %)	33 ± 28	170 ± 82	3 ± 2*
ЛХТ-53-91 LHT-53-91	0,50	0,4	6	6 (100 %)	4* (67 %)	0* (0 %)	16 ± 8	56 ± 13*	8 ± 3*
	1,26	1,0	6	1* (16 %)	0* (0 %)	0* (0 %)	0,5	1,5	–
	2,52	2,0	6	0* (0 %)	0* (0 %)	0* (0 %)	–	–	–
ЛХТ-20-92 LHT-20-92	1,00	0,9	6	6 (100 %)	3* (50 %)	0* (0 %)	20 ± 6	120 ± 33	27 ± 20*
	1,12	1,0	6	3* (50 %)	2* (33 %)	0* (0 %)	13 ± 11	55 ± 8*	6 -18

Примечание. * Статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).

Note. * Statistically significant differences with the control ($p < 0.05$).

Производное нибентана, содержащее в составе магниевую соль L-аспарагиновой кислоты (соединение ЛХТ-53-91), на данной модели нарушений ритма было более активно, чем предшественник, так как в дозе, составляющей 2 % $ЛД_{50}$, полностью предупреждало нарушения сердечного ритма у подопытных животных.

Производное нибентана, содержащее в составе глицин (соединение ЛХТ-20-92), в дозе 1 % $ЛД_{50}$ обладало высокой антиаритмической активностью, статистически значимо уменьшая число случаев возникновения ЖЭС, предупреждало возникновение желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков в 100 % случаев.

Реперфузия коронарного кровотока в контрольной серии опытов привела к появлению желудочковой экстрасистолии и желудочковой тахикардии во всех случаях ($n = 12$), а фибрилляция желудочков возникла в 83 % случаев. Нарушения ритма сердечной деятельности сохранялись на протяжении 191 ± 27 с (см. таблицу 2).

Лидокаин в дозе 2,5 мг/кг проявил значительный противоаритмический эффект, достоверно снижая частоту развития пароксизмов желудочковой тахикардии и уменьшая их длительность, снижая по сравнению с контролем риск развития фибрилляции желудочков ($p < 0,05$). При повышении дозы до 5,0 мг/кг активность соединения возрастала, и препарат полностью предупреждал возникновение фибрилляции желудочков ($p < 0,05$).

Нибентан в дозе 1 % $ЛД_{50}$ проявил высокую противоаритмическую активность, статистически достоверно снижая риск развития ЖТ (33 % против 100 % в контроле) и предупреждая возникновение ФЖ у 100 % животных. Повышение дозы препарата до 2 % $ЛД_{50}$ приводило к увеличению противоаритмической активности.

Соединение ЛХТ-53-91 в дозе 1 % $ЛД_{50}$ обладало выраженной противоаритмической активностью, полностью предупреждая развитие фибрилляции желудочков и пароксизмов желудочковой тахикардии и снижая риск развития желудочковой экстрасистолии ($p < 0,05$). Повышение дозы до 2 % $ЛД_{50}$ привело к увеличению активности вещества, которое полностью предупредило нарушения сердечного ритма. При снижении дозы до 0,4 % $ЛД_{50}$ активность препарата снизилась, но оставалась статистически достоверной по сравнению с контролем (см. таблицу 2).

ЛХТ-20-92 в дозе 1 % $ЛД_{50}$ на данной модели нарушений сердечного ритма проявило высокую противоаритмическую активность, статистически достоверно снижая появление ЖЭС и пароксизмов ЖТ и полностью предупреждая возникновение ФЖ ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производные нибентана, содержащие в качестве аниона магниевую соль L-аспарагиновой кислоты или глицин, на моделях ранних окклюзионных и реперфузионных аритмий не уступали лидокаину и нибентану по способности предупреждать нарушения сердечного ритма.

Таким образом, включение в структуру нибентана аминокислот, экранирующих генотоксичную группировку и снижающих потенциальную тератогенность и мутагенность, не привело к уменьшению противоаритмической и противофибриллярной активности на изученных моделях нарушений ритма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев Д. С., Михайлов Е. Н., Неминущий Н. М., Голухова Е. З., Бабокин В. Е., Березницкая В. В., Васичкина Е. С., Гарькина С. В., Голицын С. П., Давтян К. В., Дупляков Д. В., Заклязьминская Е. В., Зенин С. А., Иваницкий Э. А., Ильдарова Р. А., Комолятова В. Н., Костарева А. А., Кучинская Е. А., Лайович (Нестеренко) Л. Ю., Лебедева В. К., Любимцева Т. А., Макаров Л. М., Мамчур С. Е., Медведев М. М., Миронов Н. Ю., Митрофанова Л. Б., Попов С. В., Ревишвили А. Ш., Рзаев Ф. Г., Романов А. Б., Татарский Р. Б., Термосесов С. А., Уцумуева М. Д., Харлап М. С., Царегородцев Д. А., Школьникова М. А., Шлевков Н. Б., Шляхто Е. В., Шубик Ю. В., Яшин С. М. Желудочковые нарушения ритма. Желудочковые тахикардии и внезапная сердечная смерть. Клинические рекомендации 2020. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(7):4600. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4600.
2. Sampson M. Antiarrhythmic drugs. Part 1: an overview. *British Journal of Cardiac Nursing*. 2019;14(9):1–10.
3. Sampson M. Antiarrhythmic drugs part 2: rhythm-control drugs. *British Journal of Cardiac Nursing*. 2019;14(10):1–11.
4. Shenasa M., Shenasa M. A., Smith M. Class I Antiarrhythmic Drugs: Na^+ Channel Blockers. *Antiarrhythmic Drugs*. 2020:31–105.
5. Nanasi P. P., Pueyo E., Virag L. Perspectives of Antiarrhythmic Drug Therapy: Disappointing Past, Current Efforts, and Faint Hopes. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:1116.
6. Fischer A. J., Diller G. P., Uebing A., Nürnberg J., Hebe J. Antiarrhythmic drugs – safety and efficacy during pregnancy. *Herzschrittmachertherapie + Elektrophysiologie*. 2021;32(2):145–151.
7. Jones B., Burnand C. Antiarrhythmic drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2021;22(5):319–323.
8. Миллер О. Н., Сыров А. В., Дощицин В. Л., Павлова Т. В., Тарасов А. В. Клинические рекомендации и мнение экспертов по применению антиаритмических препаратов в реальной практике. *Consilium Medicum*. 2019;21(3):43–50. DOI: 10.26442/20751753.2019.5.190328.
9. Скачилова С. Я., Ермакова Г. А., Желтухин Н. К., Зуева Э. Ф., Давыдова Н. К. Лекарственные препараты, разработанные АО «ВНЦ БАВ» под руководством академика М. Д. Машковского (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):7–13. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-7-13.
10. Davydova N. K. Development of Drug Substances of the Original Class III Antiarrhythmic Drugs Nibentan and Niferidyl. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(9):792–796.
11. Золотарева Г. Н., Акаева Э. А., Исхакова Э. И. Сравнительное изучение мутагенной активности ряда гипотензивных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 1988;3:19–22.
12. Меркулова И. Н., Тарарак А. Э., Коткин К. Л., Голицын С. П., Розенштраух Л. В., Руда М. Я., Чазов Е. И. Клиническое изучение нибентана – новый антиаритмический препарат III класса. Сообщение 3: Эффективность нибентана у больных с желудочковыми нарушениями ритма, аритмогенные эффекты. *Кардиология*. 1997;4:4–15.
13. Мараховский Ю. Х. Клиническая оценка аминокислот как лекарственных средств: отдельные систематизированные аналитические зарисовки. *Рецепт*. 2012;4(84):124–140.

14. Малахова Л. Н., Напалкова С. М., Золотарева Г. Н., Скачилова С. Я., Костин Я. В., Золотарева Г. Н. Роль генетического скрининга в направленном синтезе новых синтетических лекарственных средств. Тезисы докладов Российской научной конференции «Создание лекарственных средств». Москва. 1992. 231–232.

REFERENCES

1. Lebedev D. S., Mikhailov E. N., Neminuschiy N. M., Golukhova E. Z., Babokin V. E., Bereznitskaya V. V., Vasichkina E. S., Garkina S. V., Golitsyn S. P., Davtyan K. V., Duplyakov D. V., Zaklyazminskaya E. V., Zenin S. A., Ivanitsky E. A., Ildarova R. A., Komolyatova V. N., Kostareva A. A., Kuchinskaya E. A., Lajovich (Nesterenko) L. Yu., Lebedeva V. K., Lyubimtseva T. A., Makarov L. M., Mamchur S. E., Medvedev M. M., Mironov N. Yu., Mitrofanova L. B., Popov S. V., Revishvili A. S., Rzayev F. G., Romanov A. B., Tatarsky R. B., Termosesov S. A., Utsumueva M. D., Kharlap M. S., Tsaregorodtsev D. A., Shkolnikova M. A., Shlevkov N. B., Shlyakhto E. V., Shubik Yu. V., Yashin S. M. Ventricular arrhythmias. Ventricular tachycardias and sudden cardiac death. 2020 Clinical guidelines. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(7):4600. (In Russ.) DOI:10.15829/1560-4071-2021-4600.
2. Sampson M. Antiarrhythmic drugs. Part 1: an overview. *British Journal of Cardiac Nursing*. 2019;14(9):1–10.
3. Sampson M. Antiarrhythmic drugs part 2: rhythm-control drugs. *British Journal of Cardiac Nursing*. 2019;14(10):1–11.
4. Shenasa M., Shenasa M. A., Smith M. Class I Antiarrhythmic Drugs: Na^+ Channel Blockers. *Antiarrhythmic Drugs*. 2020:31–105.
5. Nanasi P. P., Pueyo E., Virag L. Perspectives of Antiarrhythmic Drug Therapy: Disappointing Past, Current Efforts, and Faint Hopes. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:1116.
6. Fischer A. J., Diller G. P., Uebing A., Nürnberg J., Hebe J. Antiarrhythmic drugs – safety and efficacy during pregnancy. *Herzschrittmachertherapie + Elektrophysiologie*. 2021;32(2):145–151.
7. Jones B., Burnand C. Antiarrhythmic drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2021;22(5):319–323.
8. Miller O. N., Syrov A. V., Doshchitsin V. L., Pavlova T. V., Tarasov A. V. Clinical guidelines and expert opinion on the use of antiarrhythmic drugs in actual practice. *Consilium Medicum*. 2019;21(3):43–50. (In Russ.) DOI: 10.26442/20751753.2019.5.190328.
9. Skachilova S. Ya., Ermakova G. A., Zheltukhin N. K., Zueva E. F., Davydova N. K. Drugs developed AT «ARC BASS» with M. D. Mashkovskii lead (review). *Drug development & registration*. 2019;8(1):7–13. (In Russ.) DOI: 10.33380/ 2305-2066-2019-8-1-7-13.
10. Davydova N. K. Development of Drug Substances of the Original Class III Antiarrhythmic Drugs Nibentan and Niferidyl. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(9):792–796.
11. Zolotareva G. N., Akayeva E. A., Iskhakova E. I. Comparative study of the mutagenic activity of a number of antihypertensive drugs. *Chem.-farm. magazine*. 1988; 3:19-22.
12. Merkulova I. N., Tararak A. E., Kotkin K. L., Golitsyn S. P., Rozenshtraukh L. V., Ruda M. Ya., Chazov E. I. Clinical study of nibentan – a new class III antiarrhythmic drug. Message 3: Efficacy of nibentan in patients with ventricular arrhythmias, arrhythmogenic effects. *Cardiology*.1997;4:4–15. (In Russ.)
13. Marakhovsky Yu. Kh. Clinical evaluation of amino acids as drugs: separate systematized analytical sketches. *Recipe*. 2012;4(84): 124–140. (In Russ.)
14. Malakhova L. N., Napalkova S. M., Zolotareva G. N., Skachilova S. Ya., Kostin Ya. V. The role of genetic screening in targeted synthesis of new synthetic drugs (abstracts) abstracts reports of the Russian scientific conference «Creation of medicines». Moscow. 1992. P. 231–232. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-218-227
УДК 615.033

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Сравнительное адаптивное исследование фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов GP30121 и Цераксон® с использованием коррекции на уровень эндогенного аналита

А. Н. Арефьева[1, 3]✉, А. Р. Доротенко[1, 3], С. М. Носков[4], И.Е. Макаренко[1, 2], Р. В. Драй[1], Т. Н. Комаров[5], О. А. Арчакова[5], Н. С. Багаева[5], И. Е. Шохин[5]

[1] Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34-А
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «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
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8
[4] Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 3». 150007, Россия, г. Ярославль, ул. Маяковского, д. 61
[5] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики». 117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

✉ **Контактное лицо:** Арефьева Анна Николаевна. **E-mail:** Anna.Arefeva@geropharm.com

ORCID: А. Н. Арефьева – https://orcid.org/0000-0003-3178-3581; А. Р. Доротенко – https://orcid.org/0000-0003-1142-6325; С. М. Носков – https://orcid.org/0000-0003-3456-9409; И. Е. Макаренко – https://orcid.org/0000-0003-2308-0608; Р. В. Драй – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097; Т. М. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 01.06.2023 **Статья принята в печать:** 18.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Цитиколин – естественный эндогенный нуклеозид, состоящий из цитидина и холина, связанных дифосфатным мостиком, участвующий в синтезе мембранных фосфолипидов в качестве промежуточного звена. Препараты цитиколина обладают нейропротекторным и нейрометаболическим действием, используются для лечения широкого спектра неврологической патологии. Для регистрации воспроизведенного препарата цитиколина необходимо проведение исследования биоэквивалентности.

Цель. Целью данного исследования являлось изучение сравнительной фармакокинетики (ФК) и биоэквивалентности препаратов, содержащих цитиколин – GP30121 и Цераксон®, у здоровых добровольцев при приеме натощак.

Материалы и методы. В настоящей статье описана оценка фармакокинетики препаратов, содержащих цитиколин, с коррекцией на фоновое значение аналита (уридина). Для проведения исследования был выбран адаптивный дизайн. Определение концентрации уридина было выполнено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения R Project, версия 3.6.3.

Результаты и обсуждение. Было показано, что значения 94.12%-х ДИ при α = 0,0294 для отношений геометрических средних основных ФК параметров основного метаболита действующего вещества исследуемых препаратов укладываются в допустимые пределы 80.00–125.00 %.

Заключение. Была доказана биоэквивалентность препаратов, из чего можно сделать вывод, что данный подход может быть рассмотрен в исследованиях других лекарственных средств.

Ключевые слова: цитиколин, уридин, адаптивный дизайн, биодоступность, безопасность

Конфликт интересов. Исследование спонсировалось ООО «ГЕРОФАРМ». Авторы Р. В. Драй, И. Е. Макаренко, А. Р. Доротенко, А. Н. Арефьева являются сотрудниками ЗАО «Фарм-Холдинг», который является подразделением ООО «ГЕРОФАРМ». Авторы И. Е. Шохин, С. М. Носков, Т. Н. Комаров, О. А Арчакова, Н. С. Багаева являются сотрудниками учреждений, выполнявших данное контрактное исследование для ООО «ГЕРОФАРМ».

Вклад авторов. Р. В. Драй, И. Е. Макаренко, А. Р. Доротенко, А. Н. Арефьева участвовали в планировании и координации всех этапов исследования биоэквивалентности. С. М. Носков руководил клиническим этапом исследования. И. Е. Шохин руководил аналитической частью исследования. Т. Н. Комаров и О. А. Арчакова выполняли аналитическую часть исследования, участвовали в разработке и валидации аналитической методики. Н. С. Багаева выполняла статистическую и фармакокинетическую часть исследования. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и подготовке рукописи.

Финансирование. Исследование финансировалось ООО «ГЕРОФАРМ».

Соответствие принципам этики. Условием для проведения исследования являлись Разрешение МЗ РФ № 173 от 31.03.2021 и одобрение исследования Советом по Этике (выписка из протокола заседания Совета по Этике № 269 от 23.03.2021). Протокол исследования GP30121-P4-11, версия 4.0 от 5 февраля 2021 г., и все основные документы исследования были одобрены Независимым этическим комитетом Государственного бюджетного учреждения Здравоохранения Ярославской области «Клиническая больница № 3» (выписка из протокола № 142 заседания Независимого Этического Комитета от 28 января 2022 г.). Проведение исследования соответствовало 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, подписали информированное согласие на участие в исследовании.

© Арефьева А. Н., Доротенко А. Р., Носков С. М., Макаренко И. Е., Драй Р. В., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Багаева Н. С., Шохин И. Е., 2023
© Arevefa A. N., Dorotenko A. R., Noskov S. M., Makarenko I. E., Drai R. V., Komarov T. N., Archakova O. A., Bagaeva N. S., Shokhin I. E., 2023

Для цитирования: Арефьева А. Н., Доротенко А. Р., Носков С. М., Макаренко И. Е., Драй Р. В., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Багаева Н. С., Шохин И. Е. Сравнительное адаптивное исследование фармакокинетики и биоэквивалентности препаратов GP30121 и Цераксон® с использованием коррекции на уровень эндогенного аналита. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):218–227. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-218-227

An Open-label Randomized Crossover Study with Adaptive Design of the Pharmacokinetics and Bioequivalence of GP30121 and Ceraxon® Corrected for Endogenous Analyte Level

Anna N. Arevefa[1, 3]✉, Artem R. Dorotenko[1, 3], Sergey M. Noskov[4], Igor E. Makarenko[1, 2], Roman V. Drai[1], Timofey N. Komarov[5], Olga A. Archakova[5], Natalya S. Bagaeva[5], Igor E. Shokhin[5]

[1] CJSC "Pharm Holding", 34-A, Svyazi str., Saint-Petersburg, Strel'na settlement, 198515, Russia
[2] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "A. I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russia
[3] Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (Pavlov University). 6–8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022, Russia
[4] Clinical Hospital No. 3. 61, Mayakovskogo str., Yaroslavl, 150007, Russia
[5] LLC "Center for Pharmaceutical Analytics". 8, Simferopolsky Boulevard, Moscow, 117149, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna N. Arevefa. **E-mail:** Anna.Arefeva@geropharm.com

ORCID: Anna N. Arevefa – https://orcid.org/0000-0003-3178-3581; Artem R. Dorotenko – https://orcid.org/0000-0003-1142-6325; Sergey M. Noskov – https://orcid.org/0000-0003-3456-9409; Igor E. Makarenko – https://orcid.org/0000-0003-2308-0608; Roman V. Drai – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097; Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Natalya S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Igor E. Shokhin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 01.06.2023 **Revised:** 18.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Citicoline is an endogenous nucleoside consisting of cytidine and choline linked by a diphosphate bridge that is involved in the synthesis of membrane phospholipids. Drugs containing citicoline have neuroprotective and neurometabolic effects and are used for the treatment of a wide range of neurological disorders. In its turn, bioequivalence study is a pathway to register a generic citicoline drug in Russian Federation.

Aim. The aim of the study was to investigate the comparative pharmacokinetics (PK) and bioequivalence of two citicoline-containing drugs GP30121 and Ceraxon® in healthy male volunteers when taken on an empty stomach.

Materials and methods. We evaluated the pharmacokinetics of citicoline-containing drugs corrected for endogenous analyte (uridine) level using an adaptive design. We determined uridine concentration by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. We used R Project software, version 3.6.3. for performing statistical analysis for the study.

Results and discussion. GP30121 and Ceraxon® exhibited similar PK profiles. It was shown that the values of 94.12 % confidence interval (CI) at α = 0.0294 for the geometric mean ratios for the primary PK parameters of the main metabolite of the active ingredient of the investigated drugs were fully contained within the predefined equivalence limits of 80.00–125.00 %.

Conclusion. The study demonstrates bioequivalence of GP30121 and Ceraxon® proving the approach with the correction for endogenous analyte could be considered in studies of other drugs.

Keywords: citicoline, uridine, bioavailability, adaptive design, safety

Conflict of interest. The study was sponsored by LLC "GEROPHARM". The authors Roman V. Dry, Igor E. Makarenko, Artem R. Dorotenko, Anna N. Arefieva are employees of CJSC "Pharm Holding", which is a division of LLC "GEROPHARM". The authors Igor E. Shokhin, Sergey M. Noskov, Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Natalya S. Bagaeva are employees of institutions that performed this contract study for LLC "GEROPHARM".

Contribution of the authors. Roman V. Drai, Igor E. Makarenko, Artem R. Dorotenko, Anna N. Arefeva participated in the planning and coordination of all stages of the bioequivalence study. Sergey M. Noskov supervised the clinical stage of the study. Igor E. Shokhin supervised the analytical part of the study. Timofey N. Komarov and Olga A. Archakova performed the analytical part of the study, participated in the development and validation of the analytical methodology. Natalya S. Bagaeva performed the statistical and pharmacokinetic part of the study. All authors participated in the discussion of the results and preparation of the manuscript.

Funding. The study was funded by LLC "GEROPHARM".

Compliance with the principles of ethics. The condition for conducting the study was the Permit of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 173 dated March 31, 2021 and the approval of the study by the Ethics Council (extract from the minutes of the meeting of the Ethics Council No. 269 dated March 23, 2021). The study protocol GP30121-P4-11, version 4.0 dated February 5, 2021, and all the main study documents were approved by the Independent Ethics Committee of the State Budgetary Health Institution of the Yaroslavl Region "Clinical Hospital No. 3" (extract from the protocol No. 142 of the meeting of the Independent Ethics Committee dated January 28, 2022). The study was carried out in accordance with the ethical standards developed in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association "Ethical principles for conducting scientific medical research involving humans" as amended in 2000 and "Rules of Clinical Practice in the Russian Federation", approved by the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 19.06.2003 No. 266. All subjects provided written informed consent before any screening procedures were carried out.

For citation: Arevefa A. N., Dorotenko A. R., Noskov S. M., Makarenko I. E., Drai R. V., Komarov T. N., Archakova O. A., Bagaeva N. S., Shokhin I. E. An open-label randomized crossover study with adaptive design of the pharmacokinetics and bioequivalence of GP30121 and Ceraxon® corrected for endogenous analyte level. *Drug development & registration*. 2023;12(3):218–227. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-218-227

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что смертность от эпизодов острого мозгового кровообращения (ОНМК) и их осложнений за последние два десятилетия повсеместно снижается, абсолютное число пациентов, перенесших ОНМК, достаточно велико и продолжает расти. Вероятно, именно поэтому инсульт остается второй по частоте причиной смерти по всему миру [1]. На территории Российской Федерации доля ОНМК в структуре общей смертности составляет 21,4 %, при этом за последние 10 лет смертность от ОНМК среди пациентов трудоспособного возраста увеличилась более чем на 30 % (41 на 100 000 населения), а ранняя 30-дневная летальность после инсульта приближается к 35 %[1].

Согласно национальным клиническим рекомендациям по неврологии, пациентам, перенесшим ишемический инсульт, показано назначение препаратов цитиколина. Внутривенное введение препарата в течение 10 дней с последующим переходом на пероральный прием достоверно улучшает исходы у пациентов с ишемическим инсультом и снижает показатели инвалидизации и смертности[2]. На данный момент цитиколин является единственным нейропротектором, вошедшим в европейские рекомендации по лечению инсульта[3]. Помимо ОНМК, цитиколин также рекомендован в качестве препарата, обладающего нейрометаболическим действием, для коррекции когнитивных нарушений при дисциркуляторной энцефалопатии.

Цитиколин (цитидин-5′-дифосфатхолин или ЦДФ-холин) – естественный эндогенный нуклеозид, состоящий из цитидина и холина, связанных дифосфатным мостиком, участвующий в синтезе мембранных фосфолипидов в качестве промежуточного звена. При пероральном приеме цитиколин в организме человека быстро метаболизируется до холина и цитидина, с последующим стремительным дезаминированием последнего до уридина, который является как ключевым метаболитом экзогенного цитиколина, так и прекурсором эндогенного цитиколина [4]. Нейропротекторное и нейрометаболическое действие данного препарата обусловлено не только его участием в синтезе ацетилхолина, но и способностью окисляться до бетаина, донора метильных групп.

Лишь один препарат цитиколина в РФ на момент проведения данного исследования был представлен в виде таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Данная лекарственная форма предпочтительна для ряда пациентов, так как лишена как недостатков форм для парентерального введения (например, необходимость наличия квалифицированного персонала), так и недостатков жидкой пероральной формы (затруднения при глотании жидкостей у части пациентов с последствиями ОНМК, аллергические реакции на вспомогательные вещества и прочее), поэтому создание и выведение на рынок воспроизведенного препарата в виде таблеток является актуальной задачей. Одним из шагов к этому должно стать установление биоэквивалентности воспроизведенного и оригинального препаратов.

Целью данного исследования являлось изучение сравнительной фармакокинетики (ФК) и биоэквивалентности препаратов, содержащих цитиколин – GP30121 и Цераксон®, у здоровых добровольцев при приеме натощак. Помимо оценки фармакокинетических параметров (ФК параметров) основного метаболита цитиколина, был произведен сравнительный анализ данных о переносимости исследуемых препаратов (ИП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые препараты

Препарат сравнения (ПС) – Цераксон®, таблетки для приема внутрь, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг (Ferrer Internacional S.A., Испания). Тестируемый препарат (ТП) – GP30121, таблетки для приема внутрь, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Дизайн и клиническая часть исследования

Исследование проводили в соответствии с протоколом, принципами Хельсинкской декларации, стандартами по Надлежащей клинической практике (ICH GCP), а также в соответствии с другим законодательством, принятым в РФ и ЕАЭС. Условием для проведения данного исследования являлись Разрешение МЗ РФ № 173 от 31.03.2021 и одобрение исследования Советом по Этике (выписка из протокола заседания Совета по Этике № 269 от 23.03.2021). Все добровольцы подписали форму информированного согласия до проведения каких-либо процедур.

В связи с тем, что литературные данные, необходимые для расчета объема выборки были весьма ограничены, для данного клинического исследования был предусмотрен адаптивный дизайн (Potvin C) с возможностью проведения 2 части исследования в случае недостижения мощности 80 % и неподтверждения биоэквивалентности с учетом корректировки ошибки первого рода ($\alpha = 0{,}0294$) [2]. Для 1 части исследования было запланировано рандомизировать 42 добровольца. С учетом того, что CV_{intra} для наибо-

[1] Неврология. Национальное руководство. Краткое издание. Доступно по: https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970428900.html. Ссылка активна на 14.08.2023.

[2] Неврология. Национальное руководство. Краткое издание. Доступно по: https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970428900.html. Ссылка активна на 14.08.2023.

[3] Guidelines for Management of Ischaemic Stroke and Transient Ischaemic Attack 2008. Available at: http://www.congrex-switzerland.com/fileadmin/files/2013/esostroke/pdf/ESO08_Guidelines_Original_english.pdf. Accessed: 01.09.2021.

лее вариабельного показателя (AUC) не превышает 29 %[1], завершить исследование по протоколу должны были не менее 38 добровольцев.

Критерии включения и невключения в исследование обеспечивали участие в исследовании здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 45 лет, мужчин и женщин, некурящих и не имеющих в настоящее время и в анамнезе зависимости от алкоголя или наркотиков. В исследование не могли быть включены добровольцы с положительными серологическими тестами на инфекции, отягощенным аллергологическим анамнезом, труднодоступными венами верхних конечностей, перенесшие значительную кровопотерю в течение последних 3 месяцев, соблюдающие любую особую диету или образ жизни, принимающие на регулярной основе какие-либо лекарственные препараты, а также принимавшие препараты или биологически активные добавки, содержащие холин и/или цитиколин в течение 14 дней до начала скрининга, беременные и кормящие.

Клиническая фаза исследования состояла из скрининга, 2 этапов приема ИП, периода «отмывки» и телефонного контакта в конце исследования. Длительность скрининга – до 14 дней. Длительность каждого этапа – 40 часов, период «отмывки» – 7 дней от момента приема препарата (>5 $t_{1/2}$). Также был предусмотрен телефонный контакт в конце исследования – на 8-й день после приема ИП в рамках этапа 2. Таким образом, общая продолжительность данного исследования для каждого добровольца не превышала 31 день.

В данном исследовании для оценки фармакокинетики ИП в качестве исследуемого аналита был выбран уридин, который представляет собой эндогенное вещество с выраженными циркадными колебаниями. Самых низких значений уровень эндогенного уридина в плазме крови достигает после полудня, примерно к 15 часам, а пик его концентрации приходится на полночь [3]. В связи с этим, в условиях каждого этапа настоящего клинического исследования в день, предшествующий дню приема ИП, был предусмотрен забор крови для последующего определения базальных уровней аналита по тем же правилам и в тех же временных точках, что и забор биообразцов в день приема ИП, но без непосредственного приема препаратов. Данный подход соответствует современным регуляторным требованиям ЕАЭС и необходим для получения истинных значений прироста концентраций аналита после приема ИП.

[1] 6th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence: BA/BE Studies Summit, August 17-19, 2015 Chicago, USA. The bioequivalence of Citicoline 500 mg film tablet. Available at: https://d2cax41o7ahm5l.cloudfront.net/cs/speaker-pdfs/onursal-saglam-novagenix-biyoanalitik-ilac-turkey.pdf]. Accessed: 05.2019.

Добровольцы были госпитализированы в исследовательский центр примерно за 12 часов до забора биообразцов для последующего определения базальных уровней аналита.

Субъекты принимали тестируемый препарат или препарат сравнения в дозе 1000 мг (2 таблетки по 500 мг), запив его 200 мл негазированной воды комнатной температуры, натощак (последний прием пищи был минимум за 12 часов до приема препарата).

Образцы крови были забраны в следующих точках: до (–10 минут) и через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1 ч 15 мин, 1 ч 30 мин, 1 ч 45 мин, 2 ч, 2 ч 30 мин, 3 ч, 3 ч 30 мин, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 16 ч от запланированного времени приема ИП/приема ИП (например, если прием ИП осуществлялся в 6:00, то забор крови в рамках первого дня в точке «–10 минут» был осуществлен в 5:50).

Добровольцам первые 4 часа от времени приема препарата следовало избегать положения лежа, а также приема любых жидкостей, так как это могло привести к изменениям в фармакокинетике исследуемого аналита. Через 4 часа осуществлялось питание добровольцев, жидкость предоставлялась по потребности.

На протяжении каждой госпитализации врач-исследователь осуществлял динамическое наблюдение за добровольцами, которое включало: физикальный осмотр, измерение температуры тела, уровня артериального давления, частоты дыхательных движений и частоты сердечных сокращений. Также с целью оценки безопасности ИП в конце 2 этапа был забран биологический материал для выполнения клинического и биохимического анализов крови, анализа мочи.

После завершения этапа 2 (на 8 день от приема препарата врач-исследователь осуществлял телефонный звонок с целью контроля состояния добровольца.

Аналитическая часть исследования

Образцы крови во время каждого из периодов исследования были отобраны в вакуумные пробирки вместимостью 5 мл, содержащие натрия фторид (NaF) и калиевую соль EDTA (K_2EDTA или K_3EDTA), и через 30 минут были центрифугированы при охлаждении. Затем образцы плазмы были помещены в полипропиленовые пробирки в двух экземплярах (аликвоты А и Б), закупорены и заморожены на сухом льду. Объем плазмы в анализируемой аликвоте составил не менее 1,0 мл. В дальнейшем все образцы хранили при температуре ≤ –70 °C.

Определение концентрации уридина в крови участников исследования было выполнено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. При разработке методики количественного опреде-

ления уридина в плазме крови человека учитывался опыт других исследований, описанный в доступной литературе[1] [4].

Пробоподготовка проводилась способом осаждения белков ацетонитрилом. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ с использованием тандемного масс-спектрометрического детектора с тройным квадруполем. Разработанная методика была валидирована в соответствии с требованиями Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.) по следующим валидационным параметрам: «селективность, специфичность, пригодность СО, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов, долгосрочная стабильность аналита в матрице». Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 60,00–6000,00 нг/мл в плазме крови, что позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов цитиколина по активному метаболиту уридину.

Статистический анализ данных

Статистический анализ был выполнен в один этап после завершения биоаналитических процедур и расчета фармакокинетических параметров в рамках каждой части КИ. Расчет фармакокинетических параметров и дисперсионный анализ проводили с помощью программного обеспечения R Project, версия 3.5.1 (Package "bear" 2.8.3-2) и пакета MS Excel. Статистический анализ исходных данных субъектов, а также анализ безопасности проводили при помощи программного обеспечения R Project, версия 3.6.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании было скринировано 46 добровольцев с учетом 4 дополнительных субъектов, рандомизация была проведена для 42 субъектов (21 женщина и 21 мужчина). Добровольцы были распределены в одну из 2 групп в соотношении 1:1. Описательная статистика для возраста добровольцев и исходных антропометрических характеристик представлена в таблице 1.

Таблица 1. Демографическая и антропометрическая информация о субъектах, рандомизированных в исследование. Описательная статистика (*N* = 42)

Table 1. Demographic and anthropometric information about subjects randomized to the study. Descriptive statistics (*N* = 42)

	Возраст (лет) Age (years)	Масса тела, кг Body weight, kg	Рост, см) Height, sm	ИМТ, кг/м² BMI, kg/m²
Mean	33,7	71,9	173,0	23.9
SD	6,8	9,3	6,2	2.0
Median	33,5	73,7	172,0	24.1
Min Max	18,0 45,0	54,5 89,2	160,0 189,0	20,4 27,5

За время проведения настоящего исследования не было зарегистрировано ни одного нежелательного явления ни на фоне приема тестируемого препарата GP30121, ни на фоне приема препарата сравнения Цераксон®. Индивидуальные значения показателей безопасности у всех добровольцев находились в пределах физиологической нормы.

По результатам аналитической части исследования изменения концентрации уридина в плазме крови добровольцев до приема ИП примерно совпадали с описанными в литературе (рисунок 1). Минимальные значения концентрации эндогенного уридина приходились на 12:00, что раньше, чем в литературных данных (около 15:00), однако, необходимо учитывать раннее пробуждение добровольцев в день забора биобразцов (около 05:00). При построении профиля концентрации уридина после приема исследуемых препаратов без коррекции на базальный уровень аналита очевиден вклад в данный профиль эндогенного уридина, концентрация которого меняется в соответствии со временем суток, что не позволяет должным образом рассчитать исследуемые для оценки биоэквивалентности фармакокинетические параметры. В частности, наблюдались более высокие концентрации уридина в точке до приема препарата по сравнению с временной точкой «15 минут» после приема препарата, что соответствовало форме кривой эндогенного уридина и нивелировалось при вычитании его концентрации (минимальная концентрация уридина наблюдалась в точке «–10 минут») (рисунок 1).

Концентрация уридина в плазме крови добровольцев после приема ИП и коррекции на базальный уровень аналита не превысила 3368,19 нг/мл.

[1] 6th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence: BA/BE Studies Summit, August 17–19, 2015 Chicago, USA. The bioequivalence of Citicoline 500 mg film tablet. Available at: https://d2cax41o7ahm5l.cloudfront.net/cs/speaker-pdfs/onursal-saglam-novagenix-biyoanalitik-ilac-turkey.pdf. Accessed: 05.2019.

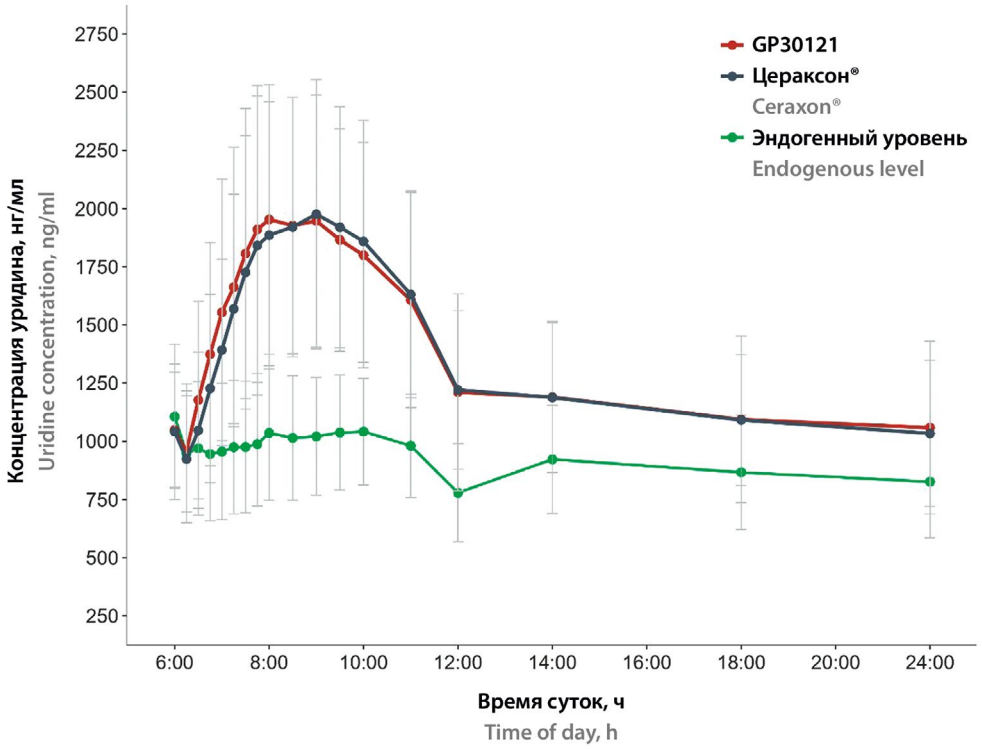


Рисунок 1. Усредненные профили концентрации уридина в плазме крови добровольцев после приема ТП и ПС в сравнении с уровнем эндогенного уридина в зависимости от времени суток. Синим цветом обозначен фармакокинетический профиль основного метаболита ПС Цераксон®, красным – фармакокинетический профиль основного метаболита ТП GP30121, зеленым – концентрация эндогенного уридина

Figure 1. Uridine plasma concentration during both periods after administration of GP30121 and Ceraxon® in comparison with the level of endogenous uridine depending on the time of the day. Blue – PK profile of the main metabolite of Ceraxon®, red – PK profile of the main metabolite of GP30121, green – concentration of endogenous uridine

В ходе проведения фармакокинетического анализа было выявлено, что у 1 субъекта показатель AUC_{0-t} уридина после приема ПС составил 259,39 нг/мл, что оказалось менее 5 % от среднего геометрического AUC_{0-t} уридина после приема ПС (Geom Mean (без учета значения AUC_{0-t} исключенного добровольца) = 5579,12 нг/мл; где 5 % от Geom Mean = 278,96 нг/мл). В связи с этим субъект был исключен из анализа фармакокинетики и оценки биоэквивалентности.

Для каждого добровольца по данным зависимости концентраций уридина в плазме крови от времени были рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: AUC_{0-t}, C_{max}, t_{max}, $t_{1/2}$, K_{el} и $AUC_{0-\infty}$. Для каждого из перечисленных показателей приведены значения описательной статистики (таблица 2).

На рисунке 2 представлены усредненные фармакокинетические профили уридина после коррекции на его эндогенный уровень в плазме крови добровольцев после приема ПС и ТП. Графическое представление данных концентраций демонстрирует, что данные профили имеют совпадающие формы.

Ввиду того, что в исследовании был предусмотрен адаптивный дизайн с последовательным подходом по Potvin, тип С, на основании данных, полученных от 41 субъекта, была проведена оценка биоэквивалентности при $\alpha = 0{,}05$ и стандартных 90%-х доверительных интервалах (ДИ), а также выполнен расчет мощности. Было показано, что значения рассчитанных 90%-х ДИ для отношений геометрических средних основных ФК параметров основного метаболита действующего вещества ИП укладываются в допустимые пределы 80,00–125,00 % (таблица 3).

Однако, при оценке статистической мощности исследования с учетом полученных коэффициентов внутрииндивидуальной вариации фармакокинетических параметров C_{max} (CV_{intra} = 31,21 %) и AUC_{0-t} (CV_{intra} = 31,27 %) было выявлено, что статистическая мощность исследования по фармакокинетическому параметру C_{max} составила 79,64 %, по фармакокинетическому параметру AUC_{0-t} – 79,51 % (менее 80 %). В связи с этим дальнейший анализ биоэквивалентности и оценку гипотезы проводили при уровне значимости $\alpha = 0{,}0294$ и значении ДИ 94,12 % для показателей AUC_{0-t} и Cmax уридина.

Было показано, что значения 94,12%-х ДИ при $\alpha = 0{,}0294$ для отношений геометрических средних основных ФК параметров основного метаболита действующего вещества ИП укладываются в допустимые пределы 80,00–125,00 % (таблица 3).

Таблица 2. **Описательная статистика для фармакокинетических параметров исследуемых препаратов (*N* = 41)**

Table 2. **Descriptive statistics for pharmacokinetic parameters of study drugs (*N* = 41)**

Параметр *Parameter*									
	C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/mL	AUC_{0-t}, нг · ч/мл AUC_{0-t}, ng · h/mL	$AUC_{0-\infty}$, нг · ч/мл $AUC_{0-\infty}$, ng · h/mL	$\ln(C_{max})$	$\ln(AUC_{0-t})$	$\ln(AUC_{0-\infty})$	K_{el}, $ч^{-1}$ K_{el}, h^{-1}	t_{max}, ч t_{max}, h	$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h
Цераксон® *Ceraxon®*									
Mean	1198,78	6745,04	7950,27	6,99	8,68	8,83	0,347	2,41	3,63
Geom Mean	1088,77	5891,42	6844,79	6,98	8,66	8,81	0,259	2,14	2,68
Median	1194,02	6161,66	6856,96	7,09	8,73	8,83	0,241	2	2,88
SD	511,30	3278,29	4018,43	0,46	0,58	0,62	0,271	1,30	3,05
CV, %	42,65	48,60	50,54	6,61	6,65	7,03	78,04	53,86	84,23
Min	323,31	740,19	741,56	5,78	6,61	6,61	0,054	1	0,63
Max	2599,65	15026,56	19683,34	7,86	9,62	9,89	1,110	6	12,78
GP30121									
Mean	1198,78	6745,04	7950,27	6,99	8,68	8,83	0,347	2,41	3,63
Geom Mean	1088,77	5891,42	6844,79	6,98	8,66	8,81	0,259	2,14	2,68
Median	1194,02	6161,66	6856,96	7,09	8,73	8,83	0,241	2	2,88
SD	511,30	3278,29	4018,43	0,46	0,58	0,62	0,271	1,30	3,05
CV, %	42,65	48,60	50,54	6,61	6,65	7,03	78,04	53,86	84,23
Min	323,31	740,19	741,56	5,78	6,61	6,61	0,054	1	0,63
Max	2599,65	15026,56	19683,34	7,86	9,62	9,89	1,110	6	12,78

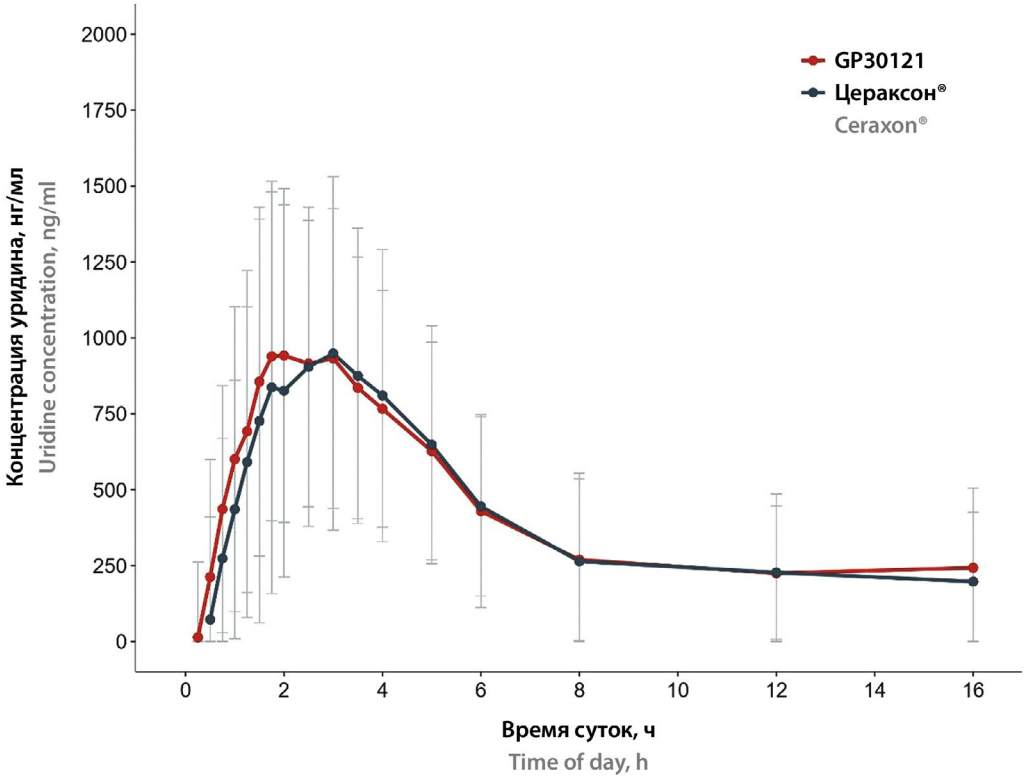


Рисунок 2. **Усреднённые фармакокинетические профили уридина в плазме крови в линейных координатах, Mean ± SD (*N* = 41). По оси *Y* – концентрация уридина в плазме крови (нг/мл), по оси *X* – время после приема ИП. Синим цветом обозначен фармакокинетический профиль основного метаболита ПС Цераксон®, красным – фармакокинетический профиль основного метаболита ТП GP30121**

Figure 2. **Arithmetic mean pharmacokinetic profile on linear scale of uridine. Mean ± SD (*N* = 41). *Y*-axis – uridine plasma concentration (ng/mL), *X*-axis – time after administration of either GP30121 or Ceraxon®. Blue – PK profile of the main metabolite of Ceraxon®, red – PK profile of the main metabolite of GP30121**

Таблица 3. Значения рассчитанных доверительных интервалов для показателей уридина AUC_{0-t} и C_{max}

Table 3. Calculated confidence intervals for uridine AUC_{0-t} and C_{max}

Параметр Parameter	Соотношение геометрических средних, % Ratio of geometric means, %	Нижняя граница, % Lower limit, %	Верхняя граница, % Upper limit, %	Допустимые значения, % Valid values, %
90 % доверительный интервал 90 % confidence interval				
AUC_{0-t}	105,41	94,08	118,10	80–125
C_{max}	106,83	95,37	119,67	80–125
94,12 % доверительный интервал 94,12 % confidence interval				
AUC_{0-t}	105,41	92,43	120,20	80–125
C_{max}	106,83	93,70	121,79	80–125

Следовательно, препараты GP30121, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия), и Цераксон®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг (Ferrer Internacional S.A., Испания) являются биоэквивалентными.

Биологическая ценность цитиколина в основном связана с входящим в его состав холином, являющимся промежуточным продуктом синтеза структурных фосфолипидов клеточных мембран и ацетилхолина. Цитидин после превращения в уридин используется для синтеза ДНК, РНК и фосфолипидов. Поскольку при пероральном приеме цитиколин в организме человека быстро метаболизируется до холина и цитидина, с последующим стремительным дезаминированием последнего до уридина, особенностью проведения данного исследования стала необходимость установления биоэквивалентности для препаратов, основными метаболитами которых являются эндогенные соединения. Данное обстоятельство вносит определенные трудности в оценку фармакокинетики ИП, так как фоновое содержание как холина, так и уридина подвержено суточным колебаниям в соответствии с циркадным ритмом секреции вещества. Такие колебания могут вносить существенные искажения в результаты оценки концентрации препаратов с целью построения их фармакокинетических профилей и расчета основных фармакокинетических параметров.

На сегодняшний день используется несколько научно обоснованных подходов для разработки дизайна исследования биоэквивалентности и последующей оценки результатов в таких случаях [5].

В Российской Федерации строгие требования к исследованиям биоэквивалентности аналогов эндогенных соединений не закреплены, однако, основные рекомендации изложены в Руководстве по экспертизе лекарственных средств и соответствуют европейским рекомендациям. «Исследование концентраций аналогов эндогенных соединений рекомендуется проводить с поправкой на фоновое содержание эндогенного аналита, чтобы исследуемые фармакокинетические параметры относились к дополнительным концентрациям, полученным вследствие приема препарата. В качестве поправки предпочтительно использовать стандартное вычитание: вычитается либо средняя концентрация эндогенного вещества, определенная до приема препарата, либо средняя AUC». Изредка, когда концентрация эндогенного вещества после приема препарата существенно превышает фоновую, поправка на фоновое содержание эндогенного вещества не требуется [6].

Допускается использование супратерапевтических доз исследуемых препаратов, если это необходимо для достоверного измерения концентраций, превосходящих фоновые [6]. «Если ранее не было продемонстрировано разницы в концентрации исследуемых аналитов после приема различных доз, необходимо определить ее либо в пилотном исследовании с использованием различных доз, либо в рамках одного из этапов исследования биоэквивалентности».

В зарубежной практике рекомендуется определять эндогенную концентрацию исследуемого аналита в крови перед каждым этапом исследования и вычитать ее из общей концентрации измеряемого соединения. Если вычитание приводит к отрицательному значению, это значение необходимо принимать за 0 при расчете скорректированной AUC. Статистическую обработку полученных данных рекомендовано проводить как для скорректированных, так и не скорректированных на фоновое значение концентраций исследуемого соединения[1].

В литературе представлено множество исследований биоэквивалентности аналогов эндогенных соединений, подходы к дизайну и обработке результатов в которых разнятся. Как по мнению российских [5], так и зарубежных коллег [7], ни одно из исследований не может быть эталоном подхода к исследованиям эндогенных соединений с определенной фоновой концентрацией. Однако, можно допустить, что рекомендации по проведению исследований препаратов, подобных цитиколину, минимально должны включать следующие пункты:

a) все добровольцы должны быть максимально стандартизированы по демографическим и антропометрическим показателям и диете;
b) длительность и точки забора биобразцов для определения фоновых концентраций должны соответствовать таковым после приема ИП;
c) необходимо использовать методы поправки на фоновую концентрацию соединений, если концентрация после приема препарата незначительно возрастает и несущественно превышает фоновую.

[1] Bioequivalence Studies With Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an ANDA Guidance for Industry, FDA, 2021. Available at: https://www.fda.gov/media/87219/download. Accessed: 10.2022.

Несмотря на то, что корректировка на базальный уровень аналита используется не во всех исследованиях биоэквивалентности цитиколина [4], в данном исследовании было решено использовать именно этот подход, так как он основан на российских и мировых рекомендациях, а также более обширном литературном опыте по исследованиям эндогенных соединений.

В литературе представлены данные исследования изменений концентраций холина и цитидина после приема 2000 мг цитиколина [8]. После приема препарата в данной дозе через 2 часа средняя концентрация холина увеличилась на 48 %, а цитидина, предшественника уридина, на 136 %. По данным другого исследования было показано, что при приеме 500, 2000 и 4000 мг цитиколина концентрация уридина составила 101, 136 и 134 % по сравнению с базальным уровнем, соответственно, а концентрация холина – 23, 32 и 43 %, соответственно [9]. Существуют прецеденты исследований биоэквивалентности, где в качестве аналита также был использован уридин[1] [4]. Эти аргументы обосновывают выбор уридина в качестве показательного метаболита для оценки фармакокинетики ИП.

Результаты, показанные в предыдущих исследованиях, также использованы при выборе дозы препарата. Максимальные концентрации уридина по сравнению с базальным уровнем определялись при приеме 2000 мг цитиколина [13]. На сегодняшний день 2000 мг цитиколина является максимальной терапевтической дозой. При этом в исследовании с похожим подходом при корректировке на базальный уровень уридина после приема препарата в дозе 500 мг максимальная концентрация уридина составила 600–800 нг/мл[2], что предполагает применение аналитической методики с LLOQ около 30 нг/мл (5 % от C_{max}). Принимая во внимание данные обстоятельства, для настоящего исследования была выбрана доза 1000 мг, так как данная доза позволила увеличить разницу между уровнем уридина после приема препарата и базальным уровнем, но в то же время избежать возможных нежелательных явлений препарата.

Однако, данные литературы по значениям вариации основных показателей (AUC и C_{max}), необходимые для расчета числа испытуемых, были представлены только одним исследованием[3]. Недостаточное количество испытуемых, включенных в исследование, могло повлечь за собой реализацию β-ошибки, когда недостаточная мощность исследования оставляет вероятность неподтверждения биоэквивалентности в тех случаях, когда она есть. Проведение двух исследований, одно из которых может расцениваться в качестве пилотного, не является оптимальным выбором для исследований воспроизведенных препаратов, это приведет к увеличению времени выведения препарата на рынок, а также увеличению стоимости процесса его исследования. В связи с этим в данном исследовании был выбран адаптивный дизайн (Potvin C). В данном подходе в первый этап исследования включают когорту добровольцев, численность которой рассчитывают из имеющихся литературных данных, либо может быть принята гипотеза о низкой вариабельности препарата (не более 30 %). После завершения первого этапа проводят промежуточный анализ, который позволяет определить необходимое дополнительное число добровольцев. Затем, после добора добровольцев, производят анализ объединенной выборки и делают вывод о биоэквивалентности. Такой подход относится к широкому спектру групповых последовательных методов с возможностью ранней остановки исследования, как по демонстрации эффективности, так и по бесполезности [10]. Этот спектр методов, по рекомендациям FDA, имеет преимущества с точки зрения этики и достижения эффективности за счет уменьшения ожидаемого размера выборки и продолжительности клинических испытаний, а также ускорения утверждения безопасных и эффективных новых методов лечения[4].

Одним из недостатков подобного дизайна является возможность внесения статистической ошибки, связанной с недостаточным контролем заданного уровня ошибки первого рода. Так как нулевая гипотеза в данном случае будет протестирована дважды, более вероятно ее случайное опровержение. В одной из моделей преодоления последствий такого расчета используется подход S. Pocock, который выражается в сужении рамок отрицания нулевой гипотезы и уменьшения уровня α с 0.05 до 0.0294 [11]. Данная модель учитывается в различных алгоритмах дизайна по Potvin [2].

В настоящем исследовании использовали алгоритм Potvin C, который является оптимальным с той точки зрения, что учитывает как необходимость

[1] 6th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence: BA/BE Studies Summit, August 17-19, 2015 Chicago, USA. The bioequivalence of Citicoline 500 mg film tablet. Available at: https://d2cax41o7ahm5l.cloudfront.net/cs/speaker-pdfs/onursal-saglam-novagenix-biyoanalitik-ilac-turkey.pdf. Accessed: 05.2019.

[2] 6th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence: BA/BE Studies Summit, August 17-19, 2015 Chicago, USA. The bioequivalence of Citicoline 500 mg film tablet. Available at: https://d2cax41o7ahm5l.cloudfront.net/cs/speaker-pdfs/onursal-saglam-novagenix-biyoanalitik-ilac-turkey.pdf. Accessed: 05.2019.

[3] 6th World Congress on Bioavailability & Bioequivalence: BA/BE Studies Summit, August 17-19, 2015 Chicago, USA. The bioequivalence of Citicoline 500 mg film tablet. Available at: https://d2cax41o7ahm5l.cloudfront.net/cs/speaker-pdfs/onursal-saglam-novagenix-biyoanalitik-ilac-turkey.pdf]. Accessed: 05.2019.

[4] Adaptive Design Clinical Trials for Drugs and Biologicals. Food and Drug Administration, 2019. Available at: https://www.fda.gov/media/78495/download. Accessed: 10.2022.

уменьшения уровня α в случае недостижения мощности 80 %, так и предусматривает возможность тестирования гипотезы биоэквивалентности при использовании стандартных 90%-х ДИ в случае достижения заданной мощности в результате первого этапа исследования [2]. При этом существует риск завершения исследования при достижении мощности 80 % и выходе исследуемых соотношений за установленные пределы. В данном исследовании такой проблемы не возникло, вероятно, потому, что препарат характеризуется низкой вариабельностью (не более 30 %). Однако, в случае исследования препаратов, характеризующихся более высокой вариабельностью, необходимо предусмотреть больший объем выборки [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании был показан пример оценки биоэквивалентности препаратов, метаболиты которых синтезируются в организме человека эндогенно, при отсутствии широкого опыта проведения исследований в подобного рода подходе и достаточных литературных данных для планирования размера выборки исследования. В результате была доказана биоэквивалентность, что необходимо для последующей регистрации воспроизведенного препарата.

Таким образом, подобная стратегия проведения исследования биоэквивалентности позволила доказать сопоставимую биодоступность ИП в одобренном регуляторными органами дизайне, что может быть использовано при исследовании других препаратов-предшественников эндогенных соединений.

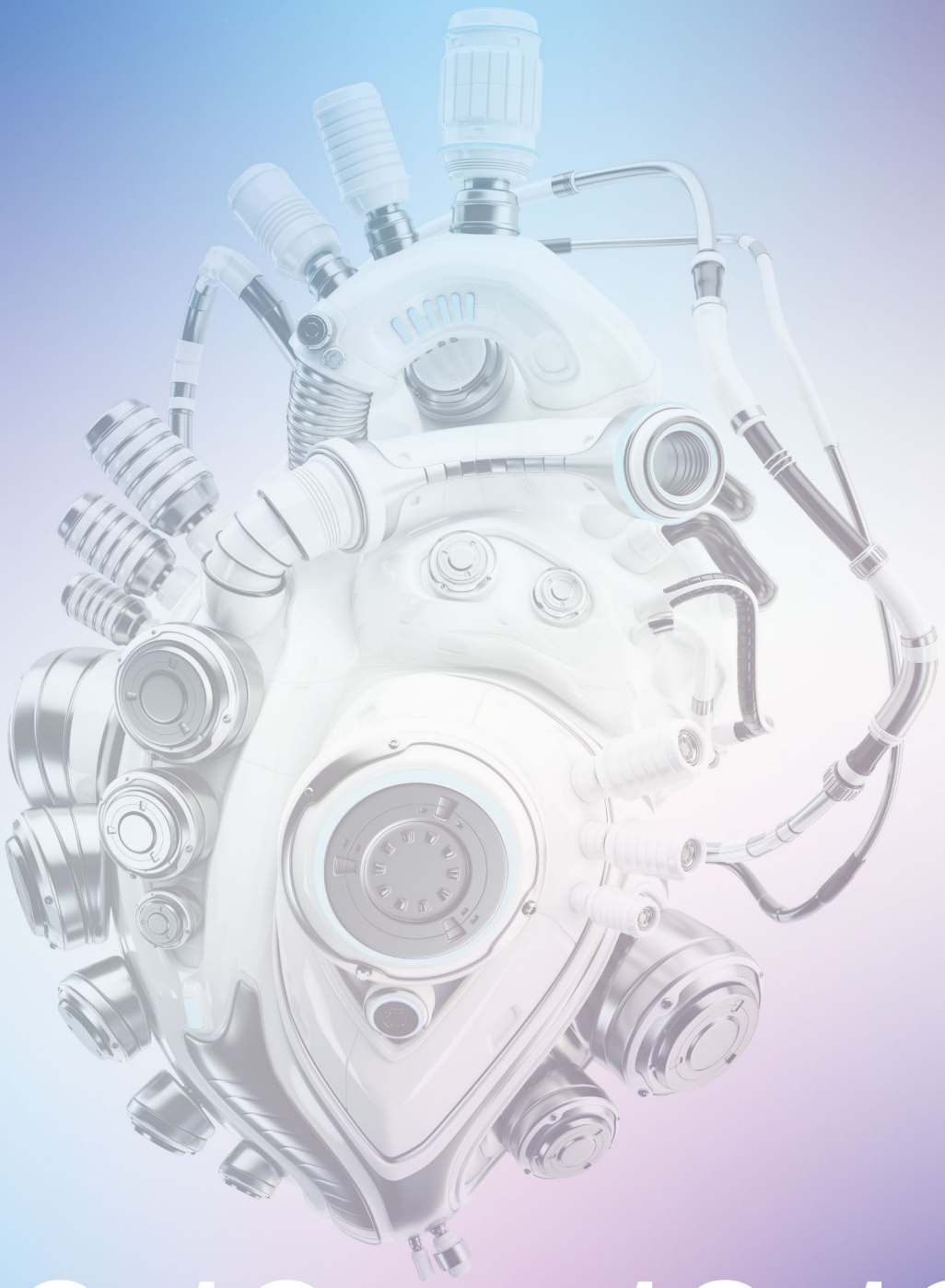
ЛИТЕРАТУРА

1. Feigin V. L., Forouzanfar M. H., Krishnamurthi R., Mensah G. A., Connor M., Bennett D. A., Moran A. E., Sacco R. L., Anderson L., Truelsen T., O'Donnell M., Venketasubramanian N., Barker-Collo S., Lawes C. M., Wang W., Shinohara Y., Witt E., Ezzati M., Naghavi M., Murray C. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2014;383(9913):245–254. DOI: 10.1016/s0140-6736(13)61953-4.
2. Potvin D., DiLiberti C., Hauck W., Parr A., Schuirmann D., Smith R. A. Sequential design approaches for bioequivalence studies with crossover designs. *Pharmaceutical Statistics*. 2008;7(4):245–262. DOI: 10.1002/pst.294.
3. Peters G. J. Re-evaluation of Brequinar sodium, a dihydroorotate dehydrogenase inhibitor. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2018;37(12):666–678. DOI: 10.1080/15257770.2018.1508692.
4. Chen K., Liu X., Wei C., Yuan G., Zhang R., Li R., Wang B., Guo R. Determination of Uridine in Human Plasma by HPLC and its Application in Citicoline Sodium Pharmacokinetics and Bioequivalence Studies. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. 2011;3(4):072–076. DOI: 10.4172/JBB.1000062.
5. Адонин В. К., Ромодановский Д. П., Ниязов Р. Р. Особенности проведения исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов -аналогов эндогенных соединений. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;3:3–7.
6. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС; 2014. 344 с.
7. Dissanayake S. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances ('endogenous drugs'): considerations to optimize study design. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2010;69(3):238–244. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2009.03585.x.
8. Lopez G-Coviella I., Agut J., Von Borstel R., Wurtman R. J. Metabolism of cytidine (5?) – diphosphocholine (cdp-choline) following oral and intravenous administration to the human and the rat. *Neurochemistry International*. 1987;11(3):293–297. DOI: 10.1016/0197-0186(87)90049-0.
9. Wurtman R. J., Regan M., Ulus I., Yu L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochemical Pharmacology*. 2000;60(7):989–992. DOI: 10.1016/s0006-2952(00)00436-6.
10. Бондарева И. Б. Адаптивный дизайн в клинических исследованиях: преимущества и риски. *Качественная клиническая практика*. 2017;3:23–34. DOI: 10.24411/2588-0519-2017-00018.
11. Pocock S. Group sequential methods in the design and analysis of clinical trials. *Biometrika*. 1977;64(8):191–199. DOI: 10.2307/2335684.
12. Талибов О. Б. Использование адаптивного дизайна в исследованиях биоэквивалентности (обзор). *Вестник Росздравнадзора*. 2015;2:31–34.

REFERENCES

1. Feigin V. L., Forouzanfar M. H., Krishnamurthi R., Mensah G. A., Connor M., Bennett D. A., Moran A. E., Sacco R. L., Anderson L., Truelsen T., O'Donnell M., Venketasubramanian N., Barker-Collo S., Lawes C. M., Wang W., Shinohara Y., Witt E., Ezzati M., Naghavi M., Murray C. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2014;383(9913):245–254. DOI: 10.1016/s0140-6736(13)61953-4.
2. Potvin D., DiLiberti C., Hauck W., Parr A., Schuirmann D., Smith R. A. Sequential design approaches for bioequivalence studies with crossover designs. *Pharmaceutical Statistics*. 2008;7(4):245–262. DOI: 10.1002/pst.294.
3. Peters G. J. Re-evaluation of Brequinar sodium, a dihydroorotate dehydrogenase inhibitor. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2018;37(12):666–678. DOI: 10.1080/15257770.2018.1508692.
4. Chen K., Liu X., Wei C., Yuan G., Zhang R., Li R., Wang B., Guo R. Determination of Uridine in Human Plasma by HPLC and its Application in Citicoline Sodium Pharmacokinetics and Bioequivalence Studies. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. 2011;3(4):072–076. DOI: 10.4172/JBB.1000062.
5. Adonin V. K., Romodanovskiy D. P., Niyazov R. R. Specific features of the bioequivalence study of drugs – analogs of endogenous compounds. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya*. 2015;3:3–7. (In Russ.)
6. Mironov A. N., Guidelines for the Medicinal Products Examination. Volume III. Moscow: POLIGRAF-PLYuS; 2014. 344 p. (In Russ.)
7. Dissanayake S. Assessing the bioequivalence of analogues of endogenous substances ('endogenous drugs'): considerations to optimize study design. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2010;69(3):238–244. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2009.03585.x.
8. Lopez G-Coviella I., Agut J., Von Borstel R., Wurtman R. J. Metabolism of cytidine (5?) – diphosphocholine (cdp-choline) following oral and intravenous administration to the human and the rat. *Neurochemistry International*. 1987;11(3):293–297. DOI: 10.1016/0197-0186(87)90049-0.
9. Wurtman R. J., Regan M., Ulus I., Yu L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochemical Pharmacology*. 2000;60(7):989–992. DOI: 10.1016/s0006-2952(00)00436-6.
10. Bondareva I. B. Adaptive designs in clinical trials: benefits and risks. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*. 2017;3:23–34. (In Russ.) DOI: 10.24411/2588-0519-2017-00018.
11. Pocock S. Group sequential methods in the design and analysis of clinical trials. *Biometrika*. 1977;64(8):191–199. DOI: 10.2307/2335684.
12. Talibov O. B. Adaptive design in bioequivalence studies (a review). *Vestnik Roszdravnadzora*. 2015;2:31–34. (In Russ.)

БИОТЕХМЕД



09.10 — 10.10

Сочи

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-229-239
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Определение фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров[1, 2], П. А. Карпова[1]✉, О. А. Арчакова[1], Д. С. Щелгачева[1], П. К. Карнакова[1], Н. С. Багаева[1], К. Я. Заславская[3], П. А. Белый[3], И. Е. Шохин[1]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики». 117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
[3] Общество с ограниченной ответственностью «ПРОМОМЕД РУС», 129090, Россия, г. Москва, Проспект Мира, д. 13 стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Карпова Полина. А. **E-mail:** p.karpova@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; П. А. Карпова – https://orcid.org/0000-0001-6777-5976; О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Д. С. Щелгачева – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001; П. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; К. Я. Заславская – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; П. А. Белый – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 14.07.2023 **Статья принята в печать:** 18.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Одним из наиболее известных препаратов широкого спектра действия против многих РНК-вирусов, в том числе и вируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)] является фавипиравир. За счет своей структуры фавипиравир встраивается в РНК вируса и блокирует его дальнейшую репликацию в клетке организма человека. Также фавипиравир указан в перечне жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что подтверждает значимость для российского здравоохранения этого лекарственного средства в борьбе с распространенными РНК-вирусами. Нами уже были опубликованы биоаналитические методики определения фавипиравира в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) с целью изучения фармакокинетики фавипиравира при парентеральном введении (аналитический диапазон методики составил 0,25–200,00 мкг/мл для дозировки фавипиравира 400 мг в 1 флаконе лиофилизата для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий) и методом ВЭЖХ с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) с целью изучения фармакокинетики β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира при их совместном определении в плазме крови при пероральном введении (аналитический диапазон методики составил 250,00–20000,00 нг/мл для дозировки фавипиравира 400 мг в 1 таблетке). Ожидание низких значений концентраций фавипиравира (в данном исследовании дозировка фавипиравира в рассматриваемых лекарственных средствах составляет 200 мг в 1 таблетке) и, в связи с этим расширение диапазона за счет снижения значения нижнего предела количественного определения (НПКО), применяемого в данном исследовании, обуславливает необходимость разработки другой методики. Поэтому в настоящем исследовании освещается разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС с аналитическим диапазоном 50,00–15000,00 нг/мл.

Цель. Разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС для дальнейшего исследования фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств фавипиравира является целью настоящего исследования.

Материалы и методы. В процессе пробоподготовки использовался способ осаждения белков метанолом. Раствор меченного стабильными изотопами фавипиравира-13C3 применялся как внутренний стандарт, подвижной фазой служили 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А) и метанол (элюент В). Хроматографическая колонка – Phenomenex Kinetex C18, 100 × 3,0 мм. Определение фавипиравира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ посредством тандемного масс-спектрометрического детектора с тройным квадруполем. Аналитический диапазон для фавипиравира – 50,00–15000,00 нг/мл в плазме крови человека.

Результаты и обсуждение. Проведение валидации разработанной методики было осуществлено по следующим параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, эффект матрицы, перенос пробы, степень извлечения, НПКО, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналита; краткосрочная стабильность; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС с подтвержденным аналитическим диапазоном 50,00–15000,00 нг/мл в плазме крови человека. Данная методика позволяет использовать ее для аналитической части исследований фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств, содержащих фавипиравир, с целью расширения их ассортимента на отечественном фармацевтическом рынке.

Ключевые слова: фавипиравир, плазма, COVID-19, валидация, ВЭЖХ-МС/МС, фармакокинетика, биоэквивалентность

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

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева и П. А. Карпова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. П. К. Карнакова занималась подготовкой проб к работе. Н. С. Багаева отвечала за статистическую обработку полученных данных. И. Е. Шохин, К. Я. Заславская и П. А. Белый обеспечивали организацию исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Карпова П. А., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Карнакова П. К., Багаева Н. С., Заславская К. Я., Белый П. А., Шохин И. Е. Определение фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):229–239. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-229-239

© Комаров Т. Н., Карпова П. А., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Карнакова П. К., Багаева Н. С., Заславская К. Я., Белый П. А., Шохин И. Е., 2023
© Komarov T. N., Karpova P. A., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Karnakova P. K., Bagaeva N. S., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Shohin I. E., 2023

Determination of Favipiravir in Human Blood Plasma by HPLC-MS/MS

Timofey N. Komarov[1, 2], Polina A. Karpova[1]✉, Olga A. Archakova[1], Dana S. Shchelgacheva[1], Polina K. Karnakova[1], Natalia S. Bagaeva[1], Kira Ya. Zaslavskaya[3], Petr A. Bely[3], Igor E. Shohin[1]

[1] LLC "Center for Pharmaceutical Analytics". 8, Simferopolsky Boulevard, Moscow, 117149, Russia
[2] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
[3] LLC «PROMOMED RUS». 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ **Corresponding author:** Polina A. Karpova. **E-mail:** p.karpova@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Polina A. Karpova – https://orcid.org/0000-0001-6777-5976; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Dana S. Shchelgacheva – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001; Polina K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Kira Ya. Zaslavskaya – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; Petr A. Bely – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 14.07.2023 **Revised:** 18.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Favipiravir is one of the most well-known broad-spectrum drugs against many RNA viruses, including the severe acute respiratory syndrome virus 2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)]. Due to its structure, favipiravir is embedded in the RNA of the virus and blocks its further replication in the cell of the human body. Favipiravir is also included in the list of vital and essential medicines, which confirms the importance for Russian healthcare of this drug in the fight against common RNA viruses. We have already published bioanalytical methods for determining favipiravir in human blood plasma by high-performance liquid chromatography with an ultraviolet detector (HPLC–UV) in order to study the pharmacokinetics of favipiravir with parenteral administration (the analytical range of the technique was 0.25–200.00 μg/ml for the dosage of favipiravir 400 mg in 1 vial of lyophilizate for the preparation of concentrate for the preparation of solution for infusions) and by HPLC with tandem mass-selective detection (HPLC-MS/MS) in order to study the pharmacokinetics of β-D-N4-hydroxycytidine and favipiravir in their joint determination in blood plasma with oral administration (the analytical range of the technique was 250.00–20000.00 ng/ml for the dosage of favipiravir 400 mg in 1 tablet). The expectation of low favipiravir's concentrations (the dosage of favipiravir in the drugs in question is 200 mg in 1 tablet in this study) and, in this regard, the expansion of the range by reducing the value of the lower limit of quantitative determination (LLOQ) used in this study necessitates the development of another method. Therefore, this study is given the development and validation of a method for determining favipiravir in human blood plasma by HPLC-MS/MS with an analytical range of 50.00–15000.00 ng/ml.

Aim. The aim of this study is to develop a method for quantitative determination of favipiravir in human blood plasma by HPLC-MS/MS for further for further researches of pharmacokinetics and bioequivalence of drugs.

Materials and methods. In the process of sample preparation, a method of proteins precipitation with methanol was used. A solution labeled with stable isotopes of favipiravir-13C3 was used as an internal standard, the mobile phase was a 0.1 % solution of formic acid in water (eluent A) and methanol (eluent B). Chromatographic column – Phenomenex Kinetex C18, 100×3.0 mm. The determination of favipiravir in human blood plasma was carried out by HPLC using a tandem mass spectrometric detector with a triple quadrupole. The analytical range for favipiravir is 50.00–15000.00 ng/ml in human blood plasma.

Results and discussion. This method was validated by selectivity, calibration curve, accuracy, precision, matrix effect, spike recovery, carry-over effect, the lower limit of quantification and stability.

Conclusion. A method of quantitative favipiravir's determination in human blood plasma by HPLC-MS/MS with a confirmed analytical range of 50.00–15000.00 ng/ml in human blood plasma has been developed and validated. This method allows using it for the analytical part of pharmacokinetics and bioequivalence studies of drugs containing favipiravir in order to expand their range in the domestic pharmaceutical market.

Keywords: favipiravir, human blood plasma, validation, COVID-19, validation, HPLC-MS/MS, pharmacokinetics, bioequivalence

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

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva and Polina A. Karpova participated in the development and validation of the bioanalytical methodology. Polina K. Karnakova was preparing samples for work. Natalia S. Bagaeva was responsible for the statistical processing of the received data. Igor E. Shokhin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely Bely provided organization of the study. All the above authors participated in the discussion of the obtained results in the form of a scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Karpova P. A., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Karnakova P. K., Bagaeva N. S., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Shohin I. E. Determination of favipiravir in human blood plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(3):229–239. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-229-239

ВВЕДЕНИЕ

Фавипиравир как противовирусное лекарственное средство широкого спектра действия изначально изучался в качестве средства терапии тяжелых инфекций, которые вызывают различные РНК-вирусы. К таким вирусам относят вирус гриппа, аренавирусы (Хунин, Мачупо и Пичинде), флебовирусы (лихорадка Рифт-Вэлли, Пунта-Торо), хантавирусы (Мапорал, Добрава и Проспект-Хилл), флавивирусы (вирус желтой лихорадки и Западного Нила), энтеровирусы (вирус полиомиелита и риновирусы), альфавирус, парамиксовирус, респираторно-синцитиальный вирус и норовирусы. Однако вскоре после начала коронавирусной пандемии данное лекарственное средство стали рассматривать для лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)] [1, 2].

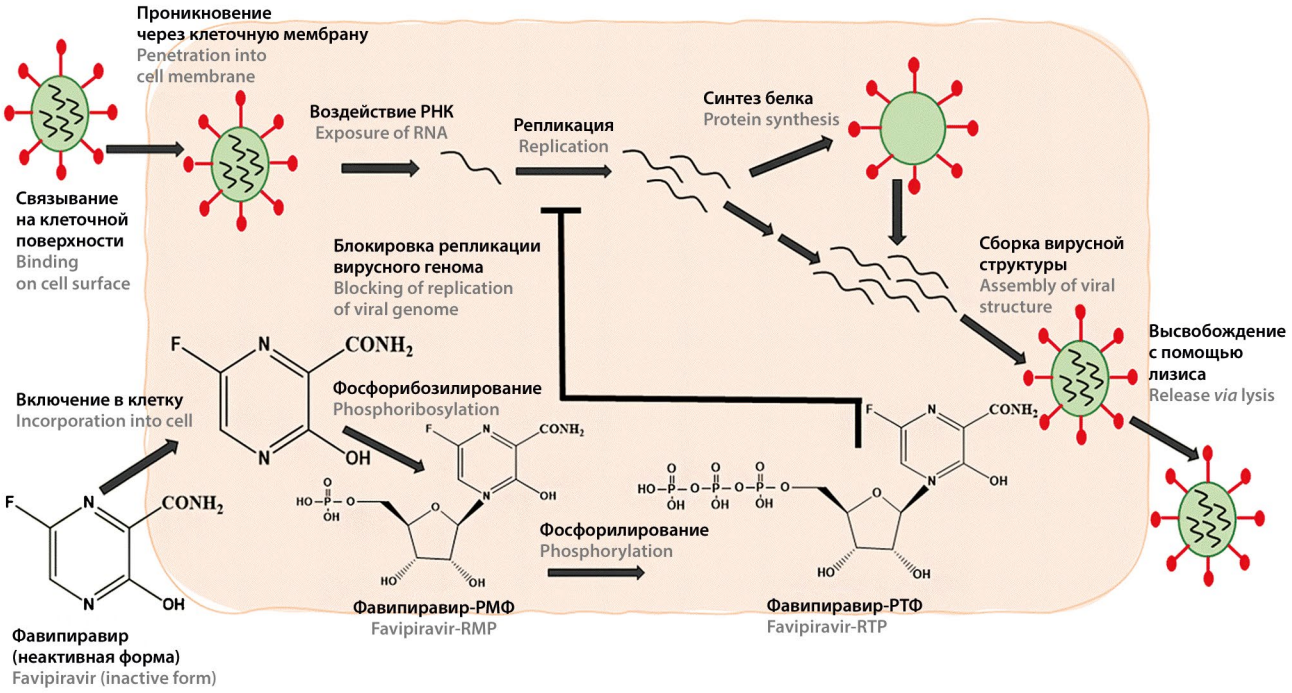


Рисунок 1. Схематическое представление механизма действия фавипиравира в клетке против вируса [6]

Figure 1. Schematic representation of the mechanism favipiravir's action [6]

Стоит отметить, что фавипиравир является пролекарством: при попадании в клетки организма человека молекула фавипиравира вследствие трансформации превращается в активную форму – рибозилтрифосфат. Благодаря образованию данной активной формы фавипиравира данное вещество относят к производным пиразина, которое после трансформации в клетке ингибирует синтез вирусной РНК. Ингибирование репликации вируса основано на включении активной формы молекулы фавипиравира в вирусную РНК ферментом РНК-зависимой РНК-полимеразой [RNA dependent RNA polymerase (RdRp)] и дальнейшем мутагенезе в дочерних РНК вируса (рисунок 1) [3–5].

Максимальная концентрация (C_{max}) фавипиравира в плазме крови человека наблюдается через 2 часа после приема внутрь, а затем быстро снижается. Период полувыведения ($t_{1/2}$) данного лекарственного средства составляет от 2 до 5,5 часов. Фавипиравир подвергается метаболизму в цитозоле печени, главным образом, альдегидоксидазой и частично ксантиноксидазой, с образованием неактивного метаболита (T-705M1), которой затем выводится почками [5]. Основными нежелательными реакциями рассматриваемого препарата являются тератогенность и эмбриотоксичность. Поэтому фавипиравир не назначают беременным женщинам или женщинам, которые предположительно беременны. Другими нежелательными реакциями данного лекарственного препарата являются такие желудочно-кишечные расстройства как рвота, диарея, тошнота, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки и функциональная диспепсия [6, 7].

Фавипиравир входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что указывает на значимость данного лекарственного средства для российского здравоохранения в борьбе с распространенными РНК-вирусами[1].

В литературе опубликованы всевозможные исследования по определению фавипиравира в различных биологических жидкостях с целью проведения исследований фармакокинетики и биоэквивалентности. Для определения данного лекарственного средства в биологических объектах применяются методы сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra performance liquid chromatography – tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS)], ультрафиолетовым детектированием

[1] Распоряжение Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2023 год, перечня лекарственных препаратов для медицинского применения, в том числе лекарственных препаратов для медицинского применения, назначаемых по решению врачебных комиссий медицинских организаций, перечня лекарственных препаратов, предназначенных для обеспечения лиц, больных гемофилией, муковисцидозом, гипофизарным нанизмом, болезнью Гоше, а также минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». (ред. от 30.03.2022). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/. Ссылка активна на 15.07.2023.

(ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography – ultraviolet detection (HPLC-UV)], а также с высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS)] [8].

Рассмотренные биоаналитические методики определения фавипиравира методами ВЭЖХ с различными видами детектирования либо обладают низкой чувствительностью, либо требуют длительного времени анализа и больших объемов образца биологической матрицы. Способами пробоподготовки служат твердо-фазовая экстракция, осаждение белков различными органическими растворителями, осаждение с последующими разбавлением или жидкость-жидкостной экстракцией (ЖЖЭ) [liquid–liquid extraction (LLE)], жидкость-жидкостная экстракция. Также в методиках рассматриваются в качестве объекта исследований не только плазма крови человека, но и сыворотка крови, и грудное молоко человека (таблица 1).

До настоящего времени в литературных источниках не было опубликовано методик определения фавипиравира в плазме крови человека с использованием в качестве внутреннего стандарта (ВС) [internal standard (IS)], меченного стабильными изотопами фавипиравира – *фавипиравир-13С3*. Нами уже были разработаны методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ с целью изучения фармакокинетики фавипиравира при парентеральном введении (аналитический диапазон методики составил 0,25–200,00 мкг/мл для дозировки фавипиравира 400 мг в 1 флаконе лиофилизата для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий) [11] и совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС при пероральном введении (аналитический диапазон методики составил 250,00–20000,00 нг/мл для дозировки фавипиравира 400 мг в 1 таблетке) [13]. В связи с тем, что концентрации фавипиравира в плазме крови ожидались низкими для описанных выше аналитических диапазонов (в данном исследовании дозировка фавипиравира составляет 200 мг в 1 таблетке), то ранее используемый нами аналитический диапазон не подходил для данного исследования фармакокинетики и биоэквивалентности. Поэтому в настоящем исследовании приводится описание разработки и валидации методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС в аналитическом диапазоне 50,00–15000,00 нг/мл. В качестве пробоподготовки был использован простой и в то же время доступный способ осаждения белков метанолом, в качестве элюента А подвижной фазы является 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему), элюента В – метанол.

Таблица 1. Методики биоаналитических исследований количественного определения фавипиравира

Table 1. Bioanalytical methods of favipiravir quantitative determination

Аналитический метод Analytical method	Объект анализа Object	Примечания по пробоподготовке Sample preparation's notes	Аналитический диапазон Analytical range	Ссылка Reference
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека, грудное молоко человека Human plasma, human breast milk	Твердофазная экстракция Solid-phase extraction	0,50–20,00 мкг/мл 0.50–20.00 μg/mL	[9]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение трифторуксусной кислотой и последующая ЖЖЭ Protein precipitation of proteins with trifluoroacetic acid and subsequent LLE	0,10–100,00 мкг/мл 0.10–100.00 μg/mL	[10]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение метанолом Protein precipitation with methanol	0,25–200,00 мкг/мл 0.25–200.00 μg/mL	[11]
СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	50,00–10000,00 нг/мл 50.00–10000.00 ng/mL	[12]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение 0,1%-м раствором муравьиной кислоты в ацетонитриле Protein precipitation with 0.1 % formic acid solution in acetonitrile	250,00–20000,00 нг/мл 250.00–20000.00 ng/mL	[13]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Сыворотка крови человека Human serum	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	0,048–50,000 мкг/мл 0.048–50.000 μg/mL	[14]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ацетонитрилом с последующим разбавлением Protein precipitation with acetonitrile followed by dilution	500,00–50000,00 нг/мл 500.00–50000.00 ng/mL	[15]
СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	0,50–100,00 мкг/мл 0.50–100.00 μg/mL	[16]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Сыворотка крови человека Human serum	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	1,60–600,00 мкг/мл 1.60–600.00 μg/mL	[17]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование было проведено на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR с тандемным масс-спектрометрическим детектором с тройным квадруполем LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, вакуумным дегазатором, краном переключения линии потока высокого давления (FCV-20AH2), автосамплером и устройством автоматической подачи образцов в автодозатор (Rack Changer II). Обработку первичных данных осуществляли при помощи программного обеспечения LabSolutions (ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония) [8, 18].

Реактивы и растворы

В исследовании были использованы следующие реактивы:

- ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО «ТД ХИММЕД», Россия);
- муравьиная кислота (класс «for analysis», PanReac, Испания);
- метанол (класс «х.ч.», ООО «ТД ХИММЕД», Россия);
- вода деминерализованная, класс чистоты I.

Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы субстанции фавипиравира (АО «Биохимик», Россия, содержание 100,40 %) и фавипиравира-13С3 [Toronto Research Chemicals Inc., Канада, содержание 98,42 % (ВЭЖХ чистота) и 98,20 % (изотопная чистота)].

Исходный стандартный раствор фавипиравира был приготовлен путем растворения точной навески субстанции в ацетонитриле класса «х.ч.». Рабочие стандартные растворы были приготовлены разведением аликвоты исходного стандартного раствора тем же растворителем в соответствии с таблицами 2 и 3.

При приготовлении рабочего стандартного раствора ВС фавипиравира-13С3 точную навеску стандартного образца фавипиравира-13С3 количественно переносили в мерную колбу и растворяли также в ацетонитриле класса «х.ч.».

Хранение образцов интактной плазмы крови, исходные и рабочие стандартные растворы было при температуре от –50 до –35 °С в морозильной камере.

Пробоподготовка

К помещенной в микропробирки типа «Эппендорф» аликвоте 200 мкл калибровочного образца (КО), образца контроля качества (КК) или образца интактной плазмы крови прибавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора ВС, прибавляли 400 мкл осадителя. Затем раствор перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд, далее центрифугировали с ускорением 15000 g в течение 15 минут. После данных этапов пробоподготовки супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в лотки автодозатора Rack Changer II хроматографа.

Таблица 2. Концентрации фавипиравира и фавипиравира-13С3 в калибровочных образцах

Table 2. Concentrations of favipiravir and favipiravir-13C3 at calibration levels

Уровень Level	Концентрация фавипиравира, нг/мл Favipiravir concentration, ng/mL	Концентрация фавипиравира-13С3, нг/мл Favipiravir-13C3 concentration, ng/mL
1	50,00	1283,74
2	100,00	
3	500,00	
4	1000,00	
5	2500,00	
6	5000,00	
7	10000,00	
8	15000,00	

Таблица 3. Концентрации фавипиравира и фавипиравира-13С3 в образцах контроля качества (КК)

Table 3. Concentrations of favipiravir and favipiravir-13C3 at quality control (QC) samples

Уровень Level	Концентрация фавипиравира, нг/мл Favipiravir concentration, ng/mL	Концентрация фавипиравира-13С3, нг/мл Favipiravir-13C3 concentration, ng/mL	Примечания Notes
LLOQ	50,00	1283,74	LLOQ – нижний предел количественного определения. L – низкий уровень концентрации M1 и M2 – средние уровни концентраций. H – высокий уровень концентрации LLOQ – lower limit of quantification. L – low level of concentration. M1 and M2 – middle levels of concentration. H – high level of concentration
L	150,00		
M1	3000,00		
M2	7500,00		
H	12000,00		

Условия хроматографического разделения и детектирования

- *Хроматографическая колонка*: Phenomenex Kinetex C18, 100 × 3.0 mm, 5 um.
- *Предколонка*: Phenomenex SecurityGuard™. Cartridges Widepore C18 4x3,0 мм.
- *Температура термостата колонки*: 40 °С.
- *Подвижная фаза*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему) (элюент А); метанол (элюент В).

- *Скорость потока подвижной фазы*: 0,85 мл/мин.
- Градиент состава подвижной фазы представлен на рисунке 2.
- *Объем пробы при вводе*: 10 мкл.
- *Время удерживания фавипиравира и фавпиравира-13С3*: около 1,2 мин.
- *Время регистрации хроматограммы*: 0,0–3,75 мин.
- Напряжение на капилляре электроспрея, режим ионизации и условия детектирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Масс-спектрометрические условия детектирования фавипиравира и фавипиравира-13С3

Table 4. Mass-spectrometric conditions of favipiravir and favipiravir-13C3

	Условия детектирования Detection conditions	Напряжение на капилляре электроспрея Electrospray capillar voltage	Режим ионизации Ion mode
ФАВ FAV	156,20 → 113,10 m/z 156,20 → 65,00 m/z 156,20 → 58,20 m/z	–4,9 kV	Отрицательный Negative
ФАВ-13С3 FAV-13C3	159,15 → 115,05 m/z 159,15 → 86,10 m/z		

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка биоаналитической методики

В рамках разработки при выборе ВС опирались на сходство по структурным и физико-химическим свойствам с анализируемым веществом, что может занимать достаточное количество времени. Поэтому в качестве ВС был выбран меченный стабильными изотопами фавипиравир – *фавипиравир-13С3*.

Во время разработки условий масс-спектрометрического детектирования были определены прекурсор-ионы, образующиеся в режиме отрицательной ионизации, и дочерние ионы фавипиравира и фавипиравира-13С3, получаемые при разнообразных энергиях соударения. Также была проведена оптимизация напряжений в оптической системе масс-спектрометрического детектора с целью увеличения интенсивности сигналов. В качестве источника ионизации был использован электроспрей.

После разработки условий масс-спектрометрического детектирования фавипиравира и фавипиравира-13С3 приступили к подбору подходящих для их разделения хроматографической колонки, подвижной фазы, а также градиента состава подвижной фазы. Благодаря подобранным условиям хроматографического разделения времена удерживания фавипиравира и фавипиравира-13С3 были получены около 1,2 минуты для обоих веществ, что дало возможность разработать короткую по времени методику. Также удалось достигнуть эффективного разделения веществ с компонентами матрицы и получить оптимальную форму хроматографических пиков аналита и ВС.

В качестве осадителя был выбран метанол, так как он обеспечивал наиболее полное осаждение белков плазмы крови человека. Независимо от того, что в литературных источниках приводятся другие разнообразные способы пробоподготовки, выбранный нами способ позволил облегчить данный этап и получить методику, соответствующую актуальным требованиям нормативной документации.

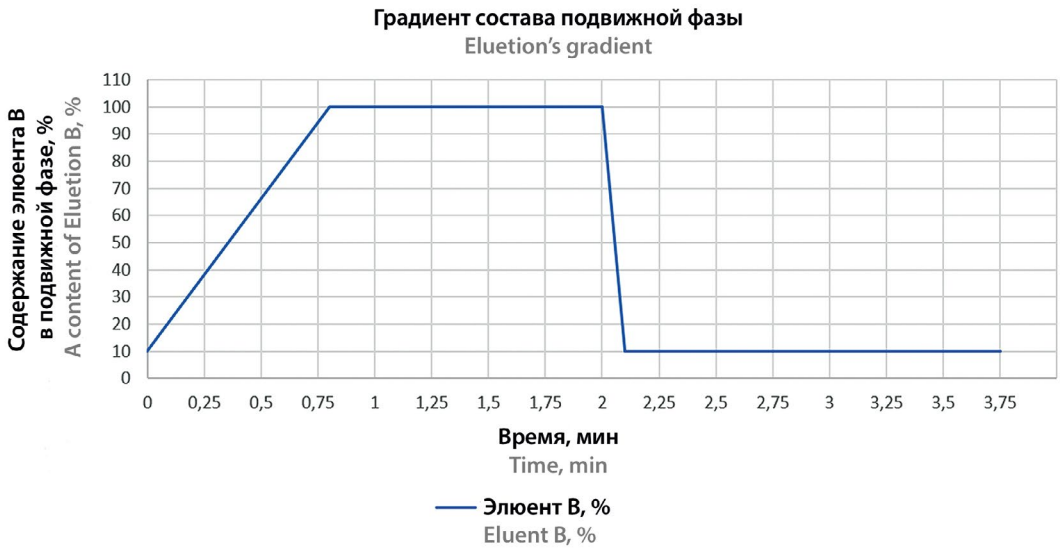


Рисунок 2. Градиент состава подвижной фазы

Figure 2. Eluetion's gradient

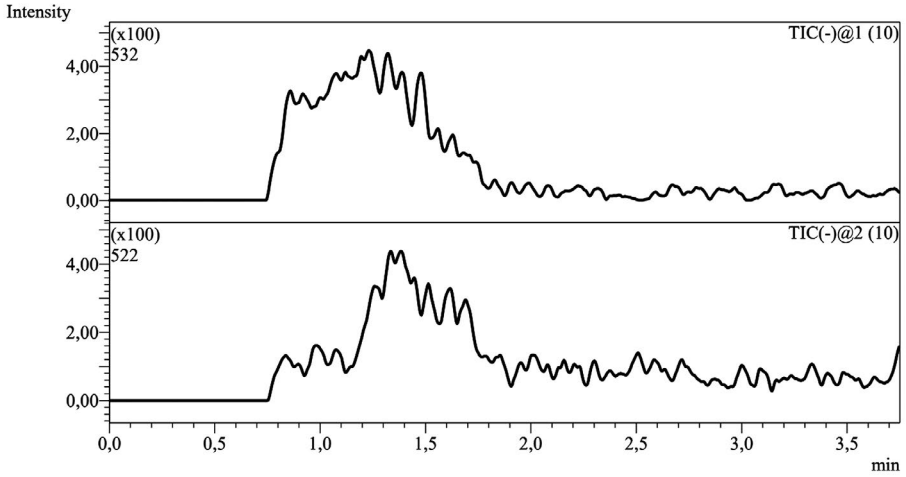


Рисунок 3. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови (пример)**

Figure 3. **Blank human blood plasma sample chromatogram (example)**

Валидация биоаналитической методики

Валидация методики определения фавипиравира была проведена в рамках исследования фармакокинетики и биоэквивалентности в плазме крови человека, следуя правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза[1], а также руководствами EMA[2] и FDA[3], по таким параметрам как селективность, калибровочная кривая, эффект матрицы, точность и прецизионность на уровнях LLOQ, L, M1, M2, H (таблица 3) как внутри циклов, так и между циклами, степень извлечения (СИ), перенос пробы, нижний предел количественного определения (НПКО), стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов анализируемого вещества; краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке; долгосрочная стабильность аналита в матрице) [8, 18].

Селективность

При оценки данного параметра валидации был проведен анализ образцов интактной, гиперлипидемической интактной и гемолизной интактной плазмы крови, полученных из различных источников ($n = 6$), а также образцов с прибавлением рабочего стандартного раствора фавипиравира № 1 и рабочего стандартного раствора ВС (см. таблицу 2).

На хроматограммах образцов интактной плазмы крови сигналы пиков, соответствующих временам удерживания фавипиравира и фавипиравира-13C3, не превышали допустимые предписания критериев приемлемости: не более +20 % от сигнала на уровне НПКО и не более +5 % от сигнала ВС соответственно. Пример хроматограммы образца интактной плазмы крови приведен на рисунке 3.

Калибровочная кривая

Проводили анализ калибровочных образцов ($n = 8$), приготовленных на интактной плазме крови с добавлением и рабочих стандартных растворов фавипиравира и рабочего стандартного раствора фавипиравира-13C3 для того, чтобы получить соответствующие уровням 1–8 концентрации аналита и ВС (таблица 2).

Калибровочные графики были построены по найденым данным в координатах отношение площади пика фавипиравира к площади пика фавипиравира-13C3 от отношения концентрации фавипиравира к концентрации фавипиравира-13C3 в плазме крови человека (пример калибровочного графика приведен на рисунке 4).

Калибровочные кривые имели линейную зависимость, и полученные коэффициенты корреляции соответствовали предписанию (не менее 0,99). По уравнению линейной зависимости были рассчитаны отклонения концентраций КО от номинальных значений. Полученные отклонения не выходили за пределы критериев приемлемости: не более +20 % для 1 уровня калибровочной кривой (НПКО) и не более +15 % для уровней 2–8.

[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 15.07.2023.

[2] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation. Assessed: 15.07.2023.

[3] Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry. Assessed: 15.07.2023.

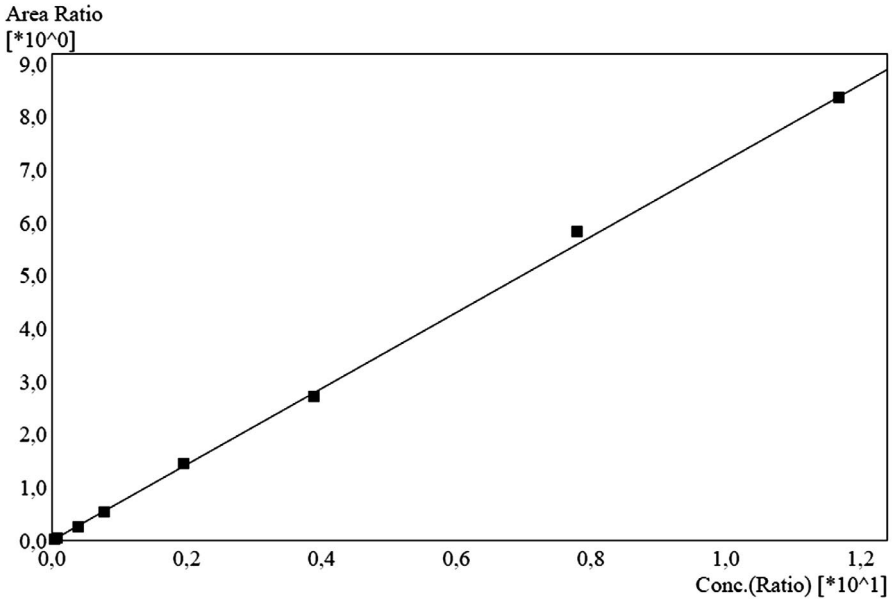


Рисунок 4. **Калибровочный график (пример)**

Figure 4. **Calibration curve (example)**

Эффект матрицы

Для изучения данного параметра были приготовлены образцы интактной, гиперлипидемической интактной и гемолизной интактной плазмы крови без учета влияния степени извлечения из интактной плазмы крови ($n = 6$) и без влияния интактной плазмы крови ($n = 6$) на уровнях L и H (таблица 3). Эффект матрицы для фавипиравира-13C3 был рассчитан на уровне концентрации 1283,74 нг/мл.

Относительное стандартное отклонение (RSD, %) фактора матрицы, нормализованного по ВС, не превышало 15 % на уровнях L и H (таблица 5).

Точность и прецизионность

Была проведена оценка образцов КК, соответствующие уровням LLOQ, L, M1, M2 и H (см. таблицу 3). Данный анализ проводили по 5 вводов образца КК для каждого из 5 уровней концентраций фавипиравира в рамках 3 валидационных циклов.

Точность и прецизионность методики анализировались внутри циклов, а также между циклами. По найденным значениям концентраций фавипиравира были рассчитаны величины RSD и относительной погрешности (E, %). Найденные данные соответствовали критериям приемлемости: не более 15 % для уровней L, M1, M2 и H и не более 20 % для уровня LLOQ (таблица 6).

Степень извлечения

Для того, чтобы оценить данный параметр валидации, анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной, гиперлипидемической интактной и гемолизной интактной плазмы крови без влияния СИ из интактной плазмы крови на уровнях L, M1, M2 и H (таблица 3), а также образцы КК, приготовленные на различных интактных матрицах. В таблице 7 представлены полученные данные. RSD рассчитанных значений СИ фавипиравира из разных видов рассматриваемых нами биологических матриц не выходило за пределы предписания (не более +15 %).

Таблица 5. **Расчет фактора матрицы фавипиравира на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы фавипиравира-13C3 для образцов, приготовленных из разнообразных видов интактной плазмы крови**

Table 5. **Calculation of the favipiravir matrix factor at L and H levels, normalized by the favipiravir-13C3 matrix factor for samples prepared from diverse types of intact plasma**

Вид биологической матрицы / Type of biological matrix	Уровень контроля качества / Level of QC	Введено, нг/мл / Injected, ng/mL	RSD, %
Интактная плазма крови человека / Human blank plasma	L	150,00	5,30
	H	12000,00	4,07
Гемолизная интактная плазма крови человека / Human hemolyzed blank plasma	L	150,00	12,02
	H	12000,00	2,77
Гиперлипидемическая интактная плазма крови человека / Human lipemic blank plasma	L	150,00	7,48
	H	12000,00	3,01

Таблица 6. **Точность и прецизионность методики определения фавипиравира (внутри цикла, между двумя и между тремя циклами)**

Table 6. **Accuracy and precision of favipiravir determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)**

Уровень Level	Введено, нг/мл Injected, ng/mL	RSD, %			E, %		
		Внутри цикла (*n* = 5) Inter-day (*n* = 5)	Между двумя циклами *n* = 10) Intra-day 1 (*n* = 10)	Между тремя циклами (*n* = 15) Intra-day 2 (*n* = 15)	Внутри цикла (*n* = 5) Inter-day (*n* = 5)	Между двумя циклами (*n* = 10) Intra-day 1 (*n* = 10)	Между тремя циклами (*n* = 15) Intra-day 2 (n=15)
LLOQ	50,00	17,69	18,64	16,07	–15,72	–4,48	–7,31
L	150,00	3,27	5,80	6,55	–7,87	–5,24	–4,24
M1	3000,00	1,28	7,17	7,14	2,86	–0,57	1,68
M2	7500,00	1,50	5,98	6,62	–2,40	–7,26	–5,34
H	12000,00	2,74	3,06	3,28	–0,99	0,93	1,96

Таблица 7. **Оценка СИ фавипиравира на уровнях L, M1, M2 и H из разных видов биологических матриц**

Table 7. **Calculation of favipiravir recovery at L, M1, M2, H levels from the different types of biological matrix**

Вид биологической матрицы Type of biological matrix	СИ фавипиравира, % Favipiravir recovery %			
	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank human blood plasma	91,97	95,45	96,44	101,65
	81,25	98,17	98,59	97,86
	107,76	99,24	103,92	105,00
Гемолизная интактная плазма крови Hemolyzed blank human blood plasma	106,62	103,53	99,67	103,70
	94,74	108,69	100,09	108,04
	82,84	111,02	106,43	106,52
Гиперлипидемическая интактная плазма крови Lipemic blank human blood plasma	111,23	100,92	105,13	114,77
	104,22	110,49	100,73	114,32
	115,28	109,36	98,87	116,44
Среднее Average	99,60			
RSD, %	4,90			

Перенос пробы

В процессе последовательного анализа КО, соответствующих уровню концентраций фавипиравира 8 (см. таблицу 2), и образцов интактной плазмы на хроматограмме образцов интактной плазмы не были идентифицированы пики, соответствующие по временам удерживания пикам фавипиравира и ВС.

Нижний предел количественного определения

НПКО методики определяли на основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности. НПКО методики – это самая минимальная концентрация фавипиравира в плазме крови в вышеуказанном аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение анализируемого вещества со значениями RSD и *E*, не выходящими за пределы +20 %. Нижний предел количественного определения разработанной методики составил 50,00 нг/мл.

Пример хроматограммы плазмы крови с содержанием фавипиравира на уровне НПКО приведен на рисунке 5.

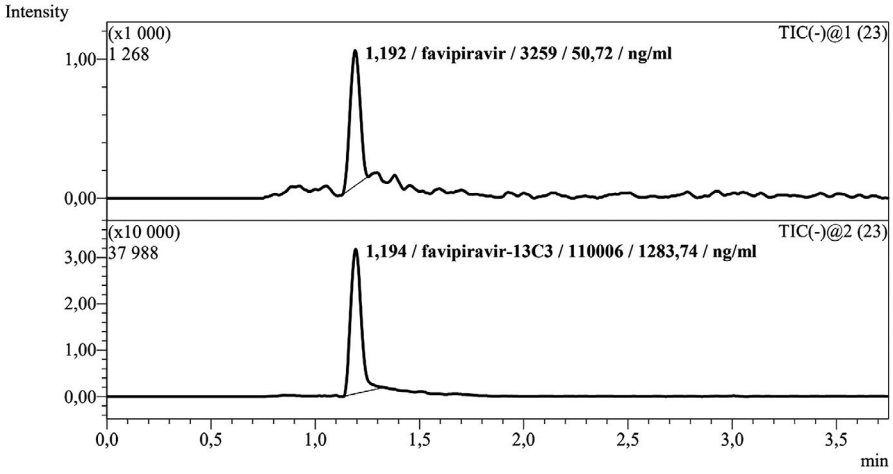


Рисунок 5. **Хроматограмма плазмы крови с содержанием фавипиравира на уровне НПКО (пример)**

Figure 5. **Chromatogram of human blood plasma with favipiravir content at the level of LLOQ (example)**

Стабильность

На уровнях концентраций фавипиравира L (150,00 нг/мл) и H (12000,00 нг/мл) были подтверждены следующие виды стабильности: стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепаративная»), стабильность исходных и рабочих стандартных растворов фавипиравира (при температуре хранения от –50 до – 35 °С в течение 47 дней), долгосрочная стабильность фавипиравира в составе плазмы крови человека (при температуре хранения от –50 до –35 °С в течение 47 дней).

Для полученных значений концентраций фавипиравира была рассчитана относительная погрешность. Анализируемое вещество стабильно в указанных условиях, так как относительная погрешность значений результатов анализа находилась в пределах +15 % от соответствующих контрольных значений на уровнях L и H (см. таблицу 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС с подтвержденным аналитическим диапазоном 50,00–15000,00 нг/мл в плазме крови. Данная методика позволяет применять ее для аналитической части исследований фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных препаратов, содержащих фавипиравир, с целью расширения их ассортимента на отечественном фармацевтическом рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балакин К. В., Стороженко Р. В., Якубова Е. В. Фавипиравир как средство терапии COVID-19. *Научный бюллетень ХимРар*. 2023:1;1–26.
2. Furuta Y., Gowen B. B., Takahashi K., Smee D. F., Barnard D. L. Favipiravir (T-705), a Novel Viral RNA Polymerase Inhibitor. *Antiviral research*. 2013;100(2):446–454. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.
3. Peng Q., Peng R., Yuan B., Wang M., Zhao J., Fu L., Qi J., Shi Y. Structural Basis of SARSCoV-2 Polymerase Inhibition by Favipiravir. *The Innovation*. 2021;2(1):100080. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100080.
4. Shannon A., Selisko B., Le NTT, Huchting J., Touret F., Piorkowski G., Fattorini V., Ferron F., Decroly E., Meier C., Coutard B., Peersen O., Canard B. Favipiravir strikes the SARS-CoV-2 at its Achilles heel, the RNA polymerase. *BioRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.05.15.098731.
5. Du Y. X., Chen X. P. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns about Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2020;108(2):242–247. DOI: 10.1002/cpt.1844.
6. Sood S., Bhatia G. K., Seth P., Kumar P., Kaur J., Gupta V., Punia S., Tuli H. S. Efficacy and Safety of New and Emerging Drugs for COVID-19: Favipiravir and Dexamethasone. *Current Pharmacology Reports*. 2021;7:49–54. DOI: 10.1007/s40495-021-00253-w.
7. Shiraki K., Sato N., Sakai K., Matsumoyo Sh., Kszynski R. H., Takemoto M. Antiviral Therapy for COVID-19: Derivation of Optimal Strategy Based on Past Antiviral and Favipiravir Experiences. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;235:108121. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108121.
8. Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Карпова П. А., Шохин И. Е. Совместное определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):177–189. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189.
9. Tiris G., Gazioglu I., Furton K. G., Kabir A., Locatelli M. Fabric Phase Sorptive Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Favipiravir in Human Plasma and Breast Milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;223:115131. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115131.
10. Abdallah I. A., Hammad Sh. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthol-assisted Homogenous Liquid-Liquid Microextraction for HPLC/UV Determination of Favipiravir as an Antiviral for COVID-19 in Human Plasma. *Journal of Chromatography B*. 2022;1189:123087. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.123087.
11. 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.
12. Abd Allah F. I., Abdelhmaid A., Himida M., Elkashlan A. M., El-Attar A.-A. M. M. Fully Validated UPLC–MS/MS Method for Quantifying Favipiravir in Human Plasma Boosted Lean Six Sigma: An Application For a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2022;36(9): e5381. DOI: 10.1002/bmc.5381.
13. Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β-D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):215–226. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.
14. Onmaz D. E., Abusoglu S., Omnaz M., Yerlikaya F. H., Unlu A. Development and Validation of a Sensitive, Fast and Simple LC-MS/MS Method for the Quantitation of Favipiravir in Human Serum. *Journal of Chromatography B*. 2021;1176:122768. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122768.
15. Challenger E., Penchala S. D., Hale C., Fitzgerald R., Walker L., Reynolds H., Chiong J., Fletcher T., Khoo S., Else L. Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;233:115436. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115436.
16. Bekegnran C. P., Driouich J. S., Breuer J., Barthelemy K., Giocanti M., Lamballerie de X., Kreins A. Y., Nougairede A., Solas C. Simultaneous Quantitation of Favipiravir and its Hydroxide Metabolite in Human Plasma and Hamster Matrices Using a UPLC–MS/MS Method. *Biomedical Chromatography*. 2023;37(9): e5689. DOI: 10.1002/bmc.5689.
17. Sağlam O., Demiray G., Güney B., Doğan-Kurtoğlu E., Ulusoy M. G., Saraner N., Sevici G., Nacak M., Erenmemişoğlu A., Tüzer V. Single Dose, Two-way Crossover Bioequivalence Study of Favipiravir Tablet in Healthy Male Subjects. *Journal of Pharmacy and Drug Development*. 2020;2(2):1–9. DOI: 10.5281/zenodo.4361817.
18. Алешина А. В., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Савченко А. Ю., Шохин И. Е. Определение транексамовой кислоты в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):120–127. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127.

REFERENCES

1. Balakin K. V., Storozhenko R. V., Yakubova E. V. Favipiravir as a Means of Therapy of COVID-19. Nauchny bulleten. *Scientific Bulletin of Chemrar*. 2023;1:1–26. (In Russ.)
2. Furuta Y., Gowen B. B., Takahashi K., Smee D. F., Barnard D. L. Favipiravir (T-705), a Novel Viral RNA Polymerase Inhibitor. *Antiviral research*. 2013;100(2):446–454. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.
3. Peng Q., Peng R., Yuan B., Wang M., Zhao J., Fu L., Qi J., Shi Y. Structural Basis of SARSCoV-2 Polymerase Inhibition by Favipiravir. *The Innovation*. 2021;2(1):100080. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100080.
4. Shannon A., Selisko B., Le NTT, Huchting J., Touret F., Piorkowski G., Fattorini V., Ferron F., Decroly E., Meier C., Coutard B., Peersen O., Canard B. Favipiravir strikes the SARS-CoV-2 at its Achilles heel, the RNA polymerase. *BioRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.05.15.098731.

5. Du Y. X., Chen X. P. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns about Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2020;108(2):242–247. DOI: 10.1002/cpt.1844.
6. Sood S., Bhatia G. K., Seth P., Kumar P., Kaur J., Gupta V., Punia S., Tuli H. S. Efficacy and Safety of New and Emerging Drugs for COVID-19: Favipiravir and Dexamethasone. *Current Pharmacology Reports*. 2021;7:49–54. DOI: 10.1007/s40495-021-00253-w.
7. Shiraki K., Sato N., Sakai K., Matsumoyo Sh., Kszynski R. H., Takemoto M. Antiviral Therapy for COVID-19: Derivation of Optimal Strategy Based on Past Antiviral and Favipiravir Experiences. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;235:108121. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108121.
8. Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Karpova P. A., Shohin I. E. Simultaneous Determination of Candesartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2021;10(4):177–189. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189.
9. Tiris G., Gazioglu I., Furton K. G., Kabir A., Locatelli M. Fabric Phase Sorptive Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Favipiravir in Human Plasma and Breast Milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;223:115131. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115131.
10. Abdallah I. A., Hammad Sh. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthol-assisted Homogenous Liquid-Liquid Microextraction for HPLC/UV Determination of Favipiravir as an Antiviral for COVID-19 in Human Plasma. *Journal of Chromatography B.* 2022;1189:123087. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.123087.
11. 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.
12. Abd Allah F. I., Abdelhmaid A., Himida M., Elkashlan A. M., El-Attar A.-A. M. M. Fully Validated UPLC–MS/MS Method for Quantifying Favipiravir in Human Plasma Boosted Lean Six Sigma: An Application For a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2022;36(9): e5381. DOI: 10.1002/bmc.5381.
13. Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Y., Bely P. A. Simultaneous Determination of Major Molnupiravir Metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) and Favipiravir in Human Plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(1):215–226. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.
14. Onmaz D. E., Abusoglu S., Omnaz M., Yerlikaya F. H., Unlu A. Development and Validation of a Sensitive, Fast and Simple LC-MS/MS Method for the Quantitation of Favipiravir in Human Serum. *Journal of Chromatography B*. 2021;1176:122768. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122768.
15. Challenger E., Penchala S. D., Hale C., Fitzgerald R., Walker L., Reynolds H., Chiong J., Fletcher T., Khoo S., Else L. Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;233:115436. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115436.
16. Bekegnran C. P., Driouich J. S., Breuer J., Barthelemy K., Giocanti M., Lamballerie de X., Kreins A. Y., Nougairede A., Solas C. Simultaneous Quantitation of Favipiravir and its Hydroxide Metabolite in Human Plasma and Hamster Matrices Using a UPLC–MS/MS Method. *Biomedical Chromatography*. 2023;37(9): e5689. DOI: 10.1002/bmc.5689.
17. Sağlam O., Demiray G., Güney B., Doğan-Kurtoğlu E., Ulusoy M. G., Saraner N., Sevici G., Nacak M., Erenmemişoğlu A., Tüzer V. Single Dose, Two-way Crossover Bioequivalence Study of Favipiravir Tablet in Healthy Male Subjects. *Journal of Pharmacy and Drug Development*. 2020;2(2):1–9. DOI: 10.5281/zenodo.4361817.
18. Aleshina A. V., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Savchenko A. Yu., Shohin I. E. Development and Validation of Tranexamic Acid Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS method. *Drug development & registration*. 2021;10(2):120–127. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-240-249
УДК 615.038

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Оценка биоаналогичности и иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) в рамках двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования I фазы с участием здоровых добровольцев

М. А. Колганова[1, 2]✉, Е. Е. Бекетов[3, 1], В. В. Писарев[4], А. В. Иванов[4], С. В. Васильев[5], И. Е. Шохин[2]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Мабскейл». 445043, Россия, Самарская область, г.о. Тольятти, Территория ОЭЗ ППТ Шоссе № 4, здание 5А
[2] ООО «Центр фармацевтической аналитики». 117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[3] Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (МРНЦ им. А. Ф. Цыба - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России). 249036, Россия, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королёва, д. 4
[4] Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек», 111024, Россия, г. Москва, ул. 5-я Кабельная, д. 2-Б, стр. 1, офис 3–1
[5] ООО «ЭЮЦ Клиник», 109147, Россия, г. Москва, ул. Таганская, д. 3

✉ **Контактное лицо:** Колганова Мария А. **E-mail:** m.kolganova@mabscale.ru

ORCID: М. А. Колганова – https://orcid.org/0000-0003-4568-1172; Е. Е. Бекетов – https://orcid.org/0000-0002-2485-6482;
В. В. Писарев – https://orcid.org/0000-0003-3212-4369; А. В. Иванов – https://orcid.org/0000-0002-1676-7754;
С. В. Васильев – https://orcid.org/ 0000-0002-3485-4050; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 14.07.2023 **Статья принята в печать:** 22.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Трастузумаб – первый препарат моноклональных антител, направленный на открытый в средине 80-х гг. прошлого столетия продукт экспрессии онкогена neu – рецептор эпидермального фактора роста 2 типа, HER2. Трастузумаб почти сразу стал препаратом выбора для комбинированной терапии пациенток с метастатическим HER2-позитивным раком молочной железы (РМЖ) и позволил значительно улучшить прогноз по данному подтипу РМЖ, в некоторых случаях до 90 % увеличив пятилетнюю выживаемость для пациенток. Разработка препаратов-биоаналогов трастузумаба до сих пор остается актуальной задачей по всему миру, включая Россию, учитывая даже тот факт, что более 10 биоаналогов уже находятся на различных этапах разработки или регистрации.

Цель. Целью работы было проведение аналитической части двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования фармакокинетики и безопасности препаратов трастузумаба с участием здоровых добровольцев с дальнейшей оценкой биоаналогичности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария).

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 92 здоровых добровольца, соответствующие всем критериям включения/невключения. Количественное определение трастузумаба и полуколичественное определение антител к трастузумабу в образцах сыворотки крови добровольцев проводилось методом иммуноферментного анализа с фотометрическим детектированием. Для выполнения аналитической части исследования были валидированы две независимые методики.

Результаты и обсуждение. Методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови была валидирована по следующим параметрам: селективность, определение калибровочного диапазона и регрессионной модели, правильность и прецизионность, минимально необходимое разведение, линейность разведения образцов и стабильность. Методика полуколичественного определения антител к трастузумабу была валидирована по следующим параметрам: предел исключения, селективность, чувствительность, «хук»-эффект, толерантность к присутствию лекарственного препарата, прецизионность и стабильность (краткосрочная и долгосрочная). Валидированные методики были применены на практике для проведения аналитической части исследования фармакокинетики и иммуногенности препаратов трастузумаба с дальнейшим расчетом фармакокинетических параметров и доверительных интервалов для оценки биоаналогичности сравниваемых препаратов.

Заключение. По результатам исследования была доказана биоаналогичность исследуемого препарата и препарата сравнения, а также в ходе оценки иммуногенности не было выявлено анти-лекарственных антител к трастузумабу в образцах сыворотки крови добровольцев.

Ключевые слова: трастузумаб; фармакокинетика; иммуногенность; биоаналоги; ИФА

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

Вклад авторов. А. В. Иванов, В. В. Писарев и М. А. Колганова участвовали в разработке и валидации методики. С. В. Васильев проводил статистическую обработку полученных результатов. М. А. Колганова, А. В. Иванов 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., Бекетов Е. Е., Писарев В. В., Иванов А. В., Васильев С. В., Шохин И. Е. Оценка биоаналогичности и иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и «Герцептин®» (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) в рамках двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования I фазы с участием здоровых добровольцев. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(3):240–249. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-240-249

© Колганова М. А., Бекетов Е. Е., Писарев В. В., Иванов А. В., Васильев С. В., Шохин И. Е., 2023
© Kolganova M. A., Beketov E. E., Pisarev V. V., Ivanov A. V., Vasiliev S. V., Shokhin I. E., 2023

A Double-blind Randomized Comparative Phase I Study to Assess Biosimilarity and Immunogenicity of "Trastuzumab" (LLC "Mabscale", Russia) and Herceptin® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in Healthy Volunteers

Maria A. Kolganova[1, 2]✉, Evgeny E. Beketov[3, 1], Vladimir V. Pisarev[4], Andrei V. Ivanov[4], Sergey V. Vasiliev[5], Igor E. Shokhin[2]

[1] LLC "Mabscale". 5, Territory of the SEZ PPT Highway No. 4, Tolyatti, Samara region, 445043, Russia
[2] LLC "Center for Pharmaceutical Analytics". 8, Simferopolsky Boulevard, Moscow, 117149, Russia
[3] A. Tsyb MRRC – branch of NMRRC of the Ministry of Health of the Russian Federation. 4, Koroleva str., Obninsk, Kaluga region, 249036, Russia
[4] LLC "Scientific and Production Center Probiotech". Office 3–1, 2-B/1, 5th Kabel'naya str., Moscow, 111024, Russia
[5] LLC "ELC Clinic". 3, Taganskaya str., Moscow, 109147, Russia

✉ **Corresponding author:** Maria A. Kolganova. **E-mail:** m.kolganova@mabscale.ru

ORCID: Maria A. Kolganova – https://orcid.org/0000-0003-4568-1172; Evgeny E. Beketov – https://orcid.org/0000-0002-2485-6482; Vladimir V. Pisarev – https://orcid.org/0000-0003-3212-4369; Andrei V. Ivanov – https://orcid.org/0000-0002-1676-7754; Sergey V. Vasiliev – https://orcid.org/ 0000-0002-3485-4050; Igor E. Shokhin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 14.07.2023 **Revised:** 22.08.2023 **Published:** 25.08.2023

Abstract

Introduction. Trastuzumab is the first drug based on the monoclonal antibodies' technology targeted to the neu oncogene expression product discovered in the middle 80-s – human epidermal growth receptor, HER2. After being approved trastuzumab had become the drug of choice for combine therapy of metastatic breast cancer (BC). This therapy had also allowed to improve patients' 5-year survival rate dramatically, almost up to 90 % in some cases. Despite the fact that more than 10 biosimilars of trastuzumab are now in the pipeline around the world, including Russia, the development and registration of trastuzumab biosimilars still remain relevant.

Aim. Aim of the study was to conduct the analytical part of the double-blind randomized comparative clinical trial for trastuzumab pharmacokinetics and safety assessment in healthy volunteers with subsequent biosimilarity evaluation of "Trastuzumab" (LLC "Mabscale", Russia) and Herceptin® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland).

Materials and methods. 92 healthy volunteers, who fulfilled the inclusion/exclusion criteria, were enrolled to the study. Trastuzumab quantitation and anti-trastuzumab antibodies detection was performed using ELISA method with photometric detection. To support the clinical trial two different independent bioanalytical methods were validated.

Results and discussion. Trastuzumab quantitation method in human blood serum was validated for selectivity, calibration curve and regression model, sensitivity (LLOQ), accuracy and precision, MRD, dilution linearity and stability. The method for anti-trastuzumab antibodies detection, that was previously described by the authors, was validated for cut-point, selectivity, sensitivity, prozone effect, drug tolerance, precision and stability (short-term and long-term). The validated methods were successfully applied to the study samples assay to perform the analytical part of the comparative study for trastuzumab pharmacokinetics and immunogenicity assessment. The obtained drug concentrations were used for PK-parameters and confidence interval calculations to estimate the biosimilarity of test and reference drug.

Conclusion. The study results showed that test and reference drug are biosimilar, and moreover immunogenicity assessment showed no anti-trastuzumab antibodies in any samples of healthy volunteers.

Keywords: trastuzumab; pharmacokinetics; immunogenicity; biosimilars; ELISA

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

Contribution of the authors. Andrei V. Ivanov, Vladimir V. Pisarev and Maria A. Kolganova participated in the development and validation of the analytical method. Sergey V. Vasiliev was responsible for statistical data analysis. Maria A. Kolganova, Andrei V. Ivanov and Evgeny E. Beketov have prepared paper draft. 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., Beketov E. E., Pisarev V. V., Ivanov A. V., Vasiliev S. V., Shokhin I. E. A double-blind randomized comparative phase I study to assess biosimilarity and immunogenicity of Trastuzumab (LLC "Mabscale", Russia) and Herceptin® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in healthy volunteers. *Drug development & registration*. 2023;12(3):240–249. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-240-249

ВВЕДЕНИЕ

До внедрения в медицинскую практику таргетной терапии злокачественных заболеваний одним из наиболее неблагоприятных вариантов рака молочной железы (РМЖ) считался HER2+. Перспективность терапии с HER2/*neu* в качестве мишени была показана еще в середине 80-х годов прошлого столетия. Так в работе Д. Дрэбин с соавт. [1] эффект связывания мишени с использованием культуры клеток крысиной нейробластомы B104 был показан для моноклональных IgG2a антител, специфичных к крысиному антигену, закодированному в онкогене *neu*. В проведенном эксперименте клетки крысиной нейробластомы, содержали активированный ген *neu*, выявленный и идентифицированный несколькими годами ранее в результате направленного химиче-

ского канцерогенеза [2, 3]. Человеческий гомолог продукта экспрессии гена *neu* крысы, изначально названный p185 (по массе полученной молекулы – 180 кДа), позже получил обозначение HER2 (human epidermal growth factor receptor 2).

Использование в качестве мишени человеческого рецептора эпидермального фактора роста 2 типа (HER2/*neu*) лежит в основе таргетной биологической терапии – одного из наиболее эффективных методов лечения для пациенток с РМЖ, и в особенности в случае HER2+ молекулярного подтипа опухоли. На долю последнего, без учета люминального подтипа, приходится до 20 % от всех случае РМЖ [4]. Более того, в настоящее время благодаря существующим методам лечения заболевания, и в том числе лечению препаратами моноклональных антител в составе комбинированной терапии, удаётся обеспечивать высокий уровень 5-летней выживаемости пациентов: в зависимости от своевременности диагностики он достигает 90 % и более [5].

С момента открытия HER2 в качестве мишени в клиническую практику вошло уже несколько различных препаратов моноклональных антител. Среди них, например, трастузумаб, пертузумаб и маргетуксимаб. Пертузумаб отличается от двух других специфичностью в отношении антигена, а точнее субдомена HER2, который он распознает в организме [6]. Пионером в этом списке является трастузумаб, впервые одобренный под торговым наименованием Герцептин®, данные клиническим исследованиям которого были опубликованы в 1996 году [7] и позже в 1998 году [8], после чего препарат был одобрен FDA для клинического применения. После выхода на рынок трастузумаб стал стандартным средством лечения HER+ РМЖ как в адьювантной, так и в неоадьювантной видах терапии. Кроме того, сравнительно недавно использование трастузумаба было расширено за счет применения его конъюгатов с цитотоксическими агентами, такими как, например, эмтанзин и дерукстекан, которые вместе с ингибиторами тирозинкиназы – нератинибом и тукатинибом обеспечили дальнейшее развитие таргетной терапии РМЖ [6].

На сегодняшний день активно продолжается развитие препаратов-биоаналогов [9]. К настоящему моменту для трастузумаба известны биоаналоги [10, 11] под следующими торговыми наименованиями (в хронологическом порядке): Огиври (трастузумаб-dkst, MYL-1401O), Герзума (трастузумаб-pkrb, CT-P6) [12], Канджинти (трастузумаб-anns, ABP 980) [13], Онтрузант (трастузумаб-dttb, SB3) и Тразимера (трастузумаб-pkrb, PF-05280014). Еще не менее 9 биоаналогов находятся на стадии клинических исследований. Что касается России – препарат трастузумаб входит в Перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации. Однако, единственный на сегодняшний день разработанный в России биоаналог трастузумаба – это препарат Гертикад®, производства компании «Биокад». Поэтому разработка и регистрация препаратов-биоаналогов трастузумаба все ещё остается актуальной задачей.

Очевидно, что выходу на рынок каждого нового биоаналога предшествует несколько этапов клинических исследований, для аналитического сопровождения которых требуются валидированные биоаналитические методики, позволяющие провести оценку фармакокинетики и безопасности (в частности, оценку иммуногенности) исследуемого препарата в сравнении с оригинальным. Настоящее исследование было в том числе направлено на разработку и валидацию методики количественного определения препарата трастузумаб в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа (ИФА), который является общепринятым для этих целей подходом. В данный момент существуют различные варианты ИФА-методик, включая применение синтетических пептидов, имитирующих HER2-специфический эпитоп трастузумаба, с использованием в качестве субстрата и фермента *n*-нитрофенилфосфата и щелочной фосфатазы соответственно (взамен тетраметилбензидина и пероксидазы хрена) [14], или классический «сэндвич»-ИФА, с покрытием антителами к трастузумабу или рекомбинантным HER2 [15]. При этом аналитический диапазон методики, в зависимости от поставленных задач, может составлять от 1,6 нг/мл [16] до 200 мкг/мл [17] трастузумаба.

Среди перспективных подходов также стоит отметить применение готовых коммерческих ИФА-наборов. Такие тест-системы теоретически могут снизить влияние на методику внешних факторов (например, серии реактивов, расходных материалов и стандартных образцов), повышающих вариабельность результатов анализа, а также упростить процесс проведения многоцентровых исследований с использованием валидированных методик сразу на нескольких площадках.

Целью настоящего исследования было проведение аналитической части двойного слепого рандомизированного сравнительного клинического исследования фармакокинетики и безопасности препаратов трастузумаба с участием здоровых добровольцев с дальнейшей оценкой биоаналогичности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) и Герцептин® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн и участники клинического исследования

Клиническое исследование биоаналогичности фазы I было проведено в строгом соответствии с принципами Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации, а также требованиями надлежащей клинической практики (РКИ № 611 от 23.10.2019, выдано Министерством здравоохранения Российской Федерации). Исследование проводилось на ба-

зе аккредитованного клинического центра «Научный клинический центр открытого акционерного общества «Российские железные дороги», проведение было одобрено локальным этическим комитетом клинического центра. В исследовании принимали участие здоровые добровольцы (N = 100, 92 участника, 8 дублеров), мужчины в возрасте от 18 до 45 лет, соответствующие критериям включения/невключения в исследование. В ходе исследования 92 добровольца были рандомизированы в две группы в соотношении 1:1 (по 46 человек в каждой группе), и получали однократную внутривенную инфузию исследуемого препарата («Трастузумаб», 440 мг/20 мл, производства ООО «Мабскейл», Россия) или препарата сравнения (Герцептин®, 440 мг/20 мл, производства F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) в дозе 6 мг/кг.

Первичной задачей исследования было продемонстрировать фармакокинетическую эквивалентность (биоаналогичность) двух препаратов, дополнительно оценивали их безопасность, в том числе иммуногенность. Для установления эквивалентности (биоаналогичности) сравниваемых препаратов использовали подход, основанный на оценке параметрических, двусторонних 90%-х доверительных интервалов для отношений средних геометрических значений фармакокинетических параметров: $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} и Cmax для исследуемого препарата и препарата сравнения. Выбранные пределы границ эквивалентности (границы 90%-го доверительного интервала), согласно протоколу, составили 80–125 %.

Определение концентрации трастузумаба в образцах добровольцев

У каждого добровольца образцы крови для оценки фармакокинетики препаратов трастузумаба забирали до введения, а также через 90 минут (по окончании инфузии), и через 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168, 336, 504, 672, 744, 1008, 1248, 1440 и 1704 часа после инфузии одного из препаратов (исследуемого или препарата сравнения). Из взятых образцов крови получали сыворотку крови, в составе которой далее проводили количественное определение трастузумаба методом ИФА.

Валидация методики количественного определения трастузумаба

Методика количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека представлена в варианте непрямого иммуноферментного анализа. В таком варианте ИФА в подготовленные планшеты, покрытые рекомбинантным белком HER2, вносили образцы, разбавленные буферным раствором в соответствии с минимально необходимым разведением, после отмывки не связавшихся компонентов в лунки добавляли конъюгат козьих антител к Fc-фрагменту IgG человека с пероксидазой, а затем вносили субстрат – тетраметилбензидин. После остановки реакции стоп-раствором желтое окрашивание (оптическая плотность) в лунках было пропорционально количеству трастузумаба в образцах. Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного фотометра, количественное определение трастузумаба проводили методом построения калибровочной кривой. Последовательность этапов методики, а также применявшееся оборудование и реактивы приведены в таблице 1.

Описанная методика была реализована в рамках готовой, коммерчески-доступной тест-системы «ИФА-Трастузумаб», производства компании ООО «Научно-производственный центр Пробиотек» (партия № 01, годен до 01.06.2021), которая представляла собой подготовленный набор реактивов и материалов, который позволил оперативно и с высокой производительностью провести анализ исследуемых образцов, снизив при этом возможную вариабельность результатов по сравнению с вновь разработанными (*in-house*) биоаналитическими методиками. Подобные тест-системы – один из вариантов выбора при проведении клинических и доклинических исследований [15]. Как и любая биоаналитическая методика, ИФА-методика, лежащая в основе тест-системы, была предварительно валидирована в соответствии с требованиями Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза[1] по следующим параметрам: селективность, определение калибровочного диапазона, определение регрессионной модели, прецизионность и правильность внутри одной аналитической серии и между аналитическими сериями, определение минимального необходимого разведения, возможность определения образца с концентрациями аналита выше аналитического диапазона и стабильность. Успешная валидация методики позволила использовать тест-систему для анализа образцов добровольцев, после чего рассчитанные концентрации трастузумаба в сыворотке крови использовались для дальнейшего расчета и анализа параметров фармакокинетики препаратов.

Расчет фармакокинетических параметров

Расчет ФК-параметров с использованием концентраций трастузумаба в сыворотке крови добровольцев после однократной инфузии проводился в программе PK Solution 2.0, статистическая обработка данных проводилась в программе STATISTICA®. В качестве основного критерия оценки фармакокинетики препаратов трастузумаба для каждого добровольца рассчитывали значение $AUC_{(0-\infty)}$ – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-вре-

[1] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd_21112016_85. Ссылка активна на 28.07.2023.

Таблица 1. Этапы проведения методики с описанием использованного оборудования и реактивов

Table 1. Method stages with the equipment and reagents used

№	Наименование этапа Stage name	Оборудование и реактивы Equipment and reagents	Особенности проведения. Все реакции проходят при комнатной температуре (18–25 °C) Conduction Features. All reactions take place at room temperature (18–25 °C)
1	Промывка планшета Washing the plate	Промывочный раствор 0,025 % Tween-20 в PBS (PBST) Wash solution 0.025 % Tween-20 in PBS (PBST)	250 мкл в каждую лунку, встряхнуть на шейкере и удалить 250 µl per well, shake on a shaker and discard
2	Подготовка образцов Sample preparation	Разбавитель 0,1 % Tween-20 и 0,1 % БСА в PBS Diluent 0.1 % Tween-20 and 0.1 % BSA in PBS	Разбавить в 5000 раз в 2 этапа: 10 мкл образца на 990 мкл разбавителя, затем 20 мкл полученного раствора на 980 мкл разбавителя Dilute 5000 times in 2 steps: 10 µl of sample per 990 µl of diluent, then 20 µl of the resulting solution per 980 µl of diluent
3	Внесение образцов Sample addition	Внести по 100 мкл образцов, калибраторов и контролей в лунки планшета Dispense 100 µl of samples, calibrators and controls into wells of the plate	Инкубация 30 минут на горизонтальном шейкере при 170 об/мин Incubation 30 minutes on a horizontal shaker at 170 rpm
4	Промывка планшета Washing the plate	250 мкл PBST, автоматический промыватель планшетов 250 µl PBST, automatic plate washer	Удалить содержимое, промыть трижды Remove contents, rinse three times
5	Конъюгат вторичных антител с меткой Labeled Secondary Antibody Conjugate	Внести по 100 мкл свежеприготовленного конъюгата антител в разведении 1 : 20 000 Add 100 µl of freshly prepared antibody conjugate at a dilution of 1 : 20 000	Инкубация 30 минут на горизонтальном шейкере при 170 об/мин Incubation 30 minutes on a horizontal shaker at 170 rpm
6	Промывка планшета Washing the plate	250 мкл PBST, автоматический промыватель планшетов 250 µl PBST, automatic plate washer	Удалить содержимое, промыть трижды Remove contents, rinse three times
7	ТМБ-субстрат TMB-substrate	Внести по 100 мкл субстратного раствора ТМБ Add 100 µl of TMB substrate solution	Инкубация 15 мин в темноте Incubation 15 min in the dark
8	Остановка реакции Reaction stop	Внести по 100 мкл стоп-реагента Add 100 µl of Stop Reagent	Инкубация 1 мин на горизонтальном шейкере при 170 об/мин Incubation 1 min on a horizontal shaker at 170 rpm
9	Измерение оптической плотности Optical density measurement	Пакет ScanIt software for Microplate reader v. 5.0.0.42 ScanIt software for Microplate reader v. 5.0.0.42	Длина волны 450 нм Wavelength 450 nm
10	Интерпретация результатов Interpretation of results	Программа Origin Pro 2015 Origin Pro 2015 Program	Построение калибровочной кривой и расчет концентрации трастузумаба Calibration curve plotting and calculation and calculation of trastuzumab concentration

мя», начиная с нулевого значения времени до бесконечности. Значение $AUC_{(0-\infty)}$ рассчитывали по формуле:

$$AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-t)} + \frac{C_{last}}{k_{el}},$$

где C_{last} – расчетное (моделируемое) значение концентрации действующего вещества в последней пробе; k_{el} – константа элиминации. Дополнительно рассчитывались параметры: максимальная концентрация (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (t_{max}), период полувыведения ($t_{1/2}$). Кроме того, было проведено вычисление относительной биодоступности трастузумаба после применения исследуемого препарата по сравнению с применением препарата сравнения, а также показатель относительной степени всасывания по формулам:

$$f = (AUC_{(0-\infty)})_T / (AUC_{(0-\infty)})_R;$$

$$f' = (AUC_{(0-t)})_T / (AUC_{(0-t)})_R \text{ и } f'' = (C_{max})_T / (C_{max})_R,$$

где *T* и *R* – это исследуемый препарат и препарат сравнения, соответственно.

Статистический анализ основных параметров фармакокинетики C_{max}, $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ проводился в предположении об их лог-нормальном распределении и мультипликативной модели влияния факторов препарат (*formulation*) и участник исследования (*subject*). В связи с тем, что добровольцы госпитализировались не в один день, дополнительно в модели дисперсионного анализа (ANOVA) был учтен фактор «группа одновременно госпитализируемых добровольцев» (*group*). При этом фактор *subject* рассматривался как случайный, а факторы *formulation u group* – как фиксированные эффекты:

Модель в ANOVA: *formulation + group (formulation).*

В интересах проведения дисперсионного анализа основные параметры фармакокинетики C_{max}, $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$ были прологарифмированы (для всех показателей использовался натуральный логарифм), после чего с полученными значениями логарифмов оперировали как с выборкой нормально распределенных случайных величин. По результатам ANOVA рассчитывались: остаточные вариации, точечные оценки и их 90%-е доверительные интервалы для различия («тестируемый ЛП» минус «референтный ЛП») логарифмически преобразованных основных фармакокинетических параметров C_{max}, $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$. Полученные в логарифмической шкале доверительные интервалы были подвергнуты обратному преобразованию для того, чтобы построить искомые доверительные интервалы для отношения средних геометрических в исходных (не преобразованных) единицах измерения.

Оценка иммуногенности

Одной из задач клинического исследования была сравнительная оценка безопасности исследуемого препарата и препарата сравнения, а также оценка иммуногенности препаратов, а именно: определение связывающих анти-лекарственных антител (АЛА) к трастузумабу. Для оценки иммуногенности у каждого добровольца образцы крови для оценки иммуногенности препаратов трастузумаба забирали до введения, а также через 336, 744, 1248 и 1704 часа после начала введения препарата. Из взятых образцов крови получали сыворотку крови, в составе которой далее проводили полуколичественное определение АЛА к трастузумабу методом ИФА. Полуколичественное определение связывающих АЛА к трастузумабу методом ИФА проводили с помощью предварительно валидированной методики, основанной на методе твердофазного мостикового ИФА с дополнительным этапом кислотной диссоциации для образцов и биотин-стрептавидиновым детектированием [18]. Методика была разработана и валидирована в соответствии с требованиями нормативной документации[1, 2], что позволило применить ее для анализа образцов сыворотки крови добровольцев в ходе проведения клинического исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики количественного определения трастузумаба в сыворотке крови здоровых добровольцев

Методика, лежащая в основе тест-системы «ИФА-Трастузумаб» была валидирована в соответствии с требованиями Приложения 6 к Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза.

Селективность методики обеспечивалась использованием на покрытии планшета непосредственной мишени трастузумаба – рекомбинантного человеческого рецептора фактора роста 2 типа (HER2). Для проверки селективности методики были проведены эксперименты по анализу содержания трастузумаба в концентрации 3 мкг/мл, в составе 10 индивидуальных образцов сыворотки крови человека, включая гемолизированные и гиперлипидемические образцы. Каждый образец анализировали в трех повторах. Методика была признана селективной, так как отклонение рассчитанной концентрации образцов контроля качества от теоретической величины не превышало 19 % при допустимых 25 %, а среднее значение отклонения концентраций от теоретической величины находились в диапазоне 75–125 % от теоретического значения для каждого изученного образца матрицы. Полученные отклонения были достигнуты во всех измерениях (100 %) при критерии приемлемости не менее 80 % проанализированных образцов.

Аналитический диапазон методики составил от 3 до 300 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови. Для всесторонней оценки методики использовали 8 калибровочных образцов трастузумаба в интактной сыворотке с концентрацией 0, 3, 6, 30, 90, 160, 250, 300 мкг/мл и 5 образцов для контроля качества концентрацией 3, 8,5, 150, 225, 300 мкг/мл. Нижний предел количественного определения (НПКО) был определен на уровне 3 мкг/мл трастузумаба в сыворотке крови, так как оптическая плотность данного образца контроля качества была как минимум в 5 раз больше показаний интактной сыворотки крови. Значения концентрации трастузумаба в образце НПКО были дискретными и воспроизводимыми, с прецизионностью между сериями 8,7 %, не превышающей 25 %, и правильностью 96,3 %, входящей в допустимый диапазон 75–125 %.

Регрессионная модель зависимости оптической плотности от концентрации трастузумаба строилась с использованием 8 калибровочных образцов и описывалась уравнением 4PL-логистической зависимости вида:

[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: 28.07.2023.

[2] 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 28.07.2023.

$$y = D + \frac{A - D}{1 - \left(\frac{x}{C}\right)^b},$$

где y – оптическая плотность, *x* – концентрация аналита, *A*, *b*, *C*, *D* – параметры уравнения. В шести независимых циклах для полученных калибровочных кривых абсолютное значение относительной погрешности обратно пересчитанных концентраций калибровочных образцов не превышало 22,0 % для образцов на уровне верхнего и нижнего пределов количественного определения (образцы 3 и 300 мкг/мл) и 9,5 % для остальных пяти образцов внутри аналитического диапазона.

Правильность и прецизионность значений концентрации трастузумаба в образцах контроля качества на всех пяти уровнях концентраций была рассчитана как внутри одной аналитической серии, так и между 6 независимыми сериями. Правильность оценивалась путем расчета относительной погрешности (RE, %) для рассчитанных значений концентрации трастузумаба, а прецизионность – путем расчета коэффициента вариации (CV, %). Дополнительно рассчитывали значения общей ошибки (TE, %) для образцов контроля качества на каждом уровне концентраций трастузумаба. Полученные данные о правильности и прецизионности методики внутри одной серии представлены в таблице 2, а между аналитическими сериями – в таблице 3.

Таблица 2. Значения правильности и прецизионности определения трастузумаба внутри одной аналитической серии

Table 2. Within-run method accuracy and precision

Номинальная концентрация, мкг/мл Nominal concentration, ug/mL	Среднее значение рассчитанной концентрации, мкг/мл Mean measured concentration, ug/mL	Стандартное отклонение, SD Standard deviation, SD	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, CV, %	Относительная погрешность, % Relative error, RE, %	Общая ошибка, % Total error, TE, %
3,0	3,02	0,09	3,0	0,7	3,7
8,5	7,90	0,26	3,3	–7,1	10,4
150	135,02	2,36	1,7	–10,0	11,7
225	207,32	8,96	4,3	–7,9	12,2
300	259,78	6,81	2,6	–13,4	16,0

Все полученные данные соответствовали критериям приемлемости: отклонение среднего значения концентрации образцов контроля качества от номинальной величины (правильность) не превышало 20 %, коэффициент вариации рассчитанных значений концентрации образцов контроля качества на каждом уровне (прецизионность) не превышал 25 % для наибольшего и наименьшего значений концентрации и 20 % для остальных, общая ошибка не превышала 40 % для крайних точек аналитического диапазона и 30 % для остальных.

Таблица 3. Значения правильности и прецизионности методики между 6 независимыми аналитическими сериями

Table 3. Between-run method accuracy and precision for 6 independent analytical runs

Номинальная концентрация, мкг/мл Nominal concentration, ug/mL	Среднее значение рассчитанной концентрации, мкг/мл Mean measured concentration, ug/mL	Стандартное отклонение, SD Standard deviation, SD	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, CV, %	Относительная погрешность, % Relative error, RE, %	Общая ошибка, % Total error, TE, %
3,0	2,89	0,25	8,7	–3,7	12,4
8,5	8,13	0,50	6,2	–4,4	10,6
150	134,74	8,68	6,4	–10,2	16,6
225	210,47	14,81	7,0	–6,5	13,5
300	268,21	20,66	7,7	–10,6	18,3

В качестве **минимально необходимого разведения** в методике было выбрано разведение образцов в 5000 раз (0,02 % сыворотка крови). Данное значение было получено в результате экспериментов с разведением образца трастузумаба с концентрацией 3 мкг/мл в сыворотке крови в 10, 100, 1000 и 5000 раз. Выбранное разведение позволило снизить фоновый сигнал, вызванный неспецифическим связыванием компонентов биологической матрицы, а также одновременно обеспечить концентрацию в образцах сыворотки крови добровольцев, попадающую в валидированный аналитический диапазон методики. В результате отклонение среднего значения концентрации образца контроля качества от теоретической величины не превысило допустимые 25 %.

Для определения возможности разведения образцов с концентрацией анализируемого вещества выше калибровочного диапазона были проведены эксперименты по возможности линейного разведения образцов дополнительно к минимально необходимому разведению. Образцы контроля качества с концентрацией трастузумаба 600 мкг/мл, последовательно разбавляли интактной сывороткой для получения образцов с концентрацией 300 и 150 мкг/мл. Каждый из данных образцов анализировали в трех повторностях в одной серии. В ходе валидации прецизионность (коэффициент вариации, CV, %) в серии разведений образца с концентрацией трастузумаба 600 мкг/мл в 2 раза до концентрации 300 мкг/мл не превышала 1,3 %, в 4 раза до концентрации 150 мкг/мл – 3,3 %, при этом правильность (относительная погрешность, RE, %) для тех же разведений составила –10,4 % и –3,9 %, соответственно. Полученные значения соответствовали критериям приемлемости, при которых отклонение от теоретической величины не должно превышать 25 %.

Стабильность трастузумаба в составе биологической матрицы (сыворотки крови) при применении методики была доказана для различных условий, аналогичных условиям обращения с исследуемыми образцами добровольцев. В ходе валидации методики была доказана: краткосрочная («настольная») стабильность образцов трастузумаба в сыворотке крови в течение 6 часов при комнатной температуре, стабильность образцов трастузумаба в сыворотке крови после 3 последовательных циклов замораживания (12 часов)-оттаивания, а также долгосрочная стабильность при хранении в условиях низкотемпературной заморозки при температуре не выше минус 35 °C в течение 171 дня. Во всех экспериментах исследовались два образца для контроля качества концентрацией 8,5 и 225 мкг/мл. Сводная информация о данных полученных при оценке различных видов стабильности, приведена в таблице 4.

Таблица 4. Стабильность трастузумаба в сыворотке крови при хранении в различных условиях

Table 4. Trastuzumab stability in human blood serum in different conditions

Номинальная концентрация, мкг/мл Nominal concentration, ug/mL	Среднее значение рассчитанной концентрации, мкг/мл Mean measured concentration, ug/mL	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, CV, %	Относительная погрешность, % Relative error, RE, %
Краткосрочная («настольная») стабильность Bench-top stability			
8,5	8,29	3,0	-2,5
225,0	223,94	2,1	-0,5
Стабильность при замораживании-размораживании (3 цикла) Freeze-thaw stability (3 cycles)			
8,5	7,53	7,7	-11,4
225,0	213,33	3,5	-5,2
Долгосрочная стабильность при температуре не выше –35 °C Long-term stability at temperatures not exceeding –35 °C			
8,5	7,52	12,6	-11,5
225,0	206,86	5,7	-8,1

Полученные значения относительной погрешности для усредненных значений концентрации модельных образцов контроля качества не превышали 20 %, что соответствовало критериям приемлемости и позволило сделать вывод о стабильности трастузумаба в составе биологической матрицы и возможности применения методики для оценки его концентраций в изученных условиях.

Успешная валидация биоаналитической методики, лежащей в основе тест-системы «ИФА-Трастузумаб» позволила использовать данную тест-систему для анализа образцов добровольцев-участников клинического исследования. Полученные значения концентрации трастузумаба в образцах добровольцев были далее использованы для построения индивидуальных фармакокинетических профилей препаратов, а также для расчета фармакокинетических параметров, с дальнейшей статистической оценкой биоаналогичности препаратов Герцептин® и «Трастузумаб».

Оценка биоаналогичности препаратов

С использованием данных о концентрациях трастузумаба в образцах добровольцев были построены индивидуальные фармакокинетические профили препарата сравнения и исследуемого препарата, приведенные на рисунке 1.

Также для каждого добровольца были рассчитаны индивидуальные значения ФК-параметров трастузумаба, необходимые для проверки эквивалентности сравниваемых препаратов. Основные параметры для исследуемого препарата и препарата сравнения представлены в таблице 5.

Таблица 5. Фармакокинетические параметры исследуемого препарата и препарата сравнения

Table 5. PK-parameters for test and reference drug

Параметр (средние значения) PK-parameter (mean)	Исследуемый препарат: «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл», Россия) Investigational drug: Trastuzumab (OOO Mabscale, Russia)
$AUC_{(0-t)}$, мкг · ч/мл $AUC_{(0-t)}$, mcg · h/ml	35365
$AUC_{(0-\infty)}$, мкг · ч/мл $AUC_{(0-\infty)}$, mcg · h/ml	35511
C_{max}, мкг/мл C_{max}, mcg/ml	179
t_{max}, ч t_{max}, h	3,14
$t_{1/2}$, сут. $t_{1/2}$, days	8,4
Параметр (средние значения) PK-parameter (mean)	Препарат сравнения: Герцептин®, (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) Reference drug: Herceptin®, (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland)
$AUC_{(0-t)}$, мкг · ч/мл $AUC_{(0-t)}$, mcg · h/ml	31156
$AUC_{(0-\infty)}$, мкг · ч/мл $AUC_{(0-\infty)}$, mcg · h/ml	31280
C_{max}, мкг/мл C_{max}, mcg/ml	162
t_{max}, ч t_{max}, h	2,65
$t_{1/2}$, сут. $t_{1/2}$, days	8,3

Значения двухсторонних 90%-х доверительных интервалов, рассчитанные с использованием средних геометрических значений параметров $AUC_{(0-\infty)}$, $AUC_{(0-t)}$, и C_{max} составили 103,32 % – 122,60 %, 103,38 % – 122,55 % и 102,39 % – 117,96 %, соответственно. Полученные доверительные интервалы лежали в границах, установленных протоколом исследования 80 % – 125 %, что позволило сделать вывод о фармакокинетической эквивалентности (биоаналогичности) исследуемого препарата и препарата сравнения (рисунок 2).

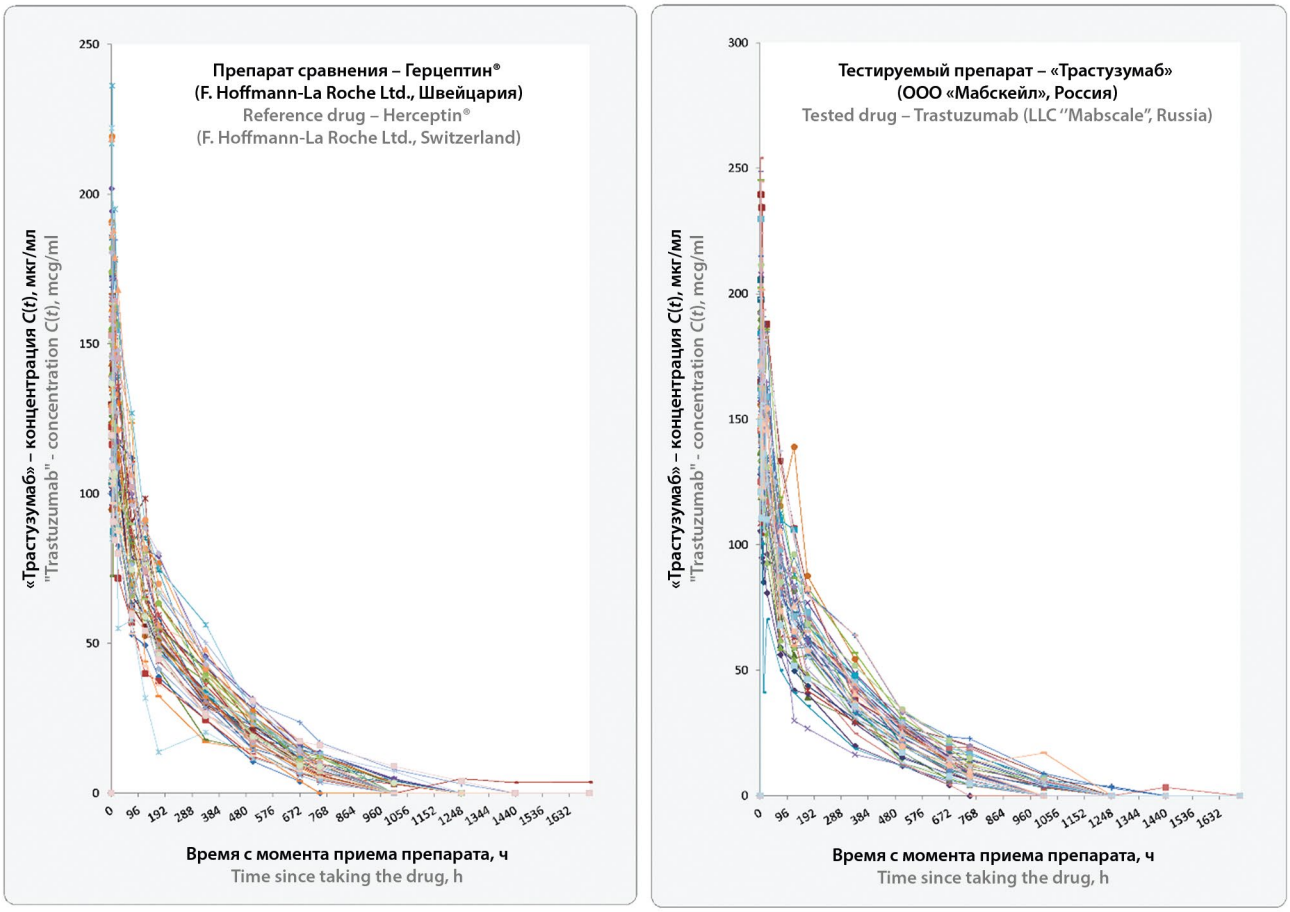


Рисунок 1. Индивидуальные для каждого добровольца фармакокинетические профили препарата сравнения (Герцептин®) и исследуемого препарата («Трастузумаб»)

Figure 1. Individual for each volunteer PK-profiles of reference (Herceptin®) and test drug (Trastuzumab)

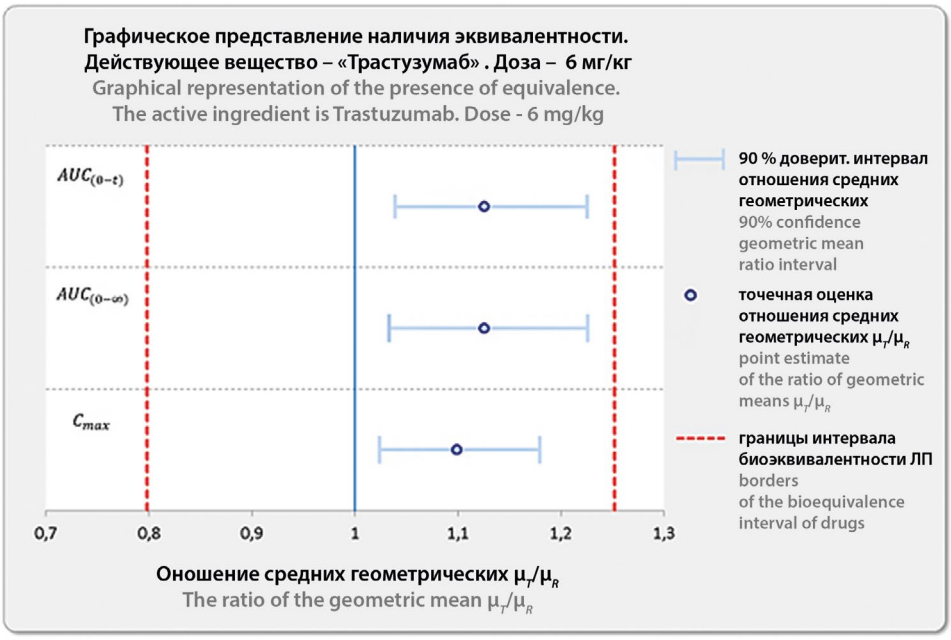


Рисунок 2. Графическое представление эквивалентности исследуемого препарата и препарата сравнения

Figure 2. The biosimilarity of test and reference drugs

Оценка иммуногенности

В ходе оценки иммуногенности трастузумаба было проведено 11 циклов в формате скрининга, после чего 32 образца из 440 проанализированных были признаны «потенциально положительными» на наличие связывающих антител к трастузумабу. Выявленные при скрининге образцы сыворотки крови добровольцев были дополнительно проанализированы в ходе 3 циклов в формате подтверждающего анализа, при этом ни у одного из добровольцев не было подтверждено наличие антител в образцах, что совпадает с литературными данными, свидетельствующими о сравнительно низкой иммуногенности трастузумаба [19, 20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена оценка фармакокинетики и иммуногенности препаратов «Трастузумаб» (ООО «Мабскейл») и Герцептин® (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Швейцария) после однократной внутривенной инфузии здоровым добровольцам. Для проведения аналитической части клинического исследования использовали две валидированные методики: количественного определения трастузумаба в сыворотке крови человека методом ИФА (реализована в составе готовой тест-системы «ИФА-Трастузумаб») и полуколичественного определения анти-лекарственных антител к трастузумабу методом ИФА в сочетании с кислотной диссоциацией образцов. Валидированные методики были успешно применены для анализа исследуемых образцов добровольцев из клинического исследования биоаналогичности. Рассчитанные фармакокинетические параметры, а также параметры относительной биодоступности и относительной степени всасывания трастузумаба после введения исследуемого препарата и препарата сравнения позволили сделать вывод о биоаналогичности сравниваемых препаратов. В ходе исследования иммуногенности анти-лекарственных антител к трастузумабу ни у одного из добровольцев выявлено не было.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Drebin J. A., Link V. C., Weinberg R. A., Greene M. I. Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1986;83(23):9129–9133. DOI: 10.1073/pnas.83.23.9129.
2. Coussens L., Yang-Feng T. L., Liao Y. C., Chen E., Gray A., McGrath J., Peter H. Seeburg P. H., Libermann T. A., Schlessinger J., Francke U., Levinson A., Ullrich A. Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene. *Science*. 1985;230(4730):1132–1139. DOI: 10.1126/science.2999974.
3. Shih C., Padhy L. C., Murray M., Weinberg R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*. 1981;290(5803):261–264. DOI: 10.1038/290261a0.
4. Beňačka R., Szabóová D., Guľašová Z., Hertelyová Z., Radoňák J. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers*. 2022;14(21):5444. DOI: 10.3390/cancers14215444.
5. Swain S. M., Shastry M., Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023;22(2):101–126. DOI:10.1038/s41573-022-00579-0.
6. Schlam I., Swain S. M. HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer*. 2021;7(1):56. DOI: 10.1038/s41523-021-00265-1.
7. Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J., Baughman S., Benz C. C., Dantis L., Sklarin N. T., Seidman A. D., Hudis C. A., Moore J., Rosen P. P., Twaddell T., Henderson I.C., Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1996;14(3):737–744. DOI: 10.1200/JCO.1996.14.3.737.
8. Pegram M. D., Lipton A., Hayes D. F., Weber B. L., Baselga J. M., Tripathy D., Baly D., Baughman S. A., Twaddell T., Glaspy J. A., Slamon D. J. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 1998;16(8):2659–2671. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.8.2659.
9. Joshi D., Khursheed R., Gupta S., Wadhwa D., Singh T. G., Sharma S., Porwal S., Gauniyal S., Vishwas S., Goyal S., Gupta G., Eri R. D., Williams K. A., Dua K., Singh S. K. Biosimilars in Oncology: Latest Trends and Regulatory Status. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2721. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122721.
10. Triantafyllidi E., Triantafillidis J. K. Systematic Review on the Use of Biosimilars of Trastuzumab in HER2+ Breast Cancer. *Biomedicines*. 2022;10(8):2045. DOI: 10.3390/biomedicines10082045.
11. Thill M. Biosimilar Trastuzumab in Clinical Trials: Differences or Not? *Breast Care (Basel)*. 2019;14(1):17–22. DOI: 10.1159/000496503.
12. Sim S. H., Kim J. E., Kim M. H., Park Y. H., Kim J. H., Suh K. J., Koh S.-J., Park K. H., Kang M. J., Ahn M. S., Lee K. E., Kim H.-J., Ahn H. K., Kim H. J., Park K. U., Byun J. H., Park J. H., Lee G.-W., Lee K. S., Sohn J., Jung K. H., Park I. H. Phase II study to investigate the efficacy of trastuzumab biosimilar (Herzuma®) plus treatment of physician's choice (TPC) in patients with heavily pretreated HER-2+ metastatic breast cancer (KCSG BR 18-14/KM10B). *Breast*. 2022;65:172–178. DOI: 10.1016/j.breast.2022.08.002.
13. Jagiello-Gruszfeld A. I., Lemanska I., Brewczynska E., Pogoda K., Dubianski R., Sienkiewicz R., Szombara E., Jagielska B., Nowecki Z. Trastuzumab biosimilar (Kanjinti) in breast cancer patients: One-center retrospective observational study. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(15_suppl):e13015–e13015 DOI: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.e13015.
14. Cardinali B., Lunardi G., Millo E., Armirotti A., Damonte G., Profumo A., Gori S., Iacono G., Levaggi A., Del Mastro L. Trastuzumab quantification in serum: a new, rapid, robust ELISA assay based on a mimetic peptide that specifically recognizes trastuzumab. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014;406:4557–4561. DOI: 10.1007/s00216-014-7842-4.
15. Pisarev V. V., Ivanov A. V. Validation of ELISA Test-system for Trastuzumab (Herceptin, Hertikad) quantitative determination in biological fluids. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2023;(1):58–64. (In Russ.) doi: 10.37489/2587-7836-2023-1-58-64.
16. Damen C. W., de Groot E. R., Heij M., Boss D. S., Schellens J. H., Rosing H., Beijnen J. H., Aarden L. A. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma. *Analytical Biochemistry*. 2009;391(2):114–120. DOI: 10.1016/j.ab.2009.05.030.
17. Maple L., Lathrop R., Bozich S., Harman W., Tacey R., Kelley M., Danilkovitch-Miagkova A. Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum. *Journal of Immunological Methods*. 2004;295(1–2):169–182. DOI: 10.1016/j.jim.2004.09.012.
18. Eliseeva O. A., Kolganova M. A., Shokhin I. E., Dementyev S. P., Vlasov A. M., Zamyatnin A. A., Dubovik N. S., Savchenko A. Yu., Dozmorova N. V., Luzhanin V. G. Development and Validation of the ELISA Method for Anti-trastuzumab Antibodies Determination in Human Serum. *Drug development & registration*. 2022;11(4):120–127. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-120-127.
19. 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;22:15. DOI: 10.1186/s12865-021-00405-z.
20. Xu B., Zhang Q., Sun T., Li W., Teng Y., Hu X., Bondarenko I., Adamchuk H., Zhang L., Trukhin D., Wang S., Zheng H., Tong Z., Shparyk Ya., Wang Q., and HLX02-BC01 Investigators. Efficacy, Safety, and Immunogenicity of HLX02 Compared with Reference Trastuzumab in Patients with Recurrent or Metastatic HER2-Positive Breast Cancer: A Randomized Phase III Equivalence Trial. *BioDrugs*. 2021;35:337–350. DOI: 10.1007/s40259-021-00475-w.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-250-259
УДК 615.065:615.035.2

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Методологические подходы к управлению рисками применения высокотехнологических лекарственных препаратов

А. А. Таубэ✉, Н. Ю. Вельц

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Таубэ Александра Альбертовна. **E-mail:** aleksandra.taube@pharminnotech.com; taubeaa@expmed.ru

ORCID: А. А. Таубэ – https://orcid.org/0000-0001-5594-4859; Н. Ю. Вельц – https://orcid.org/ 0000-0002-9514-6322.

Статья поступила: 08.06.2022 **Статья принята в печать:** 09.08.2023 **Статья опубликована:** 25.08.2023

Резюме

Введение. Высокотехнологические лекарственные препараты являются продуктом последних достижений медицинской науки. Но одновременно наряду с возможностями несут новые угрозы безопасности для пациентов. Специфические особенности производства и применения высокотехнологических лекарственных препаратов требуют особых подходов к управлению рисками их применения на всех этапах жизненного цикла, от получения материала для производства до введения пациенту.

Цель. Разработка подходов к управлению рисками применения высокотехнологических лекарственных препаратов для пациентов на примере CAR-T-клеточной терапии.

Материалы и методы. Материалами исследования послужили зарубежные нормативные правовые документы ЕС, США. Основой исследования послужили нормативные документы и руководства, подготовленные регуляторными органами для участников рынка: в США – CBER (FDA), в ЕС – CHMP (EMA).

Результаты и обсуждение. В соответствии с европейским риск-ориентированным подходом проведена классификация рисков для пациентов. Определены принципы управления каждым риском в зависимости от этапа жизненного цикла лекарственного препарата. Каждый вид риска рассмотрен в отдельности. Выявлено, что риски могут быть минимизированы следующим образом: путем соблюдения надлежащих практик, обеспечения необходимой квалификации или знаний для всех субъектов обращения лекарственного препарата. Основным инструментом контроля рисков применения является предоставление информации о применении лекарственного препарата в общей характеристике лекарственного препарата и инструкции по медицинскому применению.

Заключение. Выделены основные этапы возникновения отдельных видов рисков высокотехнологических лекарственных препаратов, каждый вид риска рассмотрен отдельно. Для управления рисками применения высокотехнологических лекарственных препаратов необходимо сформулировать перечень требований: к дистрибьютеру – в части перевозки и хранения ЛП, отчетности перед держателем регистрационного удостоверения; к медицинскому учреждению – в части хранения, процедур подготовки к терапии, процедуры терапии, консультирования и информирования пациента о рисках терапии и симптомах нежелательных явлений, предшествующих и последующих медицинских манипуляциях, отчетности перед держателем регистрационного удостоверения; к медицинскому персоналу – в связи с его квалификацией в части хранения, процедур подготовки к терапии, процедуры терапии, консультирования и информирования пациента о рисках терапии и симптомах нежелательных реакций, последующих медицинских процедурах. На основе полученных данных планируется разработка рекомендаций для разработчиков высокотехнологических лекарственных препаратов.

Ключевые слова: высокотехнологические лекарственные препараты, CAR-T-клетки, клеточная терапия, адоптивная иммунотерапия, фармаконадзор, план управления рисками

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

Вклад авторов. А. А. Таубэ — концепция исследования, анализ и интерпретация полученных результатов, написание текста рукописи, работа с табличным материалом, ответственность за все аспекты работы. Н. Ю. Вельц — редактирование текста, ответственность за все аспекты выполнения работы.

Для цитирования: Таубэ А. А., Вельц Н. Ю. Методологические подходы к управлению рисками применения высокотехнологических лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):250–259. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-250-259

Methodological Approaches to Risk Management of Advanced Therapy Medicinal Products

Alexandra A. Taube✉, Nataliya Yu. Velts

Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSBI "SCEEMP"), 8/2, Petrovsky boulevard, Moscow, 127051, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexandra A. Taube. **E-mail:** aleksandra.taube@pharminnotech.com; taubeaa@expmed.ru

ORCID: Alexandra A. Taube – https://orcid.org/0000-0001-5594-4859; Nataliya Yu. Velts – https://orcid.org/ 0000-0002-9514-6322.

Received: 08.06.2022 **Revised:** 09.08.2023 **Published:** 25.08.2023

© Таубэ А. А., Вельц Н. Ю., 2023
© Taube A. A., Velts N. Yu., 2023

Abstract
Introduction. Advanced therapy medicinal products (ATMPs) rely on recent advances in medical science, but alongside with potential benefits they may also bring safety concerns for patients. The inherent complexity of the ATMP production and use calls for special approaches to risk management throughout their lifecycle, from obtaining the raw materials to administration to the patient.
Aim. The aim of the present study was to develop approaches to risk management for ATMPs, using the example of CAR T-cell therapy.
Materials and methods. The study analysed the relevant regulatory frameworks currently in force in the European Union and the United States of America, namely the regulations and guidelines adopted by the Center for Biologics Evaluation and Research of the U.S. Food and Drug Administration and the Committee for Medicinal Products for Human Use of the European Medicines Agency.
Results and discussion. The paper provides a classification of patient risks, which was developed based on the European risk-based approach. It formulates the principles of risk management for each of the risks, depending on the stage of the product life cycle. Each type of risk was considered separately. The following risk minimization strategies were determined: compliance with the good practices, ensuring the necessary qualifications or expertise of all parties involved in the product life cycle. The main element of risk control is the detailed description of the medicinal product use in the summary of product characteristics and patient information leaflet.
Conclusion. The study identified the main stages at which ATMP risks may occur, and each type of risk was considered separately. The following requirements should be put in place in order to manage the ATMP risks: requirements for distributors on how to perform the product transportation and storage and to keep records for the marketing authorisation holder; requirements for healthcare facilities on how to perform the product storage, its preparation for use, advising and informing the patients on the treatment risks, symptoms of adverse events, preparatory and follow-up medical procedures, and on how to keep records for the marketing authorisation holder; requirements for the qualifications of healthcare professionals who are in charge of the product storage, its preparation for use, treatment procedures, advising and informing the patients on the treatment risks, symptoms of adverse events, and follow-up medical procedures. The data obtained will be used in the preparation of recommendations for ATMP developers.

Keywords: advanced therapy medicinal products; CAR-T-cells; cell therapy; adoptive immunotherapy; pharmacovigilance; risk management plan

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. Alexandra A. Taube – the concept of the study, analysis and interpretation of the results, writing the text of the manuscript, working with tabular material, responsibility for all aspects of the work. Nataliya Yu. Velts – editing the text, responsible for all aspects of the work.

For citation: Taube A. A., Velts N. Yu. Methodological approaches to risk management of advanced therapy medicinal products. *Drug development & registration*. 2023;12(3):250–259. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-250-259

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИМП	инструкция по медицинскому применению
ЛВ	листок-вкладыш
ЛП	лекарственный препарат
ОХЛП	общая характеристика лекарственного препарата
НР	нежелательная реакция
ПУР	план управления рисками
ALL	острый лимфобластный лейкоз
CAR	химерный рецептор антигена
DLBCL	диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома

ВВЕДЕНИЕ

Адоптивная терапия лечения онкологических заболеваний является относительно молодым и революционным методом клеточной терапии [1–3]. Наиболее перспективным направлением адоптивной терапии является терапия CAR-T-клетками [4, 5]. Терапия CAR (Chimeric antigen receptor) Т-клетками (лимфоцитами) основана на выделении путем делеции Т-клеток от здоровых доноров (аллогенные) или пациента (аутологичные) [6, 7]. Далее Т-лимфоциты трансдуцируют вирусными (ретровирусными или лентивирусными) или невирусными векторами (CAR, химерными антигенными рецепторами), загружающими гены CAR [3] с образованием CAR-T-клетки, которая представляет собой эффекторную Т-клетку, распознающую и уничтожающую специфические раковые клетки независимо от молекул главного комплекса гистосовместимости [3]. На следующем этапе культивируемые CAR-T-клетки размножаются и очищаются. Производственный процесс от сбора Т-клеток пациента с помощью афереза до получения лекарственного препарата (ЛП) в среднем занимает 3–4 недели [8], далее ЛП инфузионно вводится пациенту для специфического воздействия на опухолевые клетки [3]. CAR-T-терапия в настоящий момент используется преимущественно для лечения гематологических злокачественных новообразований [4, 9–11].

В перспективе некоторые исследования прогнозируют применение CAR-T-клеток для лечения солидных опухолей, включая меланому, рак молочной железы и саркому [12], другие [3, 13] считают лечение солидных опухолей нецелесообразным из-за недостаточности и нетипичности молекулярных мишеней для CAR-T-клеток, чтобы атаковать и контролировать микроокружение опухоли. Метод также рассматривается как перспективный для лечения хронических инфекций и аутоиммунных заболеваний [14]. Адоп-

тивная клеточная терапия продемонстрировала значительную клиническую противоопухолевую эффективность *in vivo* [6, 9, 11, 12], эффективность CAR-T-клеточной терапии оказывается значительно выше, чем у традиционной радиотерапии, химиотерапии и аутологичной/аллогенной трансплантации стволовых клеток в условиях рецидивирующего/рефрактерного заболевания [6, 10, 11, 15–18].

Клинический успех терапии CAR-T-клетками при гематологических злокачественных новообразованиях мотивирует дальнейшее расширение показаний, но одновременно с возможностями возникают новые угрозы безопасности терапии для пациентов [19–21]. Терапия связана с серьезными побочными эффектами, такими как синдром высвобождения цитокинов [10, 21, 22] и синдром нейротоксичности, связанный с иммунными эффекторными клетками [4, 8, 10, 17, 18, 21]. В настоящее время в мире проводятся интенсивные неклинические и клинические исследования [8, 10], чтобы понять оптимальную структуру и дозу CAR-T-клеток, усилить эффективность и снизить токсичность проводимой терапии. «Процесс управления рисками необходим для обеспечения применения ЛП при максимально возможном превышении пользы определенного ЛП или совокупности ЛП над рисками для каждого пациента и для целевых популяций в целом» [23].

Согласно российскому законодательству ЛП генной и клеточной терапии обозначаются термином «биомедицинские клеточные продукты» (БМКП) и регулируются отдельным Федеральным законом от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»[1]. В законодательстве ЕАЭС применяется термин «высокотехнологические лекарственные препараты» (ВТЛП), которые регулируются одинаково с остальными ЛП[2].

В результате перехода регулирования рынка обращения лекарственных средств с национального на наднациональный уровень в рамках ЕАЭС изменились правила подачи документов в составе регистрационного досье (РД) в форме общего технического документа [24]. Согласно правилам надлежащей практики фармаконадзора ЕАЭС[3] в составе модуля 1 РД при регистрации или внесении изменений в РД на ВТЛП заявитель подает план управления рисками (ПУР) [23]. Целью ПУР является описание системы управления рисками для ЛП с надлежащим планированием управления рисками на протяжении всего жизненного цикла продукта. С этой целью ПУР документирует профиль безопасности продукта, подчеркивая проблемы безопасности, требующие дальнейшей оценки и/или минимизации риска, действия по фармаконадзору (ФН) для характеристики проблем безопасности и меры, предназначенные для предотвращения или минимизации рисков для пациентов [25].

Цель исследования – разработка подходов к управлению рисками применения высокотехнологических лекарственных препаратов для пациентов на примере CAR-T-клеточной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами исследования послужили зарубежные нормативные правовые документы и руководства ЕС, США: Guideline on safety and efficacy follow-up and risk management of advanced therapy medicinal products (EMEA/149995/2008), Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council on advanced therapy medicinal products; Code of Federal Regulations, Title 21 – Food and drugs, Part 1271 – Human cells, tissues, and cellular and tissue-based products; European Medicines Agency. Legal framework: pharmacovigilance; European Medicines Agency and Heads of Medicines Agencies. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP), Module V – Risk management systems, EMA/838713/2011, 20 February 2012; European Medicines Agency and Heads of Medicines Agencies. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP), Module V – Risk management systems (Rev 2), EMA/838713/2011 Rev 2*, 28 March 2017; European Medicines Agency. Guidance on the format of the risk management plan (RMP) in the EU – in integrated format, EMA/164014/2018 Rev.2.0.1 accompanying GVP, Module V, Rev.2, 31 October 2018; Guideline on safety and efficacy follow-up – risk management of advanced therapy medicinal products; Summary of risk management plan for yescarta (axicabtagene ciloleucel); Summary of opinion 1 (post authorisation) Yescarta; Clinical Pharmacology BLA Review Division of Clinical Evaluation and Pharmacology/Toxicology Office of Tissues and Advanced Therapy (Yescarta); Package Insert – YESCARTA.

В работе применялись структурно-логические методы, методы наблюдения, моделирования, экстраполяции и сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активно проводимые клинические исследования и одобрение для применения в клинической практике ЛП клеточной терапии подтверждают их перспективность для восполнения неудовлетворенных медицинских потребностей в мире. В таблице 1 представлены сроки авторизации и утвержденные показания к применению в ЕС и США ЛП CAR-T-терапии.

[1] Федеральный закон от 23.06.2016 № 180-ФЗ (ред. от 08.03.2022) «О биомедицинских клеточных продуктах».

[2] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 (ред. от 17.03.2022) «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

[3] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 87 «Об утверждении Правил надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза».

Таблица 1. Одобренные лекарственные препараты терапии CAR-T-клетками

Table 2. Approved drugs for CAR-T cell therapy

	Авторизация, г Marketing authorisation (FDA/EMA)	**FDA, показания** FDA-approved	**EMA, показания** EMA, Approved use
Axi-cel (Yescarta)	2017/2018	DLBCL; В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности (HGBCL); первичная медиастинальная В-клеточная лимфома [11]; крупноклеточная В-клеточная лимфома, рефрактерная к препаратам первой линии, химиоиммунотерапии, или рецидив в течение 12 месяцев[1] DLBCL; diffuse large B-cell lymphoma, high grade B-cell lymphoma (HGBCL); primary mediastinal B-cell lymphoma[1]	Рецидивирующая или рефрактерная DLBCL; первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома (2022)[2] DLBCL relapsed/refractory; primary mediastinal B-cell lymphoma; follicular lymphoma (FL)[2]
Tisa-cel (Kymriah)	2018/2018	Рецидивирующая/рефрактерная DLBCL; двойная лимфома или tFL-фолликулярная лимфома; В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности и DLBCL, возникающие из фолликулярной лимфомы[3] ALL; Relapsed/refractory DLBCL relapsed/refractory and FL specified, high grade B-cell lymphoma and DLBCL arising from FL relapsed or refractory FL; B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL) that is refractory or in second or later relapse[3]	Рецидивирующий/рефрактерный В-клеточный ALL; рецидивирующая/рефрактерная DLBCL Relapsed/refractory DLBCL relapsed/refractory and FL; DLBCL relapsed/refractory
Liso-cel (Breyanzi)	2021/2022	Рецидивирующая/рефрактерная крупноклеточная В-клеточная лимфома после двух или более линий системной терапии, включая DLBCL, В-клеточная лимфома, первичная крупноклеточная В-клеточная лимфома, средостения и фолликулярная лимфома степени 3В[4] LBCL, DLBCL. not otherwise specified, high-grade B-cell lymphoma, primary mediastinal large B-cell lymphoma, FL grade 3B[4]	DLBCL; первичная медиастинальная крупноклеточная В-клеточная лимфома (PMBCL); фолликулярная лимфома 3В степени (FL3B)[5] DLBCL; primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBCL); FL grade 3B[5]
Brexucabtagene autoleucel (Tecartus)	2021/2020	Рецидивирующая/рефрактерная мантийно-клеточная лимфома (MCL); рецидивирующий/рефрактерный ALL предшественников В-клеток[6] Relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). Relapsed/refractory (r/r) B-cell precursor acute ALL[6]	Лимфома из клеток мантийной зоны[7] Mantle cell lymphoma[7]
Carvykti (ciltacabtagene autoleucel)	2022/2022 условное 2022/2022 conditional	Рецидивирующая или рефрактерная множественная миелома[8] Relapsed/refractory multiple myeloma[8]	Рецидивирующая и рефрактерная множественная миелома[9] Relapsed/refractory multiple myeloma[9]

Примечание. [1] FDA. U.S. Food & Drug. Доступно по: https://www.fda.gov/media/157539/download. Ссылка активна на 26.09.2022.
[2] European Medicines Agency. Доступно по: https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop/chmp-post-authorisation-summary-opinion-yescarta-ii-42_en.pdf. Ссылка активна на 26.09.2022.
[3] Highlights of prescribing information. Доступно по: https://www.fda.gov/media/107296/download. Ссылка активна на 26.09.2022.
[4] BREYANZI (lisocabtagene maraleucel). Доступно по: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/breyanzi-lisocabtagene-maraleucel. Ссылка активна на 26.09.2022.
[5] European Medicines Agency. Breyanzi. Доступно по: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/breyanzi. Ссылка активна на 26.09.2022.
[6] TECARTUS (brexucabtagene autoleucel). Доступно по: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/tecartus-brexucabtagene-autoleucel. Ссылка активна на 26.09.2022.
[7] European Medicines Agency. EU/3/19/2220: Orphan designation for the treatment of mantle cell lymphoma. Доступно по: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu3192220. Ссылка активна на 26.09.2022.
[8] CARVYKTI. Доступно по: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/carvykti. Ссылка активна на 26.09.2022.
[9] European Medicines Agency. New gene therapy to treat adult patients with multiple myeloma. Доступно по: https://www.ema.europa.eu/en/news/new-gene-therapy-treat-adult-patients-multiple-myeloma. Ссылка активна на 26.09.2022.

Note. [1] FDA. U.S. Food & Drug. Available at: https://www.fda.gov/media/157539/download. Accessed: 26.09.2022.
[2] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop/chmp-post-authorisation-summary-opinion-yescarta-ii-42_en.pdf. Accessed: 26.09.2022.
[3] Highlights of prescribing information. Available at: https://www.fda.gov/media/107296/download. Accessed: 26.09.2022.
[4] BREYANZI (lisocabtagene maraleucel). Available at: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/breyanzi-lisocabtagene-maraleucel. Accessed: 26.09.2022.
[5] European Medicines Agency. Breyanzi. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/breyanzi. Ссылка активна на 26.09.2022. Accessed: 26.09.2022.
[6] TECARTUS (brexucabtagene autoleucel). Available at: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/tecartus-brexucabtagene-autoleucel. Accessed: 26.09.2022.
[7] European Medicines Agency. EU/3/19/2220: Orphan designation for the treatment of mantle cell lymphoma. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu3192220. Accessed: 26.09.2022.
[8] CARVYKTI. Available at: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/carvykti. Accessed: 26.09.2022.
[9] European Medicines Agency. New gene therapy to treat adult patients with multiple myeloma. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/news/new-gene-therapy-treat-adult-patients-multiple-myeloma. Accessed: 26.09.2022.

Таблица 2. Риски, связанные с качественными характеристиками ЛП, хранением и применением Yescarta

Table 2. Risks associated with drug assessment, storage and use of Yescarta

Риск **Risk**	**Мероприятие** **Event**	**Управление** **Control**
Производственный брак Manufacturing defect	GMP; ИМП, ЛВ GMP; label and package leaflet	Лицензирование; Информирование пациента и медицинскго персонала Production Licensing Informing the patient and medical staff
Инфицирование при производстве Contamination during manufacturing	GMP	Лицензирование Product Licensing
Реакции гиперчувствительности Hypersensitivity reactions	GMP; ОХЛП; ИМП GMP; summary of Product Characteristics; label and package leaflet	Информирование пациента и медицинского персонала; обучение медицинского персонала терапии Informing the patient and medical staff; Medical personnel training in therapy
Риски, связанные с логистическими операциями: – холодовая цепь; – контаминация; – перепутывание Risks associated with logistics operations: – cold chain; – contamination; – confusion	ОХЛП, ИМП, GDP, GSP. Обеспечение холодовой цепи, исключение перепутывания Summary of Product Characteristics. label and package leaflet; GDP; GSP	Надлежащая маркировка; информирование и обучение дистрибьютера и медицинского персонала Labeling; Information and education distributor and medical staff

Yescarta и Kymriah начали применяться в рамках европейской программы PRIME (неудовлетворенные медицинские потребности) с 2016 года. Вскоре последовало их утверждение и маркетинговая авторизация США (2017) и ЕС (2018). Последний одобренный EMA ЛП CAR-T-терапии (25.03.2022 г.) – Carvykti. Все ЛП признаны в ЕС и США орфанными ЛП. 1 апреля 2022 FDA одобрило расширенное использование Yescarta в качестве первого варианта после химиотерапии для взрослых с запущенной агрессивной формой рака крови[1]. Ожидается, что несколько других клеточных продуктов CAR-T получат одобрение FDA в ближайшие 3–5 лет [4].

В соответствии с риск-ориентированным подходом EMA[2] в ЕС риски классифицируются следующим образом: риски для пациентов, риски для третьих лиц и риски для окружающей среды. Риски для пациентов можно условно разделить на три группы: риски, связанные с качественными характеристиками ЛП, хранением и применением ВПТЛ; риски, связанные с взаимодействием ЛП с пациентом, стойкостью его в организме пациента; риски для пациентов, связанные с процедурами введения и последующими манипуляциями.

Рассмотрим, как решается каждая проблема риска для пациента в отдельности на примере ЛП Yescarta. Отметим, что для разных категорий рисков решения по их минимизации могут быть одинаковыми или похожими. Риски для пациентов, связанные с качественными характеристиками, хранением и применением Yescarta, представлены в таблице 2.

В клинических исследованиях обнаружена вероятность производственного брака <1 %, которая приводит к неэффективности ЛП[3]. Информация вынесена в инструкции по медицинскому применению ИМП (ЛВ), пациент предупреждается о необходимости повторного курса в случае производственного брака. Управление риском в данном случае заключается в обеспечении качества производимой продукции в соответствии с правилами надлежащей производственной практики. Риск инфицирования продукции связан с высоким риском контаминации ЛП злокачественными клетками в аутологичных условиях и управляется надлежащей производственной (тканевой) практикой.

Риски возникновения реакций гиперчувствительности обусловлены технологией производства и могут быть вызваны диметилсульфоксидом или остаточным содержанием гентамицина в препарате. Управление заключается в контроле качества производимой продукции, нанесении предупреждения в ИМП (ЛВ), обучении медицинского персонала купи-

[1] Reuters®. Available at: https://www.reuters.com/markets/companies/GILD.O. Accessed: 26.09.2022.

[2] European Medicines Agency. Guideline on safety and efficacy follow-up and risk management of advanced therapy medicinal products – Scientific guideline. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/guideline-safety-efficacy-follow-risk-management-advanced-therapy-medicinal-products. Accessed: 26.09.2022.

[3] LABEL: YESCARTA- axicabtagene ciloleucel suspension. Available at: https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=9b70606e-b99c-4272-a0f1-b5523cce0c59. Accessed: 26.09.2022.

рованию аллергических реакций, информировании пациента о возможных симптомах и необходимости при возникновении симптомов обращения к врачу. Управление рисками, связанными с особенностями перевозки и хранения ЛП, реализуется путем обучения сотрудников, дистрибьюторов и персонала медицинских учреждений, соблюдения правил надлежащей дистрибьюторской практики и надлежащей практики хранения.

Риски, связанные с взаимодействием ЛП с пациентом, фармакокинетическими и фармакодинамическими характеристиками ЛП в организме пациента, представлены в таблице 3.

Вся идентифицированная информация о перечисленных в таблице 3 рисках имеется в общей характеристике лекарственного препарата (ОХЛП) и ИМП (ЛВ). Как правило, нежелательные реакции (НР) связаны с механизмом действия Yescarta, составлены рекомендации по их устранению. Управление рисками заключается в том, что медицинский работник разъясняет пациенту все возможные симптомы НР и информирует, что при возникновении симптомов необходимо обратиться к врачу. Медицинский персонал обучен обнаруживать НР и проводить соответствующую терапию. Например, перед вводом Yescarta медицинский работник должен убедиться, что в наличии имеется 2 терапевтические дозы тоцилизумаба. Из серьезных инфекций отмечаются вирусные инфекции или определяемые клинические симптомы реактивации опоясывающего лишая или легочной грибковой инфекции [26]. Поэтому перед сбором клеток для производства рекомендует-

Таблица 3. Риски, связанные с взаимодействиями Yescarta с пациентом

Table 3. Risks related to patient associated conditions/ /disease or underlying disease, or concomitant treatment

Риск **Risk**	**Мероприятие** **Event**	**Управление** **Control**
Цитокиновый шторм – 88–98 % пациентов Cytokine release syndrome – 88–98 % patients	ОХЛП. ИМП. Обучающие программы Summary of Product Characteristics. label and package leaflet. Tutorials	Информация на этикетке. Информирование пациентов. Обучение персонала label and package leaflet. Informing patients. Training
Неврологическая токсичность – 80 % пациентов Neurological toxicity – 80 % patients	То же Same	Информация на этикетке. Мониторинг состояния пациента ежедневно 7 дней в сертифицированном медицинском учреждении Labeling. Monitoring the patient's condition daily for 7 days in a certified medical institution
Серьезные инфекции. Продолжительная цитопения. Гипогаммаглобулинемия Serious infections. Prolonged cytopenia. Hypogammaglobulinemia	То же Same	Скрининг пациента. Информация на этикетке. Утвержденные программы терапии Patient Screening. Information on the label. Approved Therapy Programs
Вторичные злокачественные новообразования Secondary malignant neoplasms	То же Same	Долгосрочный контроль пациентов Long-term follow-up of patients
Возраст, пол Age, gender	ОХЛП. ИМП (ЛВ). Мониторинг Summary of Product Characteristics. label and package leaflet. Monitoring	Информирование, обучение пациента и медицинского персонала Informing, educating the patient and medical staff
Риск внеопухолевых эффектов, нецелевых эффектов Risk of non-tumor effects, off-target effects	ОХЛП. ИМП (ЛВ) Summary of Product Characteristics. label and package leaflet	Следует рассматривать как часть общей оценки риска терапии Part of the overall risk assessment of therapy
Изменение/снижение сознания или координации Change/decreased consciousness or coordination	То же Same	Этикетка и устное предупреждение о влиянии на способность управлять автомобилем и работать с механизмами Label and verbal warning of effects on ability to drive and operate machinery
Другие НР Other AE	То же Same	Информирование, обучение пациента и медицинского персонала Informing, educating the patient and medical staff

Таблица 4. Риски для пациентов, связанные с процедурами введения Yescarta

Table 4. Risks to patients related to administration procedures

Риск Risk	Мероприятие Event	Управление Control
Подготовка пациента перед терапией Preparing the patient before therapy	ОХЛП. ИМП (ЛВ). Обучение медицинского персонала. Информирование пациента Summary of Product Characteristics. label and package leaflet Training of medical personnel. Informing the patient	Процедуры подготовки пациента. Наличие ЛП от НР в медицинском учреждении; Информирование пациента об особенностях и проявлениях НР; обучение терапии НР Patient preparation standards. the presence of drugs from AR in a medical institution; informing the patient about the features and manifestations of AR; AR Therapy Education
Размораживание Defrosting	ОХЛП. ИМП (ЛВ) Обучение медицинского персонала Summary of Product Characteristics. label and package leaflet. Educating the medical staff	Обучение условиям хранения и подготовки ЛП к инфузии Training in the conditions of storage and administration procedures
Идентификация пациента Patient identification	Маркировка. Обучение медперсонала Label and package leaflet. educating the medical staff	Сравнение информации на кассете с идентификаторами пациента Comparison of Information on the Cassette with Patient IDs

ся выполнять скрининг на вирусные гепатиты и ВИЧ. Вероятность появления вторичных злокачественных новообразований остается пожизненно. Поэтому программы управления рисками всех зарегистрированных ЛП содержат условия долгосрочного контроля развития новообразований. Для этого EMA требует использование реестра пациентов для мониторинга долгосрочной безопасности и эффективности лечения в качестве условия для получения регистрационного удостоверения[1].

Выявлено, что частота развития синдрома высвобождения цитокинов [19], неврологической токсичности дозозависима [13, 14], а также зависит от пола, возраста. У женщин чаще встречались неврологические проявления по сравнению с субъектами мужского пола [19]. Определено, что риск тяжелого синдрома высвобождения цитокинов и нейротоксичности коррелирует с дозой CAR-T-клеток [27], а также опухолевой нагрузкой [8, 10]. В клинических исследованиях [8, 10] определили сывороточные биомаркеры, которые позволяют выявить степень риска для пациентов и начать стратегии раннего вмешательства у пациентов с самым высоким риском токсичности. Внеопухолевый эффект и «нецелевой» эффект рассматривается как часть общей оценки специфичного риска для терапии CAR-T-клетками. Риск изменения или снижения сознания или координации как следствие неврологической токсичности терапии может наблюдаться в течение 2 месяцев после введения ЛП. К факторам риска также следует отнести вероятность резистентности опухолевых клеток к терапии. Преобладающим механизмом резистентности является потеря рецепторов к CAR-T-клеткам и ингибирование микроокружением опухоли [27].

Риски, связанные с процедурами инфузии Yescarta, минимизируются на уровне сертифицированного медицинского учреждения. В качестве примера в таблице 4 приведены некоторые риски.

Риски минимизируются подготовкой пациента как на уровне терапии, так и до начала терапии. Проводится предварительное обучение медицинского персонала диагностике состояния пациента, необходимости назначения предварительной терапии до начала терапии, а также особенностям и технике инфузии Yescarta.

Ограничение настоящего исследования: не рассмотрены риски применения ВТЛП для третьих лиц и окружающей среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, контроль рисков для пациентов при терапии ЛП Yescarta пропорционален уровню рисков и сфокусирован на сохранении надлежащего качества произведенной продукции на всей логистической цепочке, от производителя до пациента, оказании надлежащих медицинских услуг, профилактике и ранней диагностике НР. Производитель предоставляет информацию медицинским организациям по профилактике и уменьшению тяжести и серьезности НР. Для профилактики НР проводится обучение пациентов и медицинских работников раннему определению симптомов НР. Для ранней диагностики НР производитель разрабатывает тре-

[1] European Medicines Agency. First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/news/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union. Accessed: 26.09.2022.

бования к процедурам наблюдения за пациентами на наличие признаков или симптомов и к диагностике, прежде всего серьезных НР. В случае их появления производитель дает рекомендации по терапии. Для подтверждения соответствия медицинских учреждений предъявляемым требованиям проводится их квалификация в форме сертификации. Список авторизованных медицинских центров производитель размещает на своем сайте.

Основным инструментом контроля рисков применения ВТЛП являются ОХЛП для информирования медицинских работников, ИМП (ЛВ) – для информирования медицинских работников и пациентов. При этом:

- обо всех рисках, кроме связанных с логистикой и техникой инфузии, пациент информируется перед началом терапии;
- о рисках, связанных с логистикой и хранением, предупреждены дистрибьютеры и медицинские учреждения;
- о рисках, так или иначе связанных с пациентом и его состоянием и сопутствующими заболеваниями, медицинский персонал проинформирован и обучен мероприятиям по контролю за рисками.

Для управления рисками применения ВТЛП необходимо сформулировать перечень требований к:

1. Дистрибьютеру – в части перевозки и хранения ЛП, отчетности перед держателем регистрационного удостоверения.
2. Медицинскому учреждению – в части хранения ЛП, процедур подготовки к терапии, консультирования и информирования пациента о рисках терапии и симптомах НР, предшествующих и последующих медицинских манипуляциях, отчетности перед держателем регистрационного удостоверения.
3. Медицинскому персоналу – в части хранения ЛП, процедур подготовки в терапии, процедуры введения инъекции, консультирования и информирования пациента о рисках терапии и симптомах нежелательных реакций, последующих медицинских процедурах, отчетности в медицинском учреждении.

На основе полученных данных планируется разработка рекомендаций для разработчиков высокотехнологических лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nair R., Westin J. CAR T-Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2020;1244:215–233. DOI: 10.1007/978-3-030-41008-7_10.
2. Ершов А. В., Демьянов Г. В., Насруллаева Д. А., Радкевич Е. Р., Долгих В. Т., Сидорова Н. В., Валиев Т. Т., Ефимова М. М., Мачнева Е. Б., Киргизов К. И., Киселевский М. В., Манасова З. Ш. Новейшие тенденции в совершенствовании CAR-T-клеточной терапии: от лейкозов к солидным злокачественным новообразованиям. *Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГиО)*. 2021;8(2):84–95. DOI: 10.21682/2311-1267-2021-8-2-84-95.
3. Zhao Z., Chen Y., Francisco N. M., Zhang Yu., Wu M. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(4):539–551. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.03.001.
4. Sakemura R., Can I., Siegler E. L., Kenderian S. S. In vivo CART cell imaging: Paving the way for success in CART cell therapy. *Molecular Therapy – Oncolytics*. 2021;20:625–633. DOI: 10.1016/j.omto.2021.03.003.
5. Yan Z., Zhang H., Cao J., Zhang C., Liu H., Huang H., Cheng H., Qiao J., Wang Y., Wang Y., Gao L., Shi M., Sang W., Zhu F., Li D., Sun H., Wu Q., Qi Y., Li H., Wang X., Li Z., Liu H., Zheng J., Qian W., Zhang X., Xu K. Characteristics and Risk Factors of Cytokine Release Syndrome in Chimeric Antigen Receptor T Cell Treatment. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:611366. DOI: 10.3389/fimmu.2021.611366.
6. Leedom T., Hamil A. S., Pouyanfard S., Govero J., Langland R., Ballard A., Schwarzkopf L., Martens A., Espenschied A., Vinay P., James M., Mahajan N., Spencer D. H., Chrobak K. M., Cooper M. L, Kabakibi A. Characterization of WU-CART-007, an Allogeneic CD7-Targeted CAR-T Cell Therapy for T-Cell Malignancies. *Blood*. 2021;138(1):2772. DOI: 10.1182/blood-2021-153150.
7. Vormittag P., Gunn R., Ghorashian S., Veraitch F. S. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018;53:164–181. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.01.025.
8. Turtle C. J., Hanafi L. A., Berger C., Gooley T. A., Cherian S., Hudecek M., Sommermeyer D., Melville K., Pender B., Budiarto T. M., Robinson E., Steevens N. N., Chaney C., Soma L., Chen X., Yeung C., Wood B., Li D., Cao J., Heimfeld S., Jensen M. C., Riddell S. R., Maloney D. G. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(6):2123–2138. DOI: 10.1172/JCI85309.
9. Yan L., Jue X., Hu Y., Huang H. Therapeutic Effect of Platelet Transfusion in Patients with Acute Lymphocytes Treated with CART Therapy. *Blood*. 2018;132(1):5073. DOI: 10.1182/blood-2018-99-120108.
10. Pan J., Yang J. F., Deng B. P., Zhao X. J., Zhang X., Lin Y. H., Wu Y. N., Deng Z. L., Zhang Y. L., Liu S. H., Wu T., Lu P. H., Lu D. P., Chang A. H., Tong C. R. High efficacy and safety of low-dose CD19-directed CAR-T cell therapy in 51 refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*. 2017;31(12): 2587–2593. DOI: 10.1038/leu.2017.145.
11. Haydu J. E., Abramson J. S. CAR T-Cell therapies in lymphoma: current landscape, ongoing investigations, and future directions. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. 2021;7:36. DOI: 10.20517/2394-4722.2021.39.
12. Watanabe K., Hiroyoshi N. Engineering strategies for broad application of TCR-T-and CAR-T-cell therapies. *International Immunology*. 2021;33(11):551–562. DOI: 10.1093/intimm/dxab052.
13. Устюгова Е. А., Савкина М. В., Горяев А. А., Бондарев В. П., Меркулов В. А., Мельникова Е. В. Применение биомедицинских клеточных продуктов для лечения онкологических заболеваний. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):206–214. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-4-206-214.
14. David M. B., Stephan A. G., Carl H. J. Chimeric antigen receptor- and TCR-modified T cells enter main street and wall street. *J Immunol*. 2015;195(3):755–761. DOI: 10.4049/jиммунол.1500751.
15. Schuster S. J., Bishop M. R., Tam C. S., Waller E. K., Borchmann P., McGuirk J. P., Jäger U., Jaglowski S., Andreadis C., Westin J. R., Fleury I., Bachanova V., Foley S. R., Ho P. J., Mielke S., Magenau J. M., Holte H., Pantano S., Pacaud L. B., Awasthi R., Chu J., Anak Ö., Salles G., Maziarz R. T. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(1):45–56. DOI: 10.1056/NEJMoa1804980.
16. Song Y., Ying Z., Yang H., Guo Y., Li W., Zou D., Zhou D., Wang Z., Zhang M., Wu J., Liu H., Zhang P., Yang S., Zhou Z., Zheng H., Zhu J. Relmacabtagene Autoleucel CD19 CART Therapy for Adults with Heavily-Pretreated Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma in China. *Blood*. 2021;138(1):3557. DOI: 10.1182/blood-2021-148358.

17. Sakemura R., Hefazi M., Siegler E. L., Cox M. J., Larson D. P., Hansen M. J., Roman C. M., Schick K. J., Can I., Tapper E. E., Horvei P., Adada M. M., Bezerra E. D., Fonkoua L. A. K., Ruff M. W., Nevala W. K., Walters D. K., Parikh S. A., Lin Y., Jelinek D. F., Kay N. E., Bergsagel P. L., Kenderian S. S. Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in the Bone Marrow Prevents Resistance to CART-Cell Therapy in Multiple Myeloma. *Blood*. 2022;139(26):3708–3721. DOI: 10.1182/blood.2021012811.
18. Meng J., Wu X., Sun Z., Xun R., Liu M., Hu R., Huang J. Efficacy and Safety of CAR-T Cell Products Axicabtagene Ciloleucel, Tisagenlecleucel, and Lisocabtagene Maraleucel for the Treatment of Hematologic Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:698607. DOI: 10.3389/fonc.2021.698607.
19. Neelapu S.S. Managing the toxicitiesof CAR T-cell therapy. *Hematological Oncology*. 2019;37(S1):48–52. DOI: 10.1002/hon.2595.
20. Hashmi H., Mirza A. S., Darwin A., Logothetis C., Garcia F., Kommalapati A., Mhaskar R. S., Bachmeier C., Chavez J. C., Shah B., Pinilla-Ibarz J., Khimani F., Lazaryan A., Liu H., Davila M. L., Locke F. L., Nishihori T., Jain M. D. Venous thromboembolism associated with CD19-directed CAR T-cell therapy in large B-cell lymphoma. *Blood Advances*. 2020;4(17):4086–4090. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002060.
21. Goto H., Makita S., Kato K., Tokushige K., Fujita T., Akashi K., Izutsu K., Teshima T. Efficacy and safety of tisagenlecleucel in Japanese adult patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *International Journal of Clinical Oncology*. 2020;25(9):1736–1743. DOI: 10.1007/s10147-020-01699-6.
22. Brudno J. N., Kochenderfer J. N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Reviews*. 2019;34:45–55. DOI: 10.1016/j.blre.2018.11.002.
23. Букатина Т. М., Шубникова Е. В. Критический анализ содержания планов управления рисками для лекарственных препаратов. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2022;10(1):6–12. DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-1-6-12.
24. Таубэ А. А., Левашова А. Ю. Приведение регистрационного досье на лекарственный препарат в соответствие с требованиями Евразийского Экономического Союза. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2020;2(28):40–47. DOI: 10.34907/JPQAI.2020.22.25.006.
25. Esslinger S., Quinn L., Sampat, S. Otero-Lobato M., Noël W., Geldhof A., Herijgers N., Reeder S.-J. Risk Management Plans: reassessment of safety concerns based on Good Pharmacovigilance Practices Module V (Revision 2)—a company experience. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*. 2022;8(1). DOI: 10.1186/s40780-022-00244-z.
26. Dekker L., Calkoen F. G., Jiang Y., Blok H., Veldkamp S. R., De Koning C., Spoon M., Admiraal R., Hoogerbrugge P., Vormoor B., Vormoor H. J., Visscher H., Bierings M., Van Der Vlugt M., Van Tinteren H., Nijstad A. L., Huitema A. D. R., Van Der Elst K. C. M., Pieters R., Lindemans C. A., Nierkens S. Fludarabine exposure predicts outcome after CD19 CAR T-cell therapy in children and young adults with acute leukemia. *Blood Advances*. 2022;6(7):1969–1976. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021006700.
27. Sermer D., Brentjens R. CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematological Oncology*. 2019;37(S1):95–100. DOI: 10.1002/hon.2591.

REFERENCES

1. Nair R., Westin J. CAR T-Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2020;1244:215–233. DOI: 10.1007/978-3-030-41008-7_10.
2. Ershov A. V., Demyanov G. V., Nasrullaeva D. A., Radkevich E. R., Dolgikh V. T., Sidorova N. V., Valiev T. T., Efimova M. M., Machneva E. B., Kirgizov K. I., Kiselevsky M. V., Manasova Z. S. The latest trends in improving CAR-T cell therapy: from leukemia to solid malignant tumors. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2021;8(2):84–95. (In Russ.) DOI: 10.21682/2311-1267-2021-8-2-84-95.
3. Zhao Z., Chen Y., Francisco N. M., Zhang Yu., Wu M. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(4):539–551. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.03.001.
4. Sakemura R., Can I., Siegler E. L., Kenderian S. S. In vivo CART cell imaging: Paving the way for success in CART cell therapy. *Molecular Therapy – Oncolytics*. 2021;20:625–633. DOI: 10.1016/j.omto.2021.03.003.
5. Yan Z., Zhang H., Cao J., Zhang C., Liu H., Huang H., Cheng H., Qiao J., Wang Y., Wang Y., Gao L., Shi M., Sang W., Zhu F., Li D., Sun H., Wu Q., Qi Y., Li H., Wang X., Li Z., Liu H., Zheng J., Qian W., Zhang X., Xu K. Characteristics and Risk Factors of Cytokine Release Syndrome in Chimeric Antigen Receptor T Cell Treatment. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:611366. DOI: 10.3389/fimmu.2021.611366.
6. Leedom T., Hamil A. S., Pouyanfard S., Govero J., Langland R., Ballard A., Schwarzkopf L., Martens A., Espenschied A., Vinay P., James M., Mahajan N., Spencer D. H., Chrobak K. M., Cooper M. L, Kabakibi A. Characterization of WU-CART-007, an Allogeneic CD7-Targeted CAR-T Cell Therapy for T-Cell Malignancies. *Blood*. 2021;138(1):2772. DOI: 10.1182/blood-2021-153150.
7. Vormittag P., Gunn R., Ghorashian S., Veraitch F. S. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018;53:164–181. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.01.025.
8. Turtle C. J., Hanafi L. A., Berger C., Gooley T. A., Cherian S., Hudecek M., Sommermeyer D., Melville K., Pender B., Budiarto T. M., Robinson E., Steevens N. N., Chaney C., Soma L., Chen X., Yeung C., Wood B., Li D., Cao J., Heimfeld S., Jensen M. C., Riddell S. R., Maloney D. G. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(6):2123–2138. DOI: 10.1172/JCI85309.
9. Yan L., Jue X., Hu Y., Huang H. Therapeutic Effect of Platelet Transfusion in Patients with Acute Lymphocytes Treated with CART Therapy. *Blood*. 2018;132(1):5073. DOI: 10.1182/blood-2018-99-120108.
10. Pan J., Yang J. F., Deng B. P., Zhao X. J., Zhang X., Lin Y. H., Wu Y. N., Deng Z. L., Zhang Y. L., Liu S. H., Wu T., Lu P. H., Lu D. P., Chang A. H., Tong C. R. High efficacy and safety of low-dose CD19-directed CAR-T cell therapy in 51 refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*. 2017;31(12):2587–2593. DOI: 10.1038/leu.2017.145.
11. Haydu J. E., Abramson J. S. CAR T-Cell therapies in lymphoma: current landscape, ongoing investigations, and future directions. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. 2021;7:36. DOI: 10.20517/2394-4722.2021.39.
12. Watanabe K., Hiroyoshi N. Engineering strategies for broad application of TCR-T-and CAR-T-cell therapies. *International Immunology*. 2021;33(11):551–562. DOI: 10.1093/intimm/dxab052.
13. Ustyugova E. A., Savkina M. V., Goryaev A. A., Bondarev V. P., Merkulov V. A., Melnikova E. V. The Current Use of Biomedical Cell Products for Cancer Treatment. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):206–214. (In Russ.) DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-4-206-214.
14. David M. B., Stephan A. G., Carl H. J. Chimeric antigen receptor- and TCR-modified T cells enter main street and wall street. *J Immunol*. 2015;195(3):755–761. DOI: 10.4049/jиммунол.1500751.
15. Schuster S. J., Bishop M. R., Tam C. S., Waller E. K., Borchmann P., McGuirk J. P., Jäger U., Jaglowski S., Andreadis C., Westin J. R., Fleury I., Bachanova V., Foley S. R., Ho P. J., Mielke S., Magenau J. M., Holte H., Pantano S., Pacaud L. B., Awasthi R., Chu J., Anak Ö., Salles G., Maziarz R. T. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(1):45–56. DOI: 10.1056/NEJMoa1804980.
16. Song Y., Ying Z., Yang H., Guo Y., Li W., Zou D., Zhou D., Wang Z., Zhang M., Wu J., Liu H., Zhang P., Yang S., Zhou Z., Zheng H., Zhu J. Relmacabtagene Autoleucel CD19 CART Therapy for Adults with Heavily-Pretreated Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma in China. *Blood*. 2021;138(1):3557. DOI: 10.1182/blood-2021-148358.

17. Sakemura R., Hefazi M., Siegler E. L., Cox M. J., Larson D. P., Hansen M. J., Roman C. M., Schick K. J., Can I., Tapper E. E., Horvei P., Adada M. M., Bezerra E. D., Fonkoua L. A. K., Ruff M. W., Nevala W. K., Walters D. K., Parikh S. A., Lin Y., Jelinek D. F., Kay N. E., Bergsagel P. L., Kenderian S. S. Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in the Bone Marrow Prevents Resistance to CART-Cell Therapy in Multiple Myeloma. *Blood*. 2022;139(26):3708–3721. DOI: 10.1182/blood.2021012811.
18. Meng J., Wu X., Sun Z., Xun R., Liu M., Hu R., Huang J. Efficacy and Safety of CAR-T Cell Products Axicabtagene Ciloleucel, Tisagenlecleucel, and Lisocabtagene Maraleucel for the Treatment of Hematologic Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:698607. DOI: 10.3389/fonc.2021.698607.
19. Neelapu S.S. Managing the toxicitiesof CAR T-cell therapy. *Hematological Oncology*. 2019;37(S1):48–52. DOI: 10.1002/hon.2595.
20. Hashmi H., Mirza A. S., Darwin A., Logothetis C., Garcia F., Kommalapati A., Mhaskar R. S., Bachmeier C., Chavez J. C., Shah B., Pinilla-Ibarz J., Khimani F., Lazaryan A., Liu H., Davila M. L., Locke F. L., Nishihori T., Jain M. D. Venous thromboembolism associated with CD19-directed CAR T-cell therapy in large B-cell lymphoma. *Blood Advances*. 2020;4(17):4086–4090. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002060.
21. Goto H., Makita S., Kato K., Tokushige K., Fujita T., Akashi K., Izutsu K., Teshima T. Efficacy and safety of tisagenlecleucel in Japanese adult patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *International Journal of Clinical Oncology*. 2020;25(9):1736–1743. DOI: 10.1007/s10147-020-01699-6.
22. Brudno J. N., Kochenderfer J. N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Reviews*. 2019;34:45–55. DOI: 10.1016/j.blre.2018.11.002.
23. Bukatina T. M., Shubnikova E. V. Critical Overview of the Contents of Risk Management Plans for Medicines. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2022;10(1):6-12. (In Russ.). DOI: 10.30895/2312-7821-2022-10-1-6-12.
24. Taube A. A., Levashova A. Yu. Bringing the registration dossier for a medicinal product in accordance with the requirements of the Eurasian Economic Union. *Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennyh sredstv*. 2020;2(28):40–47. (In Russ.) DOI: 10.34907/JPQAI.2020.22.25.006.
25. Esslinger S., Quinn L., Sampat, S. Otero-Lobato M., Noël W., Geldhof A., Herijgers N., Reeder S.-J. Risk Management Plans: reassessment of safety concerns based on Good Pharmacovigilance Practices Module V (Revision 2)—a company experience. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*. 2022;8(1). DOI: 10.1186/s40780-022-00244-z.
26. Dekker L., Calkoen F. G., Jiang Y., Blok H., Veldkamp S. R., De Koning C., Spoon M., Admiraal R., Hoogerbrugge P., Vormoor B., Vormoor H. J., Visscher H., Bierings M., Van Der Vlugt M., Van Tinteren H., Nijstad A. L., Huitema A. D. R., Van Der Elst K. C. M., Pieters R., Lindemans C. A., Nierkens S. Fludarabine exposure predicts outcome after CD19 CAR T-cell therapy in children and young adults with acute leukemia. *Blood Advances*. 2022;6(7):1969–1976. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021006700.
27. Sermer D., Brentjens R. CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematological Oncology*. 2019;37(S1):95–100. DOI: 10.1002/hon.2591.

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+

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-261-263

Check for updates

CC BY 4.0

Исправление к статье: «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

Разработка и регистрация лекарственных средств. 2023;12(2):62–72. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72. Статья опубликована: 25.05.2023.

На странице 62 в исходную версию статьи авторы добавили еще одного автора.
Вместо: А. М. Полуянов, А. Кочуг, Л. С. Митрофанова, И. Д. Никитин, О. Ю. Вергасов, И. Е. Шохин
Исправлено на: А. М. Полуянов, А. Кочуг, Л. С. Митрофанова, И. Д. Никитин, О. Ю. Вергасов, И. Е. Шохин, Е. Н. Фишер

На странице 62 было добавлено метсо работы автора Е. Н. Фишер и были внесены изменения мест работы авторов А. Кочуг, Л. С. Митрофановой.
Вместо: А. М. Полуянов[1, 2], А. Кочуг[1], Л. С. Митрофанова[1], И. Д. Никитин[2], О. Ю. Вергасов[2], И. Е. Шохин[1]
[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
Исправлено на: 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

На странице 62 было добавлено ORCID автора Е. Н. Фишер.
Вместо: 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.
Исправлено на: 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.

На странице 62 в раздел «Вклад авторов» была добавлена информация о вкладе автора в статью Е. Н. Фишер.
Вместо: 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. В обсуждении результатов участвовали все авторы.
Исправлено на: 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.

На странице 62 в раздел «Для цитирования» был добавлен еще один автор.
Вместо: Лигачёва Полуянов А. М., Кочуг А., Митрофанова Л. С., Никитин И. Д., Вергасов О. Ю., Шохин И. Е. 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
Исправлено на: 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

На странице 62 в раздел «Охраны авторского права» был добавлен автор
Вместо: © Полуянов А. М., Кочуг А., Митрофанова Л. С., Никитин И. Д., Вергасов О. Ю., Шохин И. Е., 2023
Исправлено на: © Полуянов А. М., Кочуг А., Митрофанова Л. С., Никитин И. Д., Вергасов О. Ю., Шохин И. Е., Фишер Е. Н., 2023

Внесение исправление не повлияло на содержание статьи.

Обновлена онлайн-версия статьи на сайте журнала.

Erratum: "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

Drug development & registration. 2023;12(2):62–72. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-62-72. Published: 25.05.2023.

On page 63 the author added another author to the original version of the article.
Instead: Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug, Lidia S. Mitrofanova, Ilya D. Nikitin, Oleg Yu. Vergasov, Igor E. Shohin
Corrected to: Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug, Lidia S. Mitrofanova, Ilya D. Nikitin, Oleg Yu. Vergasov, Igor E. Shohin, Elizaveta N. Fisher

On page 63 the author's work Elizaveta N. Fisher was added and the authors' places of work were changed: Adrian Kochug, Lidia S. Mitrofanova.
Instead: Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug, Lidia S. Mitrofanova, Ilya D. Nikitin, Oleg Yu. Vergasov, Igor E. Shohin
[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
Corrected to: Andrey M. Poluyanov, Adrian Kochug, Lidia S. Mitrofanova, Ilya D. Nikitin, Oleg Yu. Vergasov, Igor E. Shohin, Elizaveta N. Fisher

[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

On page 63, ORCID by Elizaveta N. Fisher was added.
Instead: 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.
Corrected to: 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.

On page 63, in the section "Contributions of the authors" was added Information about the author's contribution to the article by Elizaveta N. Fisher.
Instead: 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. All authors participated in discussion of the results.
Corrected to: 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.

On page 63, in the section "For citation" was added another author.
Instead: Poluyanov A. M., Kochug A., Mitrofanova L. S., Nikitin I. D., Vergasov O. Yu., Shohin I. E. 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
Corrected to: 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

On page 62, the author has been added to the "Copyright Protections" section.
Instead: © Poluyanov A. M., Kochug A., Mitrofanova L. S., Nikitin I. D., Vergasov O. Yu., Shohin I. E., 2023
Corrected to: © Poluyanov A. M., Kochug A., Mitrofanova L. S., Nikitin I. D., Vergasov O. Yu., Shohin I. E., Fisher E. N., 2023

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 X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: http://elibrary.ru

Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя и страну происхождения [пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: 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

РРЛС

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.

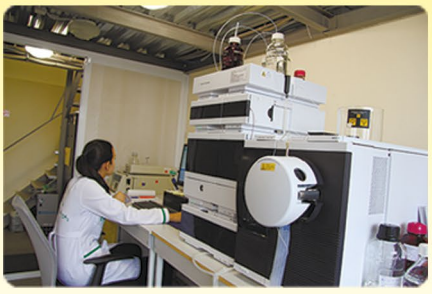
В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:

- *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

РРЛС

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.

Drug Development and Registration

Q3 Pharmaceutical Science

best quartile

SJR 2021

0.16

powered by scimagojr.com

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

РРЛС

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