

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ

ВАК Scopus®

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION



ЦФА | центр
фармацевтической
аналитики



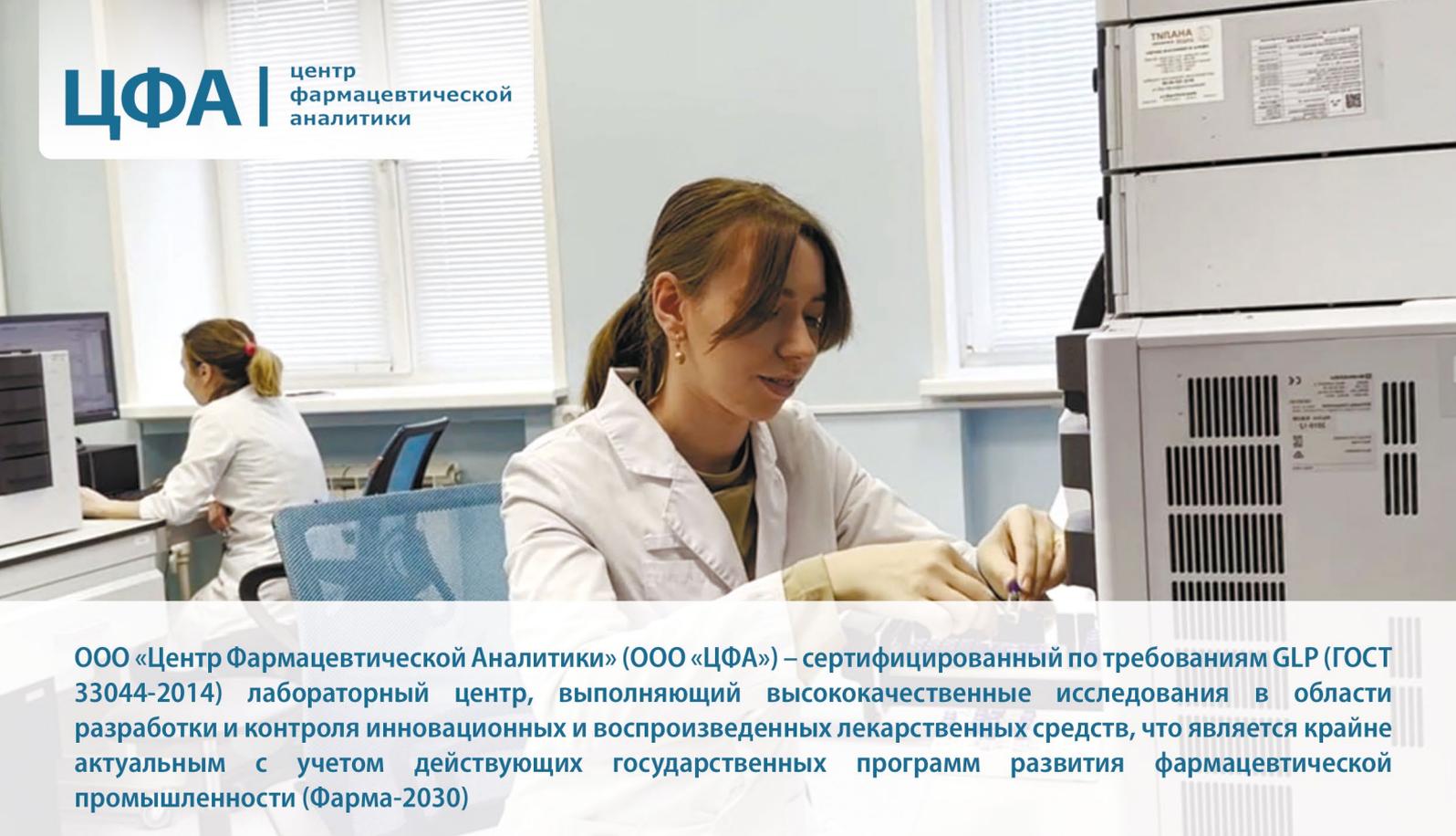
Конгресс

**«Разработка и регистрация
лекарственных средств»**

27-28 февраля 2024 г.

г. Москва, Конгресс-центр Сеченовского Университета





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

Проводятся методами ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-УФ, ИФА и др. с помощью валидированных методик анализа. Выполнение исследования и подготовка отчетности (отчет о валидации, аналитический отчет, архив хроматограмм) проводится в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов в Евразийском Экономическом Союзе, а также Руководствами ЕМА и FDA.

- ОПИСАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Расчет фармакокинетических параметров, параметров биоэквивалентности и дисперсионный анализ проводится при помощи программного обеспечения R project (лицензия GPL-2/GPL-3) с расширением bear. Программа полностью валидирована относительно современного коммерческого программного обеспечения (WinNonlin/SAS). Анализ непараметрической статистики проводится при помощи программы IBM SPSS.

Область сертификации:

- научно-исследовательская работа;
- проведение биоаналитических исследований;
- проведение фармакокинетических исследований;
- определение противолечекарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.



ООО «ЦФА»
117149, город Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

Тел.: +7 (499) 281-81-11

www.cpha.ru E-mail: info@cpha.ru

ООО «ЦФА» первым в России среди биоаналитических лабораторий был сертифицирован по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарта). Область сертификации: научно-исследовательская работа; проведение биоаналитических исследований; проведение фармакокинетических исследований; проведение ТСКР (тест сравнительной кинетики растворения); определение противолечекарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.

За весомый вклад за развитие российской экономики, добросовестную уплату налогов, достижение высоких экономических показателей, выразившихся в достижении лидирующего места в отраслевом рейтинге на основании отчетности Федеральной статистической службы Российской Федерации ОКВЭД 72.19 «Научные исследования и разработки в области естественных и технических наук прочие»



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2023. Том 12, № 4

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2023. Volume 12, No. 4

Цели и задачи журнала

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

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

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

Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества.

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

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

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Редакционная коллегия

Аммур Ю. И., к. биол. н., зав. лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

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

Белоусов М. В., профессор, д. фарм. н., заведующий кафедрой фармации ФПК и ППС ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

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 ФГАУ 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 ФГАУ 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) ФГАУ 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 ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

Медведев Ю. В., к. фарм. н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАУ 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 ФГАУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

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

Сливкин А. И., проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАУ 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 ФГАУ РУДН, Москва, Россия

Сукоян Г. В., д. б. н., Международный центр внедрения новых биомедицинских технологий, Тбилисский государственный университет имени Ивана Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

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

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

Тринеева О. В., д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАУ 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, Москва, Симферопольский, д. 8, пом. 1/1
	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, Москва, Симферопольский, д. 8, пом. 1/1
Издатель	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, Москва, Симферопольский, д. 8, пом. 1/1
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, Россия, Москва, Симферопольский, д. 8, пом. 1/1 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	<p>LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia</p> <p>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia</p> <p>Siberian State Medical University Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia</p>
Online version founders	<p>LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia</p>
Publisher	<p>LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia</p>
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	<p>LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru</p>
Printing house address	<p>LLC "MAX PRESS" 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia</p>
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	11
Поиск и разработка новых лекарственных средств	
Выбор и применение антиоксидантов-радиопротекторов в составе терапевтических радиофармпрепаратов (обзор) Е. П. Павленко, А. А. Ларенков, Ю. А. Митрофанов	27
Каллусная культура аралии сердцевидной (<i>Aralia cordata</i> Thunb.): получение, подбор условий культивирования, индукция соматического эмбриогенеза Д. А. Некрасова, М. Н. Пovyдыш, Н. С. Пивоварова, К. О. Сидоров	40
Применение термодинамических моделей для прогнозирования растворимости биологически активных веществ К. С. Степанов, Г. Н. Турманидзе, В. В. Сорокин, А. Д. Сахаров	46
Лекарственные перспективы ретиноидов (обзор) Л. В. Коваленко, А. Г. Поливанова, А. П. Ильин, И. Н. Соловьева, Е. И. Горбачева, М. С. Ощепков	54
Могут ли биолюминесцентные бактерии быть использованы для поиска новых антибактериальных веществ растительного происхождения? А. М. Кацев, С. Л. Сафронюк, Е. В. Бурцева, С. Я. Османова	63
Фармацевтическая технология	
Совершенствование технологий выделения и очистки биологически активных веществ из растительного сырья Г. Н. Турманидзе, В. В. Сорокин, К. С. Степанов, М. А. Игнатенко	71
Разработка оптимальной технологии сушки лекарственного растительного сырья из полыни осенней (<i>Artemisia serotina</i> Bunge) на основе сравнительного анализа А. Кадырбай, З. Б. Сакипова, Н. А. Криштанова, Л. Н. Ибрагимова, М. Б. Ибраева, А. Е. Сакипов, Э. Н. Бекболатова, Ч. Ридванов, О. В. Сермухамедова, Е. Адилбек, Т. Е. Сейдуали, А. Х. Анартаева, А. Ю. Казим	80
Изучение влияния матрицеобразующих полимеров на скорость высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток Ю. М. Коцур, Е. В. Флисюк, К. О. Сидоров, И. А. Титович, И. А. Наркевич	91
Роль геометрической конфигурации производного диэтиламиноэтанола в фармацевтической разработке готовой лекарственной формы на его основе Ю. М. Коцур, К. М. Церковная, Е. В. Флисюк, И. А. Титович, К. О. Сидоров, И. А. Наркевич	96
Разработка технологии получения фитосубстанции расторопши пятнистой плодов (<i>Silybum marianum</i> L.) в качестве компонента комплексной терапии заболеваний печени Б. А. Перес, А. П. Процюк, А. Б. Зеленцова, И. Е. Каухова, М. В. Ароян, Е. К. Новикова	101
Скрининг противомикробной и антиоксидантной активности шляпочных грибов, произрастающих в Ленинградской области А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, В. В. Новикова, В. О. Васильев, А. В. Клемпер, Р. И. Лукашов, Н. И. Мандрик, Н. С. Гурина, Г. П. Яковлев, В. Г. Лужанин	111
Разработка состава и технологии получения аморфной твердой дисперсной системы эбастина методом экструзии горячего расплава для увеличения скорости растворения К. А. Гусев, А. Р. Алиев, Ю. Э. Генералова, Н. А. Аксенова, Г. В. Речкалов, Д. Н. Маймистов, Г. М. Алексеева, Е. В. Флисюк	126
Об эффективности эмпаглифлозина в терапии экспериментального инфаркта миокарда Д. Ю. Ивкин, М. В. Краснова, С. В. Оковитый, А. А. Карпов, А. Н. Куликов, Е. И. Елецкая	136

Влияние параметров технологического процесса на микрокапсулирование субстанций с неудовлетворительными технологическими свойствами И. Д. Касымов, А. Л. Марченко, А. В. Басевич, М. Е. Валеева	146
Разработка мини-таблеток амлодипина как компонента полипилла для персонализированной терапии артериальной гипертензии К. М. Церковная, Е. В. Флисюк, Ю. М. Коцур, И. А. Наркевич, И. Е. Смехова, Д. Ю. Ивкин, Н. В. Филимонова	155
Критерии выбора технологии получения таблеток ребамипида, покрытых пленочной оболочкой Г. В. Трусов, Б. В. Бровченко, Ж. М. Козлова, И. И. Краснюк	165
Разработка технологии сухого экстракта на основе биомассы каллусных культур <i>Scutellaria baicalensis</i> А. А. Данилова, Н. С. Пивоварова, Е. В. Флисюк	173
Разработка лиофилизатов на основе полимер-лекарственного и интерполиэлектrolитного комплексов: фармакокинетическая оценка В. Р. Тимергалиева, А. Ю. Ситенков, А. В. Ситенкова (Буховец), Е. С. Елизарова, Д. С. Гордеева, И. И. Сёмина, Р. И. Мустафин	181
Разработка состава таблетированной лекарственной формы индуктора монооксигеназной системы гепатоцитов на основе 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина А. И. Петраков, В. В. Шейкин, С. В. Кривощёков, Е. А. Безверхняя, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов	189
Методы анализа лекарственных средств	
Изучение химического состава и биологического действия ароматных вод в сравнительном аспекте Е. В. Бурцева, А. М. Кацев, Е. В. Кулдыркаева, И. С. Мехоношина, Л. А. Тимашева, О. А. Пехова	197
Сквозная стандартизация оригинальных лекарственных средств при определении родственных примесей Ю. Э. Генералова, И. И. Тернинко, А. Б. Зеленцова	209
Рекомендации по валидации методик автоматического подсчета жизнеспособных клеток (обзор) М. А. Водякова, Н. С. Покровский, Е. В. Мельникова, В. А. Меркулов	217
Доклинические и клинические исследования	
Флавоноиды из недотроги железистой (<i>Impatiens glandulifera</i>) и их антиоксидантная активность А. К. Уэйли, Р. И. Лукашов, А. О. Уэйли, Е. В. Жохова, Н. С. Гурина, М. Ю. Гончаров, Г. П. Яковлев, В. А. Терлецкая	223
Нейропротекторная активность 5-этокси-2-этилтиобензимидазола (этомерзола) и 2-этилтиобензимидазола (бемитила) на модели окклюзии среднемозговой артерии Е. Ю. Заварина, Е. К. Красова, И. А. Титович, А. Н. Кимаев	231
Изучение эффектов агониста α_2-адренорецепторов мафедина на поведение белых беспородных мышей при однократном введении Н. С. Курмазов, С. А. Червонецкий, В. А. Приходько, Ю. И. Сысоев, С. В. Оковитый	239
Холеотропная активность экстракта ладанника шалфеелистного Е. Д. Семивеличенко, А. С. Ивкина, А. В. Караваева, А. Ю. Гришина, Е. И. Елецкая, М. В. Краснова, К. О. Сидоров, И. А. Титович, Д. Ю. Ивкин	247

CONTENTS

Introduction	10
Events	11
Research and development of new drug products	
Selection and Use of Antioxidants-radioprotectors in the Composition of Therapeutic Radiopharmaceuticals (Review) Ekaterina P. Pavlenko, Anton A. Larenkov, Iurii A. Mitrofanov	27
Callus Culture of <i>Aralia cordata</i> Thunb.: Obtaining, Selection of Cultivating Conditions, Somatic Embryogenesis Induction Daria A. Nekrasova, Maria N. Povydysh, Nadezhda S. Pivovarova, Kirill O. Sidorov	40
Application of Thermodynamic Models to Predict the Solubility of Biologically Active Substances Konstantin S. Stepanov, Georgii N. Turmanidze, Vladislav V. Sorokin, Artem D. Sakharov	46
Medicinal Perspectives of Retinoids (Review) Leonid V. Kovalenko, Anna G. Polivanova, Aleksey P. Ilyin, Inna N. Solovieva, Evgenia I. Gorbacheva, Maxim S. Oshchepkov	54
Could Bioluminescent Bacteria be Used in the Search for New Plant-derived Antibacterial Substances? Andrei M. Katsev, Sergey L. Safronyuk, Yelena V. Burtseva, Selina Y. Osmanova	63
Pharmaceutical Technology	
Improvement of Technologies for Isolation and Purification of Biologically Active Substances from Plant Raw Materials Georgii N. Turmanidze, Vladislav V. Sorokin, Konstantin S. Stepanov, Maxim A. Ignatenko	71
Development of Optimal Technology for Drying Herbal Medicinal Raw Materials from Autumn Wormwood (<i>Artemisia serotina</i> Bunge) Based on Comparative Analysis Arshyn Kadyrbay, Zuriyadda B. Sakipova, Nadezhda A. Krishtanova, Liliya N. Ibragimova, Mariyam B. Ibrayeva, Asanali E. Sakipov, Elmira N. Bekbolatova, Chakho Ridvanov, Olga V. Sermukhamedova, Yernur Adilbek, Temirlan Y. Seiduali, Akida K. Anartayeva, Aidyam U. Kazim	80
Study of the Effect of Matrix-forming Polymers on the Release Rate of Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate from Tablets Yulia M. Kotsur, Elena V. Flisyuk, Kirill O. Sidorov, Irina A. Titovich, Igor A. Narkevich	91
The Role of the Geometric Configuration of Diethylaminoethanol Derivative in the Pharmaceutical Development of a Dosage Form Based on It Yulia M. Kotsur, Kseniya M. Tserkovnaya, Elena V. Flisyuk, Irina A. Titovich, Kirill O. Sidorov, Igor A. Narkevich	96
Development of Technology of Phytosubstantiation of <i>Silybum marianum</i> L. Fruits as a Component of Complex Therapy of Liver Diseases Bajron A. Peres, Anastasiya P. Procyuk, Anna B. Zelencova, Irina E. Kauhova, Mariya V. Aroyan, Ekaterina K. Novikova	101
Antimicrobial and Antioxidant Activity Screening of Mushrooms Growing in the Leningrad Region Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Whaley, Valentina V. Novikova, Vitaly O. Vasiliev, Alexey V. Klemper, Raman I. Lukashov, Natalia I. Mandrik, Natalia S. Gurina, Gennadi P. Yakovlev, Vladimir G. Luzhanin	111
Composition and Technology Development for Obtaining Amorphous Solid Dispersion of Ebastine by Hot Melt Extrusion to Increase Dissolution Rate Konstantin A. Gusev, Andrey R. Aliev, Yuliya E. Generalova, Nadezhda A. Aksenova, Georgij V. Rechkalov, Denis N. Maimistov, Galina M. Alekseeva, Elena V. Flisyuk	126
Efficacy of Empagliflozin in the Treatment of Experimental Myocardial Infarction Dmitry Yu. Ivkin, Marina V. Krasnova, Sergey V. Okovity, Andrey A. Karpov, Alexander A. Kulikov, Elizaveta I. Yeletskaia	136

Influence of Technological Process Parameters on Microcapsulation of Substances with Unsatisfactory Technological Properties Ilya D. Kasymov, Alexei L. Marchenko, Anna V. Basevich, Mariya E. Valeeva	146
Development of Amlodipine Mini-tablets as a Polypill-component for the Personalized Therapy of Arterial Hypertension Ksenia M. Tserkovnaya, Elena V. Flisyuk, Julia M. Kotsur, Igor A. Narkevich, Irina E. Smekhova, Dmitry Yu. Ivkin, Natalya V. Filimonova	155
Technology Criteria for the Manufacturing of Rebamipide Film-coated Tablets German V. Trusov, Bogdan V. Brovchenko, Zhanna M. Kozlova, Ivan I. Krasnyuk	165
The Development of Dry Extract Technology from Callus Culture Biomass of <i>Scutellaria baicalensis</i> Alexandra A. Danilova, Nadezhda S. Pivovarova, Elena V. Flisyuk	173
Development of Lyophilisates Based on Polymer-drug and Interpolyelectrolyte Complexes: Pharmacokinetic Assessment Venera R. Timergalieva, Alexander Yu. Sitenkov, Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets), Elizabeth S. Elizarova, Daria S. Gordeeva, Irina I. Semina, Rouslan I. Moustafine	181
Development of the Tablet Dosage Form Composition for the Inductor of Hepatocytes Monooxygenase System Based on 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine Aleksandr I. Petrakov, Vladimir V. Sheikin, Sergei V. Krivoshchekov, Ekaterina A. Bezverkhniaia, Artem M. Guryev, Mikhail V. Belousov	189
Analytical Methods	
Study of the Chemical Composition and Biological Effects of Aromatic Waters in a Comparative Aspect Yelena V. Burtseva, Andrey M. Katsev, Ekaterina V. Kuldyrkaeva, Irina S. Mekhonoshina, Lidiya A. Timasheva, Olga A. Pekhova	197
End-to-end Standardization of Original Medicines when Determining Related Impurities Yulia E. Generalova, Inna I. Terninko, Anna B. Zelentsova	209
Recommendations for Validation of Automated Viable Cell Counting Methods (Review) Marina A. Vodyakova, Nikita S. Pokrovsky, Ekaterina V. Melnikova, Vadim A. Merkulov	217
Preclinical and clinical study	
Flavonoids from <i>Impatiens grandulifera</i> and Their Antioxidant Activity Andrei K. Whaley, Raman I. Lukashov, Anastasiia O. Whaley, Elena V. Zhokhova, Natalia S. Gurina, Mikhail U. Goncharov, Gennadi P. Yakovlev, Victoria A. Tsarletskaya	223
Neuroprotective Activity of 5-ethoxy-2-ethylthiobenzimidazole (Etomerzol) and 2-ethylthiobenzimidazole (Bemtil) in a Model of Middle Cerebral Artery Occlusion Ekaterina Yu. Zavarina, Elena K. Krasova, Irina A. Titovich, Aleksandr N. Kimaev	231
Evaluation of the α_2-adrenergic Agonist Mafedine Effects on White Outbred Mouse Behaviour Following Acute Administration Nikita S. Kurmazov, Sergey A. Chervonetskiy, Veronika A. Prikhodko, Yuriy I. Sysoev, Sergey V. Okovityi	239
Choleotropic Activity of <i>Cistus salviifolius</i> Extract Evgenii D. Semivelichenko, Arina S. Ivkina, Anna V. Karavaeva, Anna Yu. Grishina, Elizaveta I. Eletskaia, Marina V. Krasnova, Kirill O. Sidorov, Irina A. Titovich, Dmitry Yu. Ivkin	247

Редакционная статья / Editorial article

Лучшие из лучших!

«Центр Фармацевтической Аналитики» получил статус-награду «Лидер отрасли 2023» и соответствующий сертификат от Всероссийского бизнес-рейтинга.

The best of the best!

"Center for Pharmaceutical Analytics" received the status award "Industry Leader 2023" and the corresponding certificate from the All-Russian Business Rating.

ЦФА | центр
фармацевтической
аналитики

ЦФА был награжден за весомый вклад в развитие российской экономики, добросовестную уплату налогов, достижение высоких экономических показателей. Это позволило компании занять лидирующее место в отраслевом рейтинге на основании отчетности Федеральной статистической службы Российской Федерации ОКВЭД 72.19 «Научные исследования и разработки в области естественных и технических наук прочие».

Всероссийский бизнес-рейтинг – это общественная организация, которая на протяжении многих лет определяет лучшие компании на рынке путем независимого ранжирования по экономическим показателям.

Сертификат от Всероссийского бизнес-рейтинга – очередное подтверждение того, что ЦФА несет социальную ответственность и добропорядочность перед государством, клиентами, партнерами и потребителями.

Статус-награду «Лидер Отрасли» могут получить «только лучшие предприятия Российской Федерации», – отмечается на официальном сайте Всероссийского бизнес-рейтинга, где в открытом доступе размещены данные отбора.

Известный факт, что достойная компания не может существовать без достойного лидера. Генеральный директор «Центра Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич** стал «Руководителем года 2023» за профессиональное и эффективное управление предприятием, занявшим лидирующее место в отраслевом финансово-экономическом рейтинге по виду экономической деятельности «Научные исследования и разработки в области естественных и технических наук прочие».

Награда «Руководитель года 2023» отображает высокий профессионализм руководителя в управлении компанией, демонстрирует в совокупности все достоинства управленца, подчеркивает неизменный статус лидера.

Нельзя не отметить командную работу в достижении почетной награды. В команде ЦФА все решения принимаются быстро и оперативно. Каждый сотрудник – профессионал в своем деле. Сотрудники доверяют и поддерживают друг друга, что является основой эффективного управления предприятием.



Шохин Игорь Евгеньевич

За 2023 год компания «Центр Фармацевтической Аналитики» проделала большой путь, чтобы стать лидером. Мы гордимся нашей командой и высокой оценкой нашей работы.

«Лидер отрасли 2023» теперь становится маркировкой наших услуг. Это надежное подтверждение экономического успеха и авторитета компании «ЦФА» на российском рынке. Мы будем продолжать следовать намеченному пути. Доказав свою качественную работу, мы продолжим ее выполнять на столь же высоком уровне!



Информационная статья / Informational article

Конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» пройдет в Москве 27 и 28 февраля

Конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» пройдет в Москве в гибридном формате 27 и 28 февраля 2024 г. Программа конгресса состоит из нескольких секций, где мы поговорим про фармацевтическую разработку оригинальных и воспроизведенных ЛС, доклинические и клинические исследования, проводимые в соответствии с требованиями Решений ЕЭК. Также будут представлены секции, рассматривающие вопросы технологий получения лекарственных средств, трансфера технологий и регуляторные вопросы.

Congress "Drug development & registration" will be held in Moscow on February 27 and 28

The Congress "Drug development & registration" will be held in Moscow in a hybrid format on February 27 and 28, 2024. The congress program consists of several sections, where we will talk about the pharmaceutical development of original and generic drugs, non-clinical and clinical studies conducted in accordance with the EAEU rules. Also we will talk about technology transfer as well as drugs' manufacturing technologies and regulatory rules.



Конгресс проводится ежегодно, начиная с 2012 года, и за годы своего существования превратился в уважаемое и ожидаемое отраслевое мероприятие.

Организаторы конгресса – научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» и ООО «Центр Фармацевтической Аналитики».

Двухдневный конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» пройдет **27 и 28 февраля 2024** года в гибридном формате, предполагающем как очное, так и онлайн участие в зале. Место проведения – **конгресс-центр Сеченовского Университета** в Москве.

Программа конгресса состоит из нескольких секций, где мы поговорим про фармацевтическую разработку оригинальных и воспроизведенных ЛС, доклинические и клинические исследования, проводимые в соответствии с требованиями Решений ЕЭК. Также будут представлены секции, рассматривающие вопросы технологий получения лекарственных средств, трансфера технологий и регуляторные аспекты.

В рамках предстоящего конгресса планируется проведение круглых столов, посвященных вопросам надлежащей публикационной практики, цифровым решениям в сфере оснащения лабораторий, вопросам валидации аналитических методик на разных этапах

разработки и регистрации ЛС, а также фармакокинетическим исследованиям.

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.

Информацию о прошедшем мероприятии Вы можете прочесть на стр. 15.

Регистрация доступна на сайте конгресса <https://www.rrls-congress.ru/>



Информационная статья / Informational article

Семинар «Разработка и регистрация лекарственных средств в ЕАЭС и РФ – текущие достижения и стратегический взгляд в будущее»

Москва, 07 сентября 2023 г. состоялся семинар «Разработка и регистрация лекарственных средств в ЕАЭС и РФ – текущие достижения и стратегический взгляд в будущее».

Seminar "Drug development and registration in the EAEU and the Russian Federation – Current Achievements and a Strategic View to the Future"

Moscow, September 7, 2023, the seminar "Drug development and registration in the EAEU and the Russian Federation – current achievements and a strategic view to the future" was held.

Организаторами семинара выступили Консорциум «Биоорганика» Центра компетенций НТИ ГНЦ Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ЦК НТИ ИБХ РАН) и научный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации, Министерства промышленности Российской Федерации, Евразийской экономической комиссии и Торгового представительства Российской Федерации в Исламской Республике Иран.

Индустриальными партнерами семинара выступили научные организации ООО «Статэндокс» (<https://statandocs.com>), ООО «ИСМАР» (<https://esmarcro.com>) и ООО «ЦФА» (<https://cpha.ru>).

С иранской стороны в семинаре приняли участие 20 слушателей, которые представляли Министерство здравоохранения и медицинского образования Исламской Республики Иран, CPDI (Президентский центр прогресса и развития), Тегеранский медицинский университет, а также компании Ronak Pharmaceutical Co, Zima World Wide, Darou Darman Arang Co., Sina Darou Co., Avita Zist Pharmed Co., Rayan Pharmed Co., Parsian Co., Sina Robotics & Medical Innovators, Maad Pharma Co.

С приветственными словами выступили **Рустам Жиганшин**, торговый представитель Российской Федерации в Исламской Республике Иран; **Александр Исаев**, заместитель директора по науке Государственного научного центра ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук; **Владимир Попов**, доктор медицинских наук, профессор Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ».

В своем приветствии **Рустам Жиганшин** подчеркнул важность укрепления взаимовыгодных торговых и научных связей между научными, образовательными и коммерческими организациями России

и Ирана в области разработки, регистрации и торговли лекарственными средствами. **Александр Исаев** рассказал о Консорциуме «Биоорганика» Центра компетенций НТИ ИБХ РАН, ведущихся научных разработках инновационных лекарственных препаратов и существующих возможностях выхода иранских компаний на рынок РФ.

В регуляторном блоке семинара выступили **Алла Трапкова**, заместитель генерального директора ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, и **Дмитрий Рождественский**, начальник отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий Департамента технического регулирования и аккредитации Евразийской экономической комиссии. В своих сообщениях докладчики рассказали иранским коллегам и о нормативно-правовой базе, регламентирующей экспертизу и регистрацию лекарственных препаратов в Евразийском экономическом союзе и России. Были рассмотрены задачи, стоящие перед ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, и показана его роль в решении этих задач.



Дмитрий Рождественский

В дальнейшем иранским коллегам были представлены практические кейсы и рекомендации от российских экспертов. **Теймур Алиев**, заместитель по науке руководителя Центра компетенций НТИ ИБХ РАН, рассказал о практическом опыте по разработке инновационных биологических препаратов для диагностики и лечения социально значимых заболеваний. **Александр Солодовников**, кандидат медицинских наук, заместитель директора по проектной работе ООО «Статэндокс», рассказал об особенностях проведения исследований биологических лекарственных средств в ЕАЭС.

Владимир Попов, доктор медицинских наук, ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ», представил последние данные по динамике рынка клинических исследований в Российской Федерации, рассказал об исследовательских центрах и о существующих для иранских производителей возможностях в области проведения многоцентровых клинических исследований и исследований ранних фаз. Российская Федерация является одним из наиболее привлекательных регионов для проведения клинических исследований ввиду высокой численности населения, развитой инфраструктуры для клинических исследований, наличия современных медицинских технологий и возможностей изучения лекарственных препаратов, высокого качества работы исследователей и возможности привлечения большого количества пациентов с разными нозологиями.



Владимир Попов

Игорь Шохин, доктор фармацевтических наук, генеральный директор Центра фармацевтической аналитики, в своем докладе раскрыл роль теста «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств.



Игорь Шохин

Аркадий Мурашев, профессор, доктор наук, руководитель Центра биологических испытаний ГНЦ ИБХ РАН, рассказал о роли Центра доклинических исследований лекарственных средств в системе экспертизы и регистрации лекарственных средств по правилам Евразийского экономического союза.

В разделе семинара «Вопросы/Ответы» приняли участие все докладчики, а также заместитель директора по науке ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН доктор химических наук **Алексей Белогуров**. Иранские партнеры рассказали о своем опыте выхода на рынок Российской Федерации, сложностях и барьерах, которые встретились на их пути. В то же время было подчеркнуто, что семинар позволил иранской стороне получить из первых рук информацию о регуляторных требованиях и практическом опыте разработки и регистрации лекарственных средств в ЕАЭС и РФ.

В ходе семинара участники обменялись предложениями по решению проблем на пути сотрудничества в сфере разработки и регистрации инновационных российских и иранских препаратов.

«Объединение компетенций Консорциума «Биоорганика», российских промышленных партнеров дает возможность интегрировать опыт международного научного сообщества в решение задач, как поставленных перед Центром НТИ ИБХ РАН, так и относящихся к выходу на рынок Российской Федерации фармпрепаратов Исламской Республики Иран, страны с развитой фармацевтической и биотехнологической промышленностью, что может стать реальной альтернативой западноевропейским компаниям», –

заявил руководитель Центра компетенций НТИ ИБХ РАН **Александр Исаев**.

В своих выступлениях ученые, дипломаты, представители фармацевтической промышленности отметили важность проведения семинара в контексте развития торгового и академического сотрудничества между Россией и Ираном, которое будет способствовать не только прогрессу в области медицины, фармакологии и биотехнологии, но также укреплению дружественных отношений между двумя странами и реализации концепции многополярного мира.

По итогам семинара стороны достигли договоренностей о начале прямых контактов заинтересованных сторон по проектам, связанным с разработкой и регистрацией инновационных лекарственных препаратов. Запланировано расширение состава участников в рамках конференции на 2024 год.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОРГАНИЗАТОРАХ

Центр компетенций Национальной технологической инициативы (НТИ) (<https://www.cnti-ibch.ru>) на базе ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова – один из 24 центров компетенций НТИ, созданных в России в рамках нацпроекта «Наука». Каждый из них объединяет университеты, исследовательские

центры и инновационные предприятия для создания сквозных технологий, которые будут востребованы на новых глобальных рынках через 15–20 лет. Консорциум «Биоорганика» Центра компетенций НТИ ИБХ РАН – партнерство образовательных и научных организаций, а также высокотехнологичных предприятий и компаний. В настоящее время Консорциум «Биоорганика» объединяет 33 организации, в числе которых 14 вузов и научных организаций, 18 коммерческих организаций, 1 некоммерческая организация.

Научно-производственный рецензируемый журнал «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» (<https://www.pharmjournal.ru/>) – актуальное бесплатное 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. Включен 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, с 2015 года.

Информационная статья / Informational article

Конгресс «Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС» прошел в Москве

22 сентября состоялся конгресс «Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС» в здании конгресс-центра Сеченовского Университета в Москве. Организаторами конференции традиционно выступают ООО «Центр фармацевтической аналитики» и журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств». Мероприятие посетило 149 человек.

Congress "Chemical-Pharmaceutical and Biological Drugs: pharmaceutical and clinical development in accordance with the rules of the EAEU" took place in Moscow

On September 22, the congress "Chemical-pharmaceutical and biological preparations: pharmaceutical and clinical development according to the rules of the EAEU" was held in the building of the congress center of Sechenov University in Moscow. The conference is traditionally organized by the Center for Pharmaceutical Analytics LLC and the journal Drug development & registration. The event was attended by 149 visitors.



Спикеры конгресса – представители Минздрава РФ, ЕЭК, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Сеченовского Университета, Пермской государственной фармацевтической академии Минздрава РФ, компаний «Статэндокс» и «Герофарм», Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, Учебного центра ГХР и другие уважаемые участники.

Открывала мероприятие **Наталья Вячеславовна Кульджанова**, директор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Далее с приветственной речью выступил генеральный директор Центра фармацевтической аналитики, главный редактор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» **Игорь Евгеньевич Шохин**. Орга-

низаторы поприветствовали слушателей и пожелали продуктивной работы в рамках конгресса.

Программа мероприятия состояла из 5 секций. Первая секция была посвящена разработке лекарственных средств и регуляторным вопросам. Открывал секцию **Лужанин Владимир Геннадьевич**, *Пермская государственная фармацевтическая академия*. Доклад был посвящен поиску новых природных соединений для фармацевтической разработки. Следом выступил **Макаренко Игорь Евгеньевич** (*компания «Герофарм»*) с докладом о клинической разработке биосимиляров орфанных препаратов. Спикер подчеркнул, что на данный момент существуют трудности при клинической разработке биосимиляров орфанных препаратов в виде избыточных требований третьих фаз. В заключение было отмечено, что важно создать отдельные руководства для регистрации биосимиляров орфанных препаратов. **Еременко Наталья Николаевна**, *ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрав России*, рассказала про экспертную оценку отчета по биоэквивалентности при регистрации и приведении досье в соответствие с правилами ЕАЭС. Доклад **Екатерины Юрьевны Сорокиной** (*«Статэндокс»*) был посвящен в ЕАЭС при проведении клинических исследований. В докладе спикер разобрала организационные подходы и практический опыт реализации проведения биофармацевтических и международных многоцентровых исследований в ЕАЭС. Также обсуждались вопросы проведения клинической, биоаналитической и статистической части исследования, особенности формирования пакета документов для разных стран – членов Союза. **Александр Геннадьевич Солодовников** (*«Статэндокс»*) рассказал про обобщенный мировой опыт и познакомил с практически кейсами разработки и регистрации лекарственных форм для кожного применения с местным действием. Особое внимание было уделено инновационным методикам проведения сравнительных исследований для гибридных лекарственных препара-

тов, предполагающих исследования *in vitro* без использования биоматериалов человека.

Вторая секция конгресса была направлена на лабораторное оборудование и химические реактивы, переживающие сложные времена из-за событий в мире. В первую очередь дискомфорт испытывают наши исследователи вследствие срывов сроков поставок и недостатка информации о достойных аналогах из Азии. Проблема в наше время стоит остро. Разобраться в данном вопросе помогли эксперты из компании *«ХИММЕД»*. Компания является лидером в сфере оснащения лабораторий. Также мы узнали о новых IT-решениях для химической и фармацевтической отраслей.



Третью секцию, посвященную вопросам доклинических, клинических исследований, открывал доклад **Шарафетдинова Азата Хайдеровича** (*Департамент регулирования обращения лекарственных средств и медицинских изделий Минздрава РФ*). В докладе было отмечено, что важнейшим звеном оценки эффективности и безопасности новых лекарственных препаратов являются клинические исследования. Спикер поделился и некоторой статистикой. Так, количество ЛС, доведенных до стадии клинических исследований в 2022 году, составило 26. Спикер расска-



зал о современном состоянии регуляторной практики – от разработки до регистрации.

Енгальчева Галина Нинелевна (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) кратко обсудила следующие вопросы: какие необходимы доклинические исследования на разных этапах клинической разработки лекарственных препаратов, как оценивать факторы риска при интерпретации полученных результатов. Было предложено использовать метод WOE (Weight of evidence) для оценки токсического потенциала и необходимости проведения дополнительных исследований. **Галина Нинелевна** подчеркнула, что вывод о безопасности препарата возможен только на основании комплексной оценки факторов риска, результатов доклинических и клинических исследований.

Нельзя не отметить доклад **Комарова Тимофея Николаевича** (Центр фармацевтической аналитики). Спикер подробно рассказал про исследовательский центр ООО «ЦФА», а также поделился перспективами развития научного центра. Одним из направлений является новая обучающая программа на тему «Надлежащее обращение с биообразцами».

В секции «Вопросы химико-аналитических исследований» **Рождественский Дмитрий Анатольевич** (Департамент технического регулирования и аккредитации ЕЭК) выступил с докладом о новых подходах к применению процедуры «биовейвер». Докладчик отметил, что были изменены требования к пределам изменений в содержании вспомогательных веществ при проведении процедуры «биовейвер» для лекарственных препаратов в зависимости от степени подобия по составу референтному препарату. Допустимые границы изменений увеличены в два раза для веществ, не влияющих на абсорбцию препарата, а для веществ, влияющих на абсорбцию, введено дополнительное требование отличия не более чем 10% от абсолютного их содержания в референтном препарате.

Екимов Антон Анатольевич (ООО «Глювекс») выступил с докладом, посвященным целостности данных при разработке лекарственных препаратов. В докладе обсуждались основные вопросы целостности данных и решения от компании SOTAX (швейцарский производитель фармакопейных тестеров). Было отмечено, что программное обеспечение q-dos минимизирует рутинные процессы и разработано для эффективной работы в полном соответствии с разделом 21 части 11 свода федеральных правил.

Шохин Игорь Евгеньевич (Центр фармацевтической аналитики) выступил с докладом на тему «Исследование фармакокинетики и иммуногенности препаратов из группы ингибиторов ГПП-1». Ингибиторы ГПП-1 (глутиды) применяются для лечения диабета. Игорь Евгеньевич в своей презентации отме-



Шохин Игорь Евгеньевич

тил, что Novo Nordisk уведомила о прекращении поставок «Оземпика» (семаглутид) в Россию, что повлекло за собой появление острой потребности в импортозамещении в рамках обеспечения технологического суверенитета страны.

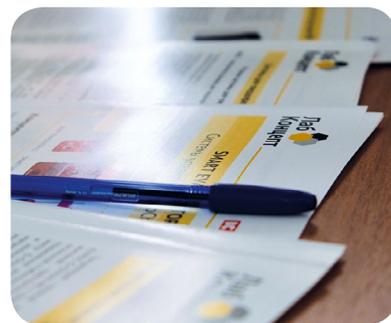
В заключительной секции конгресса, посвященной технологии лекарственных средств и надлежащим практикам, были представлены доклады спикеров из Сеченовского Университета, Учебного центра GxP, центра метрологии и консалтинга «Поверие».



Так, **Сысуев Борис Борисович** (Сеченовский Университет) рассказал о фармацевтической разработке с точки зрения ответственного подхода к созданию эффективных и безопасных лекарственных препаратов в РФ.

Тихонова Анна Эдуардовна, директор по развитию Учебного центра GxP, провела лекцию на тему «Валидация, верификация и трансфер аналитических методик: регуляторные аспекты». В своем выступлении Анна Эдуардовна подробно рассмотрела роль и значимость валидации, верификации и трансфера аналитических методик с точки зрения регуляторных требований. В ходе лекции **Анна Тихонова** также осветила важный аспект различия между валидацией, верификацией и трансфером аналитических методик. Она помогла аудитории разобраться в сути каждого из этих процессов и объяснила, как они взаимосвязаны и одновременно различаются по своему назначению и целям. Это позволило слушателям более глубоко понять и оценить регуляторные аспекты, связанные с аналитическими методиками в фармацевтической индустрии.

Партнерами конгресса «Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС» выступили: Сеченовский Университет, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, ЕЭК, СПХФУ, ПГФА, «Статэндокс», НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», «Поверие», «Герофарм», ТД «ХИММЕД», «Лабконцепт», «Глювекс», ЦВТ «Хим-Рар», X7 Research, Учебный центр GxP, NPJ, сообщество «Фарма РФ», PCR.NEWS, «Фарммедпром».



Благодарим слушателей и докладчиков конгресса за участие, проявленный интерес и хорошее настроение!

До встречи на наших следующих мероприятиях! Следите за новостями в нашем телеграм-канале.



Информационная статья / Informational article

VIII Всероссийская GMP-конференция с международным участием. «GMP: надлежащее качество в современных условиях»

Главными темами деловой программы стали подходы к регулированию обращения лекарственных средств, отраслевое образование, межведомственное взаимодействие, научно обоснованный подход при производстве лекарственных средств, лицензирование производства, особенности обеспечения соответствия требованиям правил GMP, фармацевтический инжиниринг, типичные несоответствия при фарминспекциях.

VIII All-Russia GMP Conference with International Participation. "GMP: Proper Quality in Modern Conditions"

The main topics of the business program were approaches to regulating of drug circulation, industry education, interdepartmental interaction, a scientifically based approach to the drug manufacturing, licensing, ensuring compliance with the requirements of GMP rules, pharmaceutical engineering, and typical nonconformities during pharmaceutical inspections.



На протяжении 3 дней на мероприятии обсуждались самые актуальные вопросы обеспечения качества при производстве лекарственных средств.

Главными темами деловой программы стали подходы к регулированию обращения лекарственных средств, отраслевое образование, межведомственное взаимодействие, научно обоснованный подход при производстве лекарственных средств, лицензирование производства, особенности обеспечения соответствия требованиям правил GMP, фармацевтический инжиниринг, типичные несоответствия при фарминспекциях.

В конференции приняло участие 800 человек, из которых очно площадку посетило порядка 600 гостей. На форум в Екатеринбурге съехались представители отрасли от Калининграда до Владивостока. За дискуссиями наблюдали зрители из Казахстана, Белоруссии, Перу, Черногории, Алжира, Египта, Соединенных Штатов Америки, Германии, Чехии и других стран.

Шестаков Владислав Николаевич, директор ФБУ «ГИЛС и НП» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, отметил, что тема

конференции «GMP: надлежащее качество в современных условиях» отражает актуальную для участников фармотрасли повестку.

Всероссийская GMP-конференция проводится с 2016 года и ежегодно собирает ведущих международных и российских экспертов фармацевтической отрасли, представителей органов государственной



Шестаков Владислав Николаевич

власти, руководителей и специалистов фармацевтических производств, представителей профессиональных объединений и сообществ, экспертов в области систем менеджмента качества и надлежащих производственных практик (GMP).

В первый день конференции состоялось 4 панельных сессии. Открывала конференцию сессия «Лучшие подходы к регулированию обращения лекарственных средств в условиях многополярного мира». На сессии обсуждались следующие вопросы:

- Снижение зависимости от импорта и наращивание собственного экспортного потенциала.
- Вопросы взаимного признания. Международный опыт.
- Взаимодействие регуляторных органов в современных условиях. Площадки для международного сотрудничества и другие.

Второй день конференции открывала панельная сессия «Научно обоснованный подход в вопросах производства лекарственных средств». В рамках сессии обсуждались следующие темы:

- Цели, задачи и промежуточные результаты работы экспертного совета Евразийской академии надлежащих практик.
- Подходы к микробиологическому мониторингу производственной среды при осуществлении производства лекарственных средств. Требования и практика применения.
- Научные данные токсикологической оценки для подтверждения возможности совмещения производства лекарственных средств.

- Токсикологическая оценка лекарственных средств для целей надлежащей производственной практики.
- Проект приложения № 1 «Требования к производству стерильных лекарственных средств».
- Уполномоченные лица.
- Требования к производству высокотехнологичных лекарственных средств.

Открывала секцию **Соттаева Мадина Магомедовна**, начальник управления инспектирования производителей лекарственных средств ФБУ «ГИЛС и НП» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации. **Мадина Магомедовна** представила рабочие группы экспертного совета Евразийской академии надлежащих практик и рассказала о целях и задачах.

Архипова Надежда Валентиновна, заместитель начальника управления инспектирования производителей лекарственных средств ФБУ «ГИЛС и НП» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, представила рабочую группу, задачей которой является адаптация перевода на русский язык Приложения 1 «Требования к производству стерильных лекарственных средств». Данное приложение описывает стерильность лекарственных средств. Спикер напомнила, что в 2023 году в ЕАЭС вышла новая версия Приложения.

Причины внесения изменений в Приложение 1:

- ✓ Глобализация требований к производству стерильных ЛС.
- ✓ Доступность ЛС для пациентов.



ПАНЕЛЬНАЯ СЕССИЯ

НАУЧНО ОБОСНОВАННЫЙ ПОДХОД В ВОПРОСАХ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



- ✓ Рост доли стерильных лекарственных средств в общем количестве производимых ЛС.
- ✓ Появление новых технологий.
- ✓ Многие другие.

Также было отмечено, что новая версия Приложения 1 стала более обширной и появились новые разделы.

Следом выступила **Бурлакина Наталья Владимировна**, заместитель начальника отдела экспертизы ФБУ «ГИЛС и НП» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации. Спикер представила рабочую группу, которая занимается частью IV GMP «Требования к производству высокотехнологичных лекарственных препаратов». Данная часть была разработана ЕМА еще в 2017 году и выведена из Приложения 2 в отдельную полноценную часть IV GMP. Участники данной рабочей группы: сотрудники фармацевтических компаний, сотрудники представительств иностранных компаний в РФ, представители подведомственных уполномоченным органам государств – членов ЕАЭС учреждений, представители международных организаций в РФ.

Рабочей группой были выделены основные моменты:

- ✓ Применение рискориентированного подхода.
- ✓ В части IV приведены ссылки на нормативные документы Европейского союза, аналогов которым нет на территории ЕАЭС.

Маклакова Ольга Валентиновна, директор по корпоративному качеству евразийской экономической зоны компании «Акрихин», в своем выступлении представила рабочую группу «Уполномоченные лица, евразийская экономическая зона». Цели данной рабочей группы:

- ✓ Повышение роли уполномоченного лица.
- ✓ Профессиональное развитие уполномоченных лиц.
- ✓ Усиление коммуникации в сфере работы уполномоченных лиц между странами – участниками ЕАЭС.

Одна из задач рабочей группы заключается в создании единой цифровой платформы для общения уполномоченных лиц на территории стран – участников ЕАЭС. Также группа занимается работой с Приложением 16. Докладчик подробно осветила деятельность группы в 2023 году и поделилась планами на 2024 год.

Продолжил секцию доклад **Чернявской Аси Анатольевны**, руководителя испытательного центра контроля качества лекарственных средств ООО ИЦ «МЛ-СТАНДАРТ». Спикер представила рабочую группу научно-методического подхода к вопросам контроля качества по профилю «микробиология». Цель данной группы заключается в разработке отраслевых рекомендательных документов и обеспечении единого

похода к надлежащей практике микробиологического контроля в актуальных вопросах, требующих выработки решений.

Спикер отметила, что в едином правовом поле Евразийского экономического союза отсутствует единый документ, регулирующий единообразный подход к микробиологическому мониторингу. Что и привело к необходимости разработки научно-методических рекомендаций по микробиологическому мониторингу производственной среды для производителей стерильных и нестерильных лекарственных средств.

Вязьмина Татьяна Михайловна, директор по качеству ГК «Р-Фарм», поделилась итогами работы группы «Научные данные токсикологической оценки для подтверждения возможности совмещения продуктов на одной производственной линии». Цель данной группы заключается в разработке методических рекомендаций в области проведения и применения токсикологической оценки для производства лекарственных средств в соотношении с требованиями надлежащей производственной практики. В основе разработки научно-методических рекомендаций для отрасли лежит международный опыт и документы. Также спикер отметила, что для методических рекомендаций уже подготовлен проект документов. Были подведены итоги рабочей группы:

- Проанализирована текущая ситуация в отрасли.
- Определены направления для улучшения:
 - а) гармонизация законодательных актов;
 - б) разъяснение законодательных актов;
 - в) восполнение пробелов между законодательными актами;
 - г) восполнение отсутствующих баз качества и надежных исходных данных;
 - д) подготовка специалистов.

Ориентировочно в конце 2024 года методические указания и приложения будут представлены для обсуждения в ЕАЭС.



Гузеватых Людмила Сергеевна, руководитель группы токсикологии GMP-процессов ГК «Р-Фарм», освещала тему токсикологической оценки в производственной практике.

При регистрации лекарственного препарата проводится оценка безопасности и токсичности для определения мероприятий по снижению рисков для здоровья пациентов. Эти мероприятия указываются в инструкции по медицинскому применению. При производстве же лекарственного препарата проводится токсикологическая оценка для измерения риска для здоровья пациентов при непреднамеренном ежедневном пожизненном действии лекарственного средства, которая заключается в определении безопасных доз для всей популяции при применении лекарственного препарата не по показаниям в инструкции по медицинскому применению. Токсикологическая оценка для целей GMP – это общая оценка рисков для здоровья человека или животного при непреднамеренном действии лекарственного средства.

Спикер **Е Сяо**, GMP-инспектор, Центр инспектирования пищевых продуктов и лекарственных средств CFDI (Китай), поделилась опытом предотвращения перекрестной контаминации при производстве нескольких лекарственных средств на одном участке, а также проведения мероприятий по управлению рисками для качества.

Участникам GMP-конференции представилась возможность посетить мастер-класс «Использование VR-технологий в преподавании промышленной технологии лекарственных средств» с выдачей сертификатов. Участники мастер-класса смогли ознакомиться с возможностями симуляционного учебного комплекса «Виртуальный завод для вузов», разработанного Евразийской академией надлежащих практик совместно с Государственным институтом лекарственных средств и надлежащих практик. Инновационный VR-продукт предназначен для прохождения производственной практики по промышленной фармации студентами фармацевтического, биотех-





нологического и химического направлений. Комплекс содержит уникальное лицензионное программное обеспечение и учебно-методические материалы для преподавателей, в том числе не имеющих опыта работы на фармпредприятии.

В завершение второго дня конференции прошла пленарная сессия «Фармацевтический инжиниринг. Начальные этапы приемки и квалификации как часть жизненного цикла валидации систем и оборудования. Взгляд с позиции требований Приложения № 15 GMP и отраслевой опыт». Вопросы и темы для обсуждения:

- Практическое применение принципов Руководства ISPE Baseline Guide Vol 5: Commissioning & Qualification 2nd Edition.
- Взаимосвязь различных этапов квалификации в V-образной модели «жизненного цикла» валидации.
- URS как точка отсчета для валидационных мероприятий.
- Значимость этапа DQ для новых и реконструируемых систем; применение анализа рисков на этапе DQ с учетом положений обновленной версии руководства ICH Q9 (R1).

Ежегодно GMP-конференция проводится в разных городах, что позволяет представителям отрасли познакомиться как с фармацевтической промышленностью регионов, так и с богатой культурой России. Информация о месте проведения и темах мероприятия следующего года будет размещена на сайте <https://gosgmp.ru/>.

Организаторы конференции – Министерство промышленности и торговли Российской Федерации совместно с ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик», оператор – ЦКК «С-ГРУП».

Партнерами выступают крупнейшие российские и международные компании, ведущие отраслевые издания и профессиональные сообщества.

ПАНЕЛЬНАЯ СЕССИЯ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНЖИНИРИНГ. НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ПРИЕМКИ КВАЛИФИКАЦИИ КАК ЧАСТЬ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ВАЛИДАЦИИ СИСТЕМЫ ОБОРУДОВАНИЯ. ВЗГЛЯД С ПОЗИЦИИ ТРЕБОВАНИЙ ПРИЛОЖЕНИЯ №15 GMP И ОТРАСЛЕВОЙ ОПЫТ



Информационная статья / Informational article

Форум «БИОТЕХМЕД-2023»

Представители профильных министерств и эксперты отрасли обсудили готовность российской промышленности к обеспечению потребностей системы здравоохранения.

Forum "BIOTECHMED-2023"

Representatives of relevant ministries and industry experts discussed the readiness of Russian industry to meet the needs of the healthcare system.



В Сочи завершился форум «БИОТЕХМЕД-2023». Мероприятие посетило около 1000 участников из 6 регионов России, на сессиях выступило более 100 спикеров. Представители профильных министерств и эксперты отрасли обсудили готовность российской промышленности к обеспечению потребностей системы здравоохранения. В мероприятии приняли участие заместитель председателя Правительства Российской Федерации – министр промышленности и торговли Российской Федерации **Денис Мантуров**, министр здравоохранения Российской Федерации **Михаил Мурашко**, губернатор Краснодарского края **Вениамин Кондратьев**, а также ключевые представители фармацевтической и медицинской промышленности. Главным мероприятием первого дня стала пленарная сессия «Обеспечение системы здравоохранения: от задач к реализации», на которой выступили заместитель председателя Правительства Российской Федерации – министр промышленности и торговли Российской Федерации **Денис Мантуров** и министр здравоохранения

Российской Федерации **Михаил Мурашко**. «С 2014–2015 года мы начали фокусироваться на разработке собственных инновационных препаратов, кроме того, в рамках нового этапа Стратегии мы работаем не только по инновационным разработкам, но и по субстанциям и малотоннажной химии. Сегодня мы ставим перед собой задачу и цель обеспечить себя собственными компонентами, собственными субстанциями из своего сырья, – отметил вице-премьер – глава Минпромторга России. – Все то, что представлено на выставке «БИОТЕХМЕД», отвечает задаче технологической независимости в области фармацевтики, медицинских изделий и медицинской техники».

В рамках дискуссионной сессии «Инновационные лекарственные препараты: скорость и доступность» были раскрыты следующие темы:

- Каким образом формируется цена на инновационные лекарственные препараты, зарегистрированные на условиях?

- Стоит ли более быстрый выход на рынок значительного снижения цены?
- Нужно ли что-то менять в действующем законодательстве и как обеспечить баланс между доступностью инноваций и их стоимостью?

Модератор сессии **Торгов Алексей Владимирович** (заместитель генерального директора по корпоративным связям и коммуникациям АО «БИОКАД») открыл сессию интересным фактом: аспирин был разработан фармацевтической компанией Bayer в 1897 году и стал первым в истории фармацевтики синтетическим лекарственным препаратом, не встречающимся в природе. Через 125 лет, 24 августа 2022 года, EMA одобрило препарат для генной терапии гемофилии А «Роктавиан». Его цена составила 1 млн долларов за один клинический случай. Уже через год FDA одобрило «Роктавиан» уже по цене 2,9 млн долларов за один клинический случай. Между этими событиями и разницей в 2 раза лежит одно крайне важное отличие – в Европе препарат был зарегистрирован на условиях, а в США – по полным клиническим данным.

Вторым модератором выступил **Тарасов Вадим Владимирович** (руководитель направления инновационной фармацевтики, директор Института трансляционной медицины и биотехнологии Сеченовского Университета). **Вадим Владимирович** также привел интересную статистику: «С 2007 по 2021 год FDA зарегистрировало препараты по 146 показаниям, а EMA – по 58 показаниям. При этом важно отметить, что большинство из этих препаратов находились на II фазе КИ. Согласно статистике, только один из этих препаратов был отозван по причине недостаточной эффективности и ни у одного препарата не было проблем с безопасностью. Мы можем с уверенностью сказать, что этот механизм позволил большому количеству пациентов получить доступ к прорывной терапии, что, несомненно, является большой заслугой как регуляторов, так и фармацевтических компаний».

В рамках сессии у слушателей была возможность также принять участие в дискуссии путем интерактивного голосования.

Глаголев Сергей Владимирович (заместитель министра здравоохранения РФ) помог разобраться с определением условной регистрации, привел некоторую статистику регистраций на условиях, а также выразил позицию Минздрава относительно потребности в условной регистрации в нашей стране. Спикер прокомментировал приведенную модераторами статистику количества условных регистраций в США и Европе. По мнению спикера, это глобальный тренд и он практически везде связан с изменением стратегии поиска лекарственных препаратов – смещением в сторону нишевых орфанных и конгруэнтных определенному кругу терапевтических мишеней, т. е. онкологии, иммунологии и так далее. «Сегодня около 30 % всех расходов здравоохранения касаются высокотехнологичных препаратов, и значительная часть из них была впервые зарегистрирована



Глаголев Сергей Владимирович

на основе ограниченных данных. Это данность, это тренд», – отметил спикер.

Приезжева Екатерина Геннадьевна (заместитель министра промышленности и торговли РФ) рассказала, как стратегия «Фарма-2030» будет поддерживать оригинальные разработки и инновационные лекарственные препараты. Разработка инновационных препаратов – один из приоритетов стратегии «Фарма-2030». У таких препаратов большие риски. Главный из них – нереализация проекта. По статистике, на разборку одного проекта уходит 10–15 лет. А стоимость новой молекулы может исчисляться миллиардами долларов. В русле стратегии «Фарма-2020» с 2016 года по настоящее время на рынок вышло 12 препаратов в рамках реализации механизмов господдержки. На разработку этих 12 препаратов было затрачено 2,5 млрд рублей, при этом объем продаж составил свыше 43 млрд рублей. Это показывает, что препараты востребованы. Именно поэтому одна из задач стратегии «Фарма-2030» – поддержка разработок ЛС, и прежде всего речь идет именно об инновационных препаратах. Для поддержки будут использоваться уже существующие и внедрены новые механизмы. Один из механизмов – поддержка на ранних стадиях разработки. Этот механизм будет адаптирован и дополнен функционалом.



Приезжева Екатерина Геннадьевна

Старых Дарья Александровна (ФАС России) рассказала про участие ФАС России в деятельности фонда «Круг добра». Ведомство участвует в переговорах с производителями о поставках лекарственных препаратов и медицинских изделий, не зарегистрированных в России. По результатам переговоров удалось достичь снижения цены поставок почти в 2 раза.

Итоги проведения переговоров в 2021–2022 годах:

- всего проведено переговоров в отношении более чем 50 наименований лекарственных препаратов и медицинских изделий;
- в отношении 30 лекарственных препаратов и 9 медицинских изделий удалось договориться о существенном снижении цен поставок для нужд фонда.

Омельяновский Виталий Владимирович (генеральный директор ФГБУ «Центр экспертизы и контроля качества медицинской помощи» Минздрава России) затронул тему трендов с условной регистрацией препаратов с учетом международного опыта, обсудил, каким образом устанавливаются цены на препараты, которые находятся в условной регистрации. Спикер отметил, что основным критерием инновационности ЛС следует считать именно пользу для пациента и системы здравоохранения, а не технологичность инноваций.

Власов Ян Владимирович (сопредседатель Всероссийского союза общественных объединений пациентов) рассказал об отношении пациентов к инновационным препаратам, готовности пациентов ждать инновационную терапию на несколько лет дольше, а также об отношении пациентов в целом к отечественным препаратам. Спикер отметил, что готовы пробовать новую терапию те пациенты, у кого заболевание тяжело прогрессирует. В случае, когда у пациента есть выбор, ему важно, насколько препарат клинически эффективен. Спикер поделился и некоторой статистикой: доверие пациентского сообщества к отечественному производителю выросло до 56 %, а по некоторым сегментам составило до 75 %.

Филатова Ирина Анатольевна (депутат Государственной думы Федерального собрания Российской Федерации) раскрыла тему инноваций с точки зрения законодательства. Говоря про инновации, спикер отметила наличие проблем на разных этапах: от поиска мишеней до вывода инновационных препаратов на рынок. Также была приведена статистика: в 2023 году приобретение иностранных препаратов выросло на 5 % в упаковках, в рублях рост составил 12 %, если сравнивать с аналогичным периодом 2021 года. Расходы на онкопрепараты: 31 % приобретаемых препаратов в упаковках – это иностранные лекарства, а в рублях это 75 %. Спикер отметила, что, как только запустится процесс выпуска отечественных инновационных препаратов, мы сможем гово-



рить о технологическом суверенитете нашей страны. На сегодняшний день основная задача социальных программ государства – увеличение продолжительности и улучшение качества жизни.

Также спикер поделилась информацией, что в Государственной думе разрабатывается законопроект о создании специализированных фондов с видом деятельности НИОКР по фармацевтическому направлению, которые будут заниматься разработкой ЛС. Предусмотрены различные налоговые и прочие преференции со стороны государства. На сегодняшний день механизм находится на начальной стадии реализации.

Кудлай Дмитрий Анатольевич (вице-президент по внедрению новых медицинских технологий АО «Генериум») поделился своим видением оптимального пути внедрения инноваций и обеспечения доступа пациентов к ним.

Следом выступил **Драй Роман Васильевич** (директор R&D-центра ООО «Герофарм»). Спикер поделился взглядом на инновации с точки зрения разработчика. Он отметил, что определение «инновационный препарат» очень усложнено в нашей стране. Это усложнение нашло отражение и в регуляторном определении. В России термин «неудовлетворенная медицинская потребность» – это отсутствие доступной терапии. В настоящее время для большинства заболеваний терапия есть, и мы боремся уже за качество жизни пациентов, увеличение эффективности, повышение безопасности. В зарубежном определении инновационной терапии есть небольшая сноска: «или разрабатываемая терапия будет иметь существенные преимущества по отношению к тому, что уже есть». Спикер отметил, что в данный момент необходимо уточнить термин, что позволит реализовать план к 2030 году и разработать иное количество инновационных препаратов.

Форум «БИОТЕХМЕД» прошел при поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, Министерства здравоохранения Российской Федерации, администрации Краснодарского края.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1525>
УДК 615.014.425; 544.541; 615.849



Обзорная статья / Review article

Выбор и применение антиоксидантов-радиопротекторов в составе терапевтических радиофармпрепаратов (обзор)

Е. П. Павленко, А. А. Ларенков✉, Ю. А. Митрофанов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна». 123098, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46

✉ Контактное лицо: Ларенков Антон А. E-mail: anton.larenkov@gmail.com

ORCID: Е. П. Павленко – <https://orcid.org/0000-0002-6638-4292>; А. А. Ларенков – <https://orcid.org/0000-0003-4810-4346>;
Ю. А. Митрофанов – <https://orcid.org/0000-0001-5249-8507>.

Статья поступила: 25.07.2023

Статья принята в печать: 21.09.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Применение радиофармацевтических препаратов для таргетной радионуклидной терапии (РНТ), эффективность которых была установлена в ходе клинических исследований, является безопасным и эффективным методом терапии различных патологических состояний, в том числе онкологических заболеваний. Основной особенностью терапевтических радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП) является использование β^- и α -излучающих радионуклидов (РН) в готовой лекарственной форме (ГЛФ). Среди радионуклидов, используемых для радионуклидной терапии, лютеций-177 на сегодняшний день является одним из наиболее популярных в клинической практике, что обусловлено его химическими и ядерно-физическими характеристиками. Список разрабатываемых РФЛП на основе лютеция-177 постоянно расширяется, а препараты Lutathera® (^{177}Lu -DOTA-TATE) и Pluvicto™ (^{177}Lu -PSMA-617) уже одобрены для применения в клинической практике ряда стран.

Текст. Ввиду высокой активности РН в одной дозе терапевтического РФЛП (до 8 Гбк в монодозе для ^{177}Lu) ионизирующее излучение используемых РН приводит к снижению качества РФЛП из-за радиолитической дегградации векторной молекулы. Это приводит к снижению специфического накопления радиоактивности в очагах патологии, снижению терапевтического эффекта и потенциально увеличивает риск радиотоксичности для нецелевых органов и тканей. Степень и интенсивность радиолитической дегградации векторной молекулы, а следовательно и срок хранения ГЛФ РФЛП, зависят от многих факторов, среди которых объемная активность радионуклида в препарате, его период полураспада и энергия испускаемых частиц являются наиболее весомыми. Для подавления эффектов радиолитической дегградации в составы готовых лекарственных форм вводят различные вспомогательные вещества, проявляющие антиоксидантные (радиопротекторные) свойства. Среди используемых и исследуемых веществ наиболее популярными являются гентизиновая и аскорбиновая кислоты, а также этанол. В данной работе на примерах препаратов лютеция-177 рассмотрены преимущества и недостатки различных антиоксидантов и их комбинаций, используемых в составе терапевтических РФЛП.

Заключение. Подбор оптимального состава лекарственной формы является актуальной задачей, так как позволит обеспечить высокое качество РФЛП как на момент приготовления, так и в течение срока хранения и поставки конечному потребителю, что существенно облегчит применение и централизованную поставку терапевтических РФЛП. Показана необходимость создания унифицированного подхода к подбору антиоксидантов на стадии фармацевтической разработки радиофармпрепаратов. Для достижения этой цели весьма перспективным и доказавшим свою эффективность представляется подход, объединяющий исследования кинетики радикальных реакций с исследованиями радиационно-химических выходов продуктов радиолитической дегградации в одинаковых или максимально близких условиях с последующей проверкой стабильности ГЛФ РФЛП. Напротив, эмпирический подход, подразумевающий подбор радиопротекторов на основе прямого исследования их влияния на сохранение уровня радиохимической чистоты, является неоптимальным ввиду высокой рыночной стоимости как радионуклидов, так и нерадиоактивных прекурсоров.

Ключевые слова: радиофармпрепараты, радиопротекторы, антиоксиданты, лютеций-177, ПСМА-617, радиолит

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

Вклад авторов. Е. П. Павленко – проведение информационного и литературного поиска по объектам исследования, анализ и обработка данных и написание текста статьи. А. А. Ларенков – концептуализация исследования, внесение значимых изменений в содержание работы, окончательное утверждение рукописи. Ю. А. Митрофанов – внесение значимых изменений в содержание работы.

Финансирование. Данное исследование выполнено в рамках государственного задания и при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России (тема No. 122031100121-4, научный руководитель: А. А. Ларенков).

Для цитирования: Павленко Е. П., Ларенков А. А., Митрофанов Ю. А. Выбор и применение антиоксидантов-радиопротекторов в составе терапевтических радиофармпрепаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):27–39. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1525>

Selection and Use of Antioxidants-radioprotectors in the Composition of Therapeutic Radiopharmaceuticals (Review)

Ekaterina P. Pavlenko, Anton A. Larenkov✉, Iurii A. Mitrofanov

State Research Center – A. I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency. 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123098, Russia

✉ Corresponding author: Anton A. Larenkov. E-mail: anton.larenkov@gmail.com

© Павленко Е. П., Ларенков А. А., Митрофанов Ю. А., 2023

© Pavlenko E. P., Larenkov A. A., Mitrofanov Iu. A., 2023

ORCID: Ekaterina P. Pavlenko – <https://orcid.org/0000-0002-6638-4292>; Anton A. Larenkov – <https://orcid.org/0000-0003-4810-4346>;
Iurii A. Mitrofanov – <https://orcid.org/0000-0001-5249-8507>.

Received: 25.07.2023 Revised: 21.09.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. The use of radiopharmaceuticals for targeted radionuclide therapy (TRT), the efficacy of which was established during clinical trials, is safe and effective for various pathological conditions, including cancer. The main feature of therapeutic radiopharmaceuticals (RPs) is the use of β^- - and α -emitting radionuclides (RNs) in the finished dosage form (FD). Among the radionuclides used for radionuclide therapy, lutetium-177 is currently one of the most popular in clinical practice because of its chemical and nuclear characteristics. The list of RPs based on lutetium-177 is constantly expanding, and Lutathera® (^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE) and Pluvicto™ (^{177}Lu]Lu-PSMA-617) have been approved for clinical use in several countries.

Text. Because of the high activity of RNs in a single dose of therapeutic RPs (up to 8 GBq in a monodose for ^{177}Lu), ionizing radiation of the used RNs leads to a decrease in RPs quality owing to radiolytic degradation of the vector molecule. This leads to a decreased specific accumulation of radioactivity in the foci of pathology, reduced therapeutic effect, and potentially increases the risk of radiotoxicity to non-target organs and tissues. The degree and intensity of radiolytic degradation of the vector molecule and, consequently, the shelf life of RPs depend on many factors, among which the activity concentration of the radionuclide in the preparation, its half-life, and the energy of the emitted particles are the most important. To suppress the effects of radiolysis, various excipients with antioxidant (radioprotective) properties were introduced into the compositions of the finished dosage forms. Among the substances studied, the most popular were gentisic acid, ascorbic acid, and ethanol. In this work, the advantages and disadvantages of various antioxidants and their combinations used in therapeutic RPs were considered in lutetium-177 preparations.

Conclusion. Selection of the optimal composition of the dosage form is an urgent task, as it will ensure high-quality RPs both at the time of preparation and during the shelf life and delivery to the end user, which will greatly facilitate the use and centralized supply of therapeutic RPs. The necessity of creating a unified approach for the selection of antioxidants at the pharmaceutical development stage of radiopharmaceuticals is shown. For this purpose, an approach combining studies of radical reaction kinetics with studies of radiation-chemical yields of radiolysis products under identical or maximally similar conditions with subsequent verification of the stability of RPs dosage form seems to be very promising and has proven to be effective. In contrast, the empirical approach, which implies the selection of radioprotectors based on a direct study of their influence on the preservation of the level of radiochemical purity, is suboptimal because of the high market value of both radionuclides and non-radioactive precursors.

Keywords: radiopharmaceuticals, radioprotectors, antioxidants, lutetium-177, PSMA-617, radiolysis

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

Contribution of the authors. Ekaterina P. Pavlenko – information and literature research, analysis and processing of data, writing the text of the article. Anton A. Larenkov – conceptualization of the study, making significant corrections to the content of the work, final approval of the manuscript. Iurii A. Mitrofanov – making significant corrections to the content of the work.

Funding. This research was carried out within the framework of a state assignment and with financial support from the Federal Medical Biological Agency of Russia (topic No. 122031100121-4, scientific supervisor: Anton A. Larenkov).

For citation: Pavlenko E. P., Larenkov A. A., Mitrofanov Iu. A. Selection and use of antioxidants-radioprotectors in the composition of therapeutic radiopharmaceuticals. *Drug development & registration*. 2023;12(4):27–39. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1525>

ВВЕДЕНИЕ

Радионуклидная терапия (РНТ) – это метод лечения различных патологических состояний, в том числе онкологических заболеваний, с применением радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП). РНТ обладает преимуществом по сравнению с существующими терапевтическими подходами (химиотерапия, лучевая терапия) [1], так как терапевтический эффект при применении РФЛП достигается за счет избирательного облучения опухолевых тканей корпускулярным ионизирующим излучением радионуклида, входящего в его состав. Это обусловлено сродством молекулярного вектора, в структуру которого инкорпорирован радионуклид, к специфичным эндогенным мишеням (главным образом клеточным рецепторам) [2]. В качестве молекулярных векторов в структуре РФЛП выступают различные лиганды к рецепторам, такие как моноклональные антитела и

их фрагменты, а также пептиды, пептидомиметики, витамины и др. [3–6].

Для таргетного воздействия на очаг патологии в составе терапевтических РФЛП используют радионуклиды с различными ядерно-физическими свойствами, в первую очередь β^- -излучатели. Этот тип излучения наиболее часто используется в радионуклидной терапии ввиду относительно высокой проникающей способности β^- -частиц (порядка 1–5 мм). Кроме того, достаточно широкая номенклатура β^- -излучающих радионуклидов надлежащего качества сегодня широко доступна и многие из них также излучают γ -кванты в диапазоне энергий, подходящих для контроля распределения препарата методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) [1]. Поэтому такие β^- -излучатели, как самарий-153, лютеций-177, иттрий-90 и иод-131, се-

годня успешно используют в мировой клинической практике.

Популярность ^{177}Lu при РНТ основывается на ряде его преимуществ по сравнению с другими радионуклидами. Так, например, при терапии ^{177}Lu повреждение нецелевых клеток будет значительно меньшим по сравнению с ^{90}Y , глубина проникновения β^- -частиц которого в биологическую ткань составляет 2,8–4,1 мм (таблица 1). Применение препаратов ^{177}Lu эффективно при воздействии на небольшие опухоли, а также метастатические поражения (обычно менее 3 мм в диаметре) [7]. Помимо этого, испускаемые лютецием-177 γ -кванты [$E_\gamma = 113$ (6,4 %) и 208 кэВ (11 %)] позволяют проводить эффективный мониторинг фармакокинетики радиофармпрепаратов на его основе с использованием клинических ОФЭКТ-камер [8–11], а длительный период полураспада радионуклида обеспечивает логистические преимущества для транспортировки РФЛП в лечебные учреждения. Особенно стоит подчеркнуть возможность наработки больших количеств ^{177}Lu без носителя по схеме $^{176}\text{Yb}(n, \gamma) \xrightarrow{\beta^- 1,9\text{ч}} ^{177}\text{Lu}$, которая позволяет изготавливать РФЛП с высокой молярной активностью [12].

Таблица 1. Физические свойства некоторых терапевтических радионуклидов

Table 1. Physical properties of some therapeutic radionuclides

Радионуклид Radionuclide	$T_{1/2}$, сутки [11] $T_{1/2}$, days [11]	Тип распада [1, 5, 13] Decay type [1, 5, 13]	Средний диапазон проникновения β^- -частиц в ткани (мм) [13–15] β^- -particle range in tissue (mm) [13–15]
^{177}Lu	6,7	$\beta^-; \gamma$	0,28–0,67
^{131}I	8,04		0,4–0,9
^{153}Sm	1,95		0,53–1,2
^{188}Re	0,708		2,43–3,8
^{90}Y	2,67	β^-	2,8–4,1

Все это привело к тому, что за последние несколько лет ^{177}Lu привлек значительное внимание исследовательских групп, занимающихся разработкой радиофармпрепаратов. Список РФЛП на основе ^{177}Lu постоянно расширяется. Некоторые из них уже прошли регистрацию и были одобрены для клинического применения или находятся на последних этапах клинических исследований. Антагонисты рецепторов соматостатина, меченные лютецием-177, эффективно применяют для РНТ нейроэндокринных опухолей (НЭО). Одним из препаратов лютеция-177 на основе антагонистов рецепторов соматостатина является [^{177}Lu -DOTA⁰,Tyr³]октреотат ([^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE или ^{177}Lu -оксодотреотид), используемый для лечения гастроэнтеропанкреатических НЭО [16]. Данные клинических исследований показали, что ста-

билизация заболевания была обнаружена у 28–46 % пациентов [16–18]. В ходе клинических исследований III фазы¹ [^{177}Lu]Lu-DOTA⁰,Tyr³]октреотат продемонстрировал свою эффективность в лечении гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных опухолей. В 2017 году препарат был зарегистрирован под коммерческим именем Lutathera® (AAA, компания Novartis®) и одобрен для лечения онкологических заболеваний Европейским агентством лекарственных средств (EMA)². В январе 2018 года препарат получил одобрение Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA), а в 2019 году – Canada Health [19].

Для терапии рака предстательной железы успешно применяют меченные ^{177}Lu низкомолекулярные ингибиторы простат-специфического мембранного антигена (PSMA). PSMA – трансмембранный белок, сверхэкспрессируемый на раковых клетках при первичном и метастатическом раке предстательной железы. На данный момент компания Advanced Accelerator Applications (дочерняя компания Novartis) разрабатывает препарат ^{177}Lu випивотида тетраксетан (PLUVICTO™, ранее известный как [^{177}Lu]Lu-PSMA-617) [20]. Разработка [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 для лечения пациентов с метастатическим раком простаты была начата в 2015 году немецким центром исследования рака «Deutsches Krebsforschungszentrum» (DKFZ) в сотрудничестве с университетской клиникой Гейдельберга [21]. По данным исследования, у пациента, получавшего 7,4 Гбк препарата, уровень PSA снизился с 38,0 до 4,6 нг/мл. В последующих клинических исследованиях 2015–2016 годов также сообщается о безопасности и эффективности препарата при снижении PSA у пациентов в среднем на 30–70 % [22–28]. Сравнительные исследования [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 и стандартных методов химиотерапии показали, что РНТ [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 характеризуется меньшей частотой проявления нежелательных побочных явлений и большей эффективностью по отношению к ингибированию экспрессии PSMA [28, 29]. Поэтому в мае 2018 года компания Novartis® начала третью фазу клинических исследований для изучения эффективности и токсичности терапии [^{177}Lu]Lu-PSMA-617³ [30, 31]. Первое одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, США) PLUVICTO™ получил 23 марта 2022 года для лечения

¹ Study Record | ClinicalTrials.gov. A Study Comparing Treatment With 177Lu-DOTA0-Tyr3-Octreotate to Octreotide LAR in Patients With Inoperable, Progressive, Somatostatin Receptor Positive Midgut Carcinoid Tumours (NETTER-1). Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01578239>. Accessed: 15.08.2023.

² Lutathera | European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lutathera>. Accessed: 15.08.2023.

³ Study Record | ClinicalTrials.gov. Study of 177Lu-PSMA-617 In Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer in Japan. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05114746>. Accessed: 15.08.2023.

взрослых пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (мКРРПЖ), которые уже получали терапию таксаном¹.

Исследования препарата лютеция-177 на основе молекулы PSMA-I&T, которая также является лигандом к PSMA, показали, что [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T в большей степени накапливался в нецелевых органах [32]. Поглощенная почками доза для [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T примерно в 1,5 раза больше, чем [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, однако разница поглощенной дозы в клинических исследованиях значительно меньше, чем в доклинических [33]. В недавних исследованиях говорится о низкой степени нефротоксичности и гематотоксичности препарата [34], даже для пациентов, у которых уже отмечались нарушения функции почек, анемия и снижение количества лейкоцитов [35]. Эффективность терапии [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T, сравнимая с эффективностью [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 [36–40], послужила толчком к полноценной разработке готовой лекарственной формы (ГЛФ). В декабре 2020 года компания Point Biopharma начала третью стадию клинических испытаний препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T под названием [¹⁷⁷Lu]Lu-PNT2002 [23, 41]².

Для лечения мКРРПЖ методом радиоиммунотерапии разработан препарат на основе деиммунизированного моноклонального антитела [¹⁷⁷Lu]Lu-TLX591 ([¹⁷⁷Lu]Lu-J591), с высокой специфичностью связывающегося с PSMA [42]. Исследования фазы I и фазы II показали, что при терапии [¹⁷⁷Lu]Lu-TLX591 снижение уровня PSA у пациентов составило более 45 % в среднем за два месяца [4, 43]. Опубликованы результаты последующих исследований, где была изучена токсичность препарата, а также возможность комбинирования радионуклидной терапии и химиотерапии [44, 45]. В марте 2021 года компания Telix® начала первую фазу клинических исследований для оценки безопасности и переносимости, определения фармакокинетики и биораспределения препарата, а также дозиметрии³. Сообщается, что компания в мае 2021 года уже получила одобрение HREC (Human Research Ethics Committees) и разрешение CTN (Clinical Trial Notification) от TGA (Therapeutic Goods Administration) на начало исследования фазы III препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-TLX591⁴ (таблица 2).

¹ FDA approves Pluvicto for metastatic castration-resistant prostate cancer | FDA. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pluvicto-metastatic-castration-resistant-prostate-cancer>. Accessed: 15.08.2023.

² Study Record | ClinicalTrials.gov. Study Evaluating mCRPC Treatment Using PSMA [Lu-177]-PNT2002 Therapy After Second-line Hormonal Treatment (SPLASH). Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04647526>. Accessed: 15.08.2023.

³ Study Record | ClinicalTrials.gov. 177Lu-DOTA-TLX591 Safety, Biodistribution and Dosimetry Study (ProstACTSelect). Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04786847>. Accessed: 15.08.2023.

⁴ Telix Commences Phase III Clinical Trial of Prostate Cancer Therapy – Telix Pharmaceuticals. Available at: <https://telixpharma.com/news-views/telix-commences-phase-iii-clinical-trial-of-prostate-cancer-therapy/>. Accessed: 15.08.2023.

Радиационно-химические аспекты химии терапевтических РФЛП

Поскольку в случае терапевтических радиофармацевтических препаратов активность радионуклида в одной дозе достигает от 3,7 до 7,4 Гбк [46], влияние процессов радиолитического разложения компонентов препарата под действием ионизирующего излучения становится важным (в определенной мере критическим) фактором. Под действием ионизирующего излучения в водных растворах образуется ряд активных частиц: •OH, •H, e_{aq}⁻, H₂O₂ – свободных радикалов [47, 48]. Свободные радикалы проявляют высокую реакционную способность по отношению к различным молекулам, в частности к молекуле-вектору в РФЛП [49]. Поскольку накопление в целевом очаге в значительной степени зависит от связывания меченой молекулы с рецептором, радиолитическая трансформация и деструкция векторной молекулы может привести к снижению или полной потере ею аффинности и, как следствие, терапевтической эффективности, а также изменению фармакокинетики с повышением риска радиотоксичности для нецелевых органов и тканей. Чтобы уменьшить радиолиз и стабилизировать препарат во время синтеза, а также в составе готовой лекарственной формы, необходимо использовать эффективный и фармацевтически приемлемый акцептор свободных радикалов – антиоксидант, он же радиопротектор.

Радиопротекторы в составе РФЛП

Этанол. Для подавления радиолиза в радиофармпрепаратах широко используют этанол [50], который зарекомендовал себя как эффективный радиопротектор [51, 52]. В исследовании [53] изучено влияние этанола на снижение радиолиза диагностического препарата [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE: без добавления радиопротекторов РХЧ образца с активностью 650 МБк/мл составила 76 % после синтеза, а при содержании этанола 10 об.% РХЧ готового препарата составила 99 %. В ряде работ представлены результаты, доказывающие влияние этанола на стабильность РХЧ широко применяемого в ПЭТ-диагностике препарата ¹⁸F-FDG [54–57]. Так, например, в работе [54] наглядно показано, что РХЧ препарата с самой высокой исследованной объемной активностью 14 Гбк/мл в отсутствие этанола в течение 10 часов снижается до 86 % и более, а в присутствии 0,3 об.% этанола – всего до 94 %.

Зачастую этанол используют совместно с другими радиопротекторами для повышения стабильности РФЛП. Например, при содержании 10 об.% этанола в смеси гентизиновой и одновременно аскорбиновой кислот (по 3,5 мМ) в составе препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 с активностью 571 МБк/мл спустя 24 часа после приготовления РХЧ составляла более 95 %, тогда как без добавления этанола – 75 % [58]. Аналогичные результаты представлены

Таблица 2. Перечень зарегистрированных препаратов лютеция-177 и препаратов, находящихся на последних стадиях клинических исследований

Table 2. List of registered drugs of lutetium-177 and drugs in the last stages of clinical trials

Название РФЛП Name of RPs	Варианты названия РФЛП Name variations RPs	Назначение Prescribing	Стадия разработки Development stage
Lutathera® [19]	[¹⁷⁷ Lu][Lu-DOTA ⁰ ,Tyr ³]октреотат [¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA-TATE ¹⁷⁷ Lu-оксодотреотид [¹⁷⁷ Lu][Lu-DOTA ⁰ ,Tyr ³]octreotate [¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA-TATE ¹⁷⁷ Lu-oxodotreotide	ГЭП-НЭО GEP-NETs	Зарегистрирован (AAA, Novartis®) Registered (AAA, Novartis®)
Pluvicto™ ¹	[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	мКРРПЖ mCRPC	Зарегистрирован (AAA, Novartis®) Registered (AAA, Novartis®)
[¹⁷⁷ Lu]Lu-PNT2002 ²	[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-I&T		III фаза клинических исследований Phase III clinical trials
[¹⁷⁷ Lu]Lu-TLX591 ³	¹⁷⁷ Lu-DOTA-TLX591, ¹⁷⁷ Lu-J591	мКРРПЖ mCRPC	III фаза клинических исследований Phase III clinical trials

Примечание. ¹ Novartis Pluvicto™ approved by FDA as first targeted radioligand therapy for treatment of progressive, PSMA positive metastatic castration-resistant prostate cancer | Novartis. Available at: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-pluvictotm-approved-fda-first-targeted-radioligand-therapy-treatment-progressive-psma-positive-metastatic-castration-resistant-prostate-cancer>. Accessed: 15.08.2023.

² Study Record | ClinicalTrials.gov. Study Evaluating mCRPC Treatment Using PSMA [Lu-177]-PNT2002 Therapy After Second-line Hormonal Treatment (SPLASH). Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04647526>. Accessed: 15.08.2023.

³ Telix Commences Phase III Clinical Trial of Prostate Cancer Therapy – Telix Pharmaceuticals. Available at: <https://telixpharma.com/news-views/telix-commences-phase-iii-clinical-trial-of-prostate-cancer-therapy/>. Accessed: 15.08.2023.

Note. ¹ Novartis Pluvicto™ approved by FDA as first targeted radioligand therapy for treatment of progressive, PSMA positive metastatic castration-resistant prostate cancer | Novartis. Available at: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-pluvictotm-approved-fda-first-targeted-radioligand-therapy-treatment-progressive-psma-positive-metastatic-castration-resistant-prostate-cancer>. Accessed: 15.08.2023.

² Study Record | ClinicalTrials.gov. Study Evaluating mCRPC Treatment Using PSMA [Lu-177]-PNT2002 Therapy After Second-line Hormonal Treatment (SPLASH). Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04647526>. Accessed: 15.08.2023.

³ Telix Commences Phase III Clinical Trial of Prostate Cancer Therapy – Telix Pharmaceuticals. Available at: <https://telixpharma.com/news-views/telix-commences-phase-iii-clinical-trial-of-prostate-cancer-therapy/>. Accessed: 15.08.2023.

в патенте¹. Исследование стабильности препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-октреотата (600 МБк/мл, 1 мМ гентибиновой и аскорбиновой кислот) показало, что через 7 дней после приготовления РХЧ препарата при отсутствии этанола составила 75 %, а при добавлении 10 об.% этанола сохранялась на уровне >94 %.

Важно отметить, что этанол относится к органическим растворителям 3 класса токсичности (низкой токсичности). В РФ содержание остаточного этанола в инъекционных растворах регламентируется в соответствии с ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» Государственной фармакопеи XIV издания. При содержании этанола в ГЛФ выше 0,5 об.% он подлежит нормированию и должен быть определен количественно. В исследовании [54] результаты газовой хроматографии выявили содержание остаточного этанола на уровне 0,0032 об.% даже тогда, когда этанол не добавляли в качестве радиопротектора: в случае терапевтических РФЛП этанол (0,1 об.%) присутствует в составе после твердофазной очистки реакционной смеси. При добавлении 0,1 об.%

этанола его остаточный уровень достигал 0,23 об.%, что не превышает установленных норм в 0,5 об.% в соответствии с требованиями Американской фармакопеи (USP), на которую ссылаются авторы исследования. При увеличении концентрации этанола в ГЛФ необходимо подвергать препарат испытаниям в соответствии с ОФС.1.1.0008.15 Государственной фармакопеи РФ XIV издания.

Гентибиновая кислота. Одним из наиболее часто используемых радиопротекторов в составе терапевтических радиофармпрепаратов является 2,5-дигидроксибензойная (гентибиновая) кислота [23, 59–61]. Гентибиновая кислота имеет две группы —ОН, которые находятся в пара-положении друг к другу, за счет чего она активно проявляет антиоксидантные свойства в большей степени, чем моногидроксибензойные кислоты [62]. Радиопротекторные свойства гентибиновой кислоты наглядно показаны на примере результатов исследования *in vitro* по γ-облучению эритроцитов и клеток печени: при облучении клеток в среде, содержащей 100 мкМ гентибиновой кислоты, наблюдается значительное подавление гемолиза и повреждение мембран митохондрий [63]. В исследовании так же подробно изучены механизмы реакций гентибиновой кислоты со свободными радикалами и показана способность к деактивации физиологически значимых гидроксильных и перок-

¹ Erion J.L. Use of ethanol for stabilizing a single-vial liquid formulation of a radiolabeled peptide. Patent WIPO № WO2008009444 A1. 24.01.2008. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/f7/c7/20/8d3d3ec8475e19/WO2008009444A1.pdf>. Accessed: 15.08.2023.

сидных радикалов, а также преобладание вторичных радикалов гентизиновой кислоты, имеющих восстановительную природу.

Эффективность гентизиновой кислоты для предотвращения радиолиза была продемонстрирована для различных радиофармацевтических препаратов лютеция-177, таких как [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T и [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-TATE [40,64–66]. В работе [67] наиболее показательными являются данные, полученные при ВЭЖХ-анализе спустя 7 суток после приготовления препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 с добавлением гентизиновой кислоты. Препарат был получен после очистки на колонке C₁₈: в конечном растворе содержится не более 5 об.% этанола (используемого для десорбции радиоконьюгата) и 100–200 мг/мл гентизиновой кислоты (элюат с C₁₈-картриджа разбавляли физиологическим раствором, содержащим гентизиновую кислоту). Активность во всех образцах составляла 0,74 Гбк/мл. При отсутствии радиопротектора радиохимическая чистота снизилась приблизительно до 75%. При наличии 100–200 мг/мл гентизиновой кислоты наблюдалось незначительное накопление продуктов радиолиза: при высокой объемной активности (1,85 Гбк/мл) радиохимическая чистота препарата сохранялась на уровне ≥96 % спустя 7 суток после приготовления. Однако следует отметить, что данные о стабильности препарата при отсутствии радиопротектора не совпадают с данными других исследований. В работе [58] сообщается, что несоответствие результатов может быть связано с различными условиями ВЭЖХ-анализа, используемым оборудованием и интерпретацией полученных хроматограмм. В исследовании [68] в аналогичных условиях при отсутствии гентизиновой кислоты скорость падения РХЧ препаратов [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTAGA-OncoFAP составила 10 %/сут, а РХЧ препарата, содержащего 20 мг гентизиновой кислоты, снижалась всего на 2 % через 8 суток. Кроме того, есть данные, показывающие, что гентизиновая кислота может повышать стабильность радиофармпрепаратов даже с α-излучающими радионуклидами. Так, в работе [69] было показано, что добавление 0,1 М гентизиновой кислоты увеличивает стабильность препарата [²²⁵Ac]Ac-маспора-PSMA. В то же время присутствие такого же количества аскорбиновой кислоты не стабилизировало конъюгаты с ²²⁵Ac и приводило к снижению устойчивости комплекса и перелигандированию радионуклида.

Несмотря на преимущества данного радиопротектора, в работе [70] сообщается об избирательном окислении метионинового остатка препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-H2MG11, вызванного гентизиновой кислотой. Уменьшение данного эффекта вместе с подавлением радиолиза наблюдалось при использовании смеси гентизиновой кислоты (110 мМ) и метионина (78 мМ). Также было обнаружено, что образцы препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 с добавлением ген-

тизиновой кислоты в первые сутки после синтеза начали приобретать коричневую окраску [71], что, скорее всего, было связано с образованием продуктов окисления гентизиновой кислоты в результате взаимодействия со свободными радикалами в процессе радиолиза [63, 72].

Аскорбиновая кислота. Еще одним вспомогательным веществом, применяемым в составе РФЛП, является аскорбиновая кислота [73–76], которая одновременно может выполнять функцию как стабилизатора, так и буферного агента [77]. В организме человека аскорбиновая кислота является регулятором свободнорадикального гомеостаза [78]. Предотвращение свободнорадикального окисления аскорбиновая кислота реализует за счет способности акцептировать активные формы кислорода в водной фазе и восстанавливать радикалы жирорастворимых антиоксидантов [79]. Эффективность аскорбиновой кислоты в качестве радиопротектора была продемонстрирована при синтезе РФЛП на основе ¹⁷⁷Lu [80, 81]. В работе [82] показано, что 0,1 г/мл аскорбиновой кислоты в препарате [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-[Pro¹,Tyr⁴]-бомбезин с активностью 600 Мбк/мл достаточно для поддержания РХЧ на приемлемом уровне (≥98 %) в течение 7 суток и при комнатной температуре. Напротив, в исследовании [83] показано, что добавления аскорбиновой кислоты в качестве единственного радиопротектора недостаточно для поддержания РХЧ ≥95 %. При комнатной температуре препарат [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 (1 мл, 740 Мбк/мл 0,52 М аскорбатный буфер, 10 мкг PSMA-617) не был стабилен: спустя сутки после приготовления РХЧ снизилась примерно с 98 до 80 %. Однако, когда препарат разбавляли до 10 мл 0,9%-м раствором натрия хлорида и хранили при –20 °С, РХЧ через 2 суток была выше 95 %. Таким образом, только сочетание аскорбатного буфера, разбавления препарата до объемной активности ниже 3,7 Гбк/мл и низких температур позволяет стабилизировать препарат в течение 48 часов. О неэффективной стабилизации препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-RM1 (0,1 М ацетатный буфер, 740 Мбк/мл) аскорбиновой кислотой сообщается и в работе [84]. При добавлении 500 мкг/мл аскорбиновой кислоты РХЧ составила 65 % через 3 суток, тогда как, например, при добавлении того же количества гентизиновой кислоты стабильность препарата через тот же период времени была в 2 раза выше.

Кроме того, использование аскорбиновой кислоты в составе РФЛП также связано с рядом трудностей: стабильностью, окислением, изменением окраски аскорбиновой кислоты как в процессе синтеза, так и в процессе хранения препаратов [85–87], снижением радиохимической конверсии при синтезе [по сравнению с другими буферными агентами – MES (2-(N-морфолино)этансульфоновой кислотой) и ацетатом аммония] [88]. В некоторых исследованиях показано, что наличие аскорбиновой кислоты в фарма-

Таблица 3. Состав препаратов Lutathera® и Pluvicto™

Table 3. Composition of Lutathera® and Pluvicto™

Активность Radioactivity	Lutathera® ¹	Pluvicto™ ²
	7,4 ГБк (200 мКи) 7,4 GBq (200 mCi)	
Объемная активность Radioactivity concentration	370 МБк/мл 370 MBq/ml	1000 МБк/мл 1000 MBq/ml
Вспомогательные вещества Excipients	Натрия гидроксид 0,65 мг/мл Sodium hydroxide 0,65 mg/ml	
	Натрия хлорид 6,85 мг/мл Sodium chloride 6,85 mg/ml	
	Ацетат натрия 0,66 мг/мл Sodium acetate 0,66 mg/ml	Ацетат натрия 0,41 мг/мл Sodium acetate 0,41 mg/ml
	Уксусная кислота 0,48 мг/мл Acetic acid 0,48 mg/ml	Уксусная кислота 0,30 мг/мл Acetic acid 0,30 mg/ml
	Аскорбиновая кислота 2,8 мг/мл Ascorbic acid 2,8 mg/ml	Аскорбат натрия 50,0 мг/мл Sodium ascorbate 50,0 mg/ml
	Гентизиновая кислота 0,63 мг/мл Gentisic acid 0,63 mg/ml	Гентизиновая кислота 0,39 мг/мл Gentisic acid 0,39 mg/ml
	Диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА) 0,05 мг/мл Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 0,05 mg/ml	Диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА) 0,10 мг/мл Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 0,10 mg/ml
	Вода для инъекций до 1 мл Water for injection up to 1 ml	Вода для инъекций до 1 мл Water for injection up to 1 ml
Срок годности Shelf live	72 часа 72 hours	120 часов 120 hours

Примечание. ¹ LUTATHERA® (lutetium Lu 177 dotatate) | GEP-NET Treatment. Prescribing Information. Available at: https://www.novartis.com/us-en/sites/novartis_us/files/lutathera.pdf. Accessed: 15.08.2023.

² PLUVICTO® PRESCRIBING INFORMATION. Available at: https://www.novartis.com/us-en/sites/novartis_us/files/pluvicto.pdf. Accessed: 15.08.2023.; PLUVICTO® | Lutetium Lu 177 Vipivotide Tetraxetan Available at: <https://www.us.pluvicto.com/>. Accessed: 15.08.2023.

Note. ¹ LUTATHERA® (lutetium Lu 177 dotatate) | GEP-NET Treatment. Prescribing Information. Available at: https://www.novartis.com/us-en/sites/novartis_us/files/lutathera.pdf. Accessed: 15.08.2023.

² PLUVICTO® PRESCRIBING INFORMATION. Available at: https://www.novartis.com/us-en/sites/novartis_us/files/pluvicto.pdf. Accessed: 15.08.2023.; PLUVICTO® | Lutetium Lu 177 Vipivotide Tetraxetan Available at: <https://www.us.pluvicto.com/>. Accessed: 15.08.2023.

цветической композиции может затруднять анализ других компонентов в составе РФЛП [89, 90]. Сообщается также о случае, когда аскорбиновая кислота вступала в реакцию с действующим веществом препарата¹.

Смеси радиопротекторов. Для поддержания высокой РХЧ препаратов зачастую используют смеси различных антиоксидантов [32, 74, 91, 92], наиболее популярной из которых является комбинация аскорбиновой и гентизиновой кислот. В работе [93] для препарата [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T с активностью 18–31 ГБк/мл, стабилизированного смесью гентизиновой (16,8 мг) и аскорбиновой (51 мг) кислот, с конечным объемом (17–25 мл) спустя сутки после приготовления РХЧ оставляла более 97 %. Эффективность использования смеси гентизиновой и аскорбиновой кислот объясняется тем, что аскорбиновая кислота, вступая в реакцию с первичными радикалами гентизиновой кислоты (C₆H₃(OH)₃COOH, C₆H₃(OH)(O⁻)COOH), восстанавливает

¹ Higashi K., Washino K. Radiation protection agents suitable for use with radiopharmaceuticals comprising reducible active ingredients. Patent Eur. № EP0832654 B1. 18.09.1997. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/78/01/27/bf2d26d56114bf/EP0832654B1.pdf>. Accessed: 15.08.2023.

их, таким образом возвращая гентизиновую кислоту в реакционную смесь [63].

Именно смесь гентизиновой и аскорбиновой кислот используется в зарегистрированных сегодня препаратах на основе ¹⁷⁷Lu – Lutathera® и Pluvicto™ (таблица 3) с заявленными сроками годности 72 часа и 120 часов соответственно.

Аминокислоты и их смеси с другими соединениями. Свойством подавлять радиолиз в РФЛП обладают также различные аминокислоты. Например, использование 1 мМ раствора цистеина (0,1216 мг/мл) и гистидина (0,1552 мг/мл) способствовало поддержанию РХЧ препарата ¹⁷⁷Lu-VEGF-A165/NRP-1 на уровне >95 % в течение суток [94]. В работе [95] сообщается об эффективности ряда радиопротекторов для стабилизации меченого лютецием-177 производного гастрин-высвобождающего пептида [¹⁷⁷Lu]Lu-AMBA (0,15 мл, с активностью 555 МБк/мл, 6,6 мг/мл стабилизатора). Через 24 часа хранения исследуемые вещества располагались в следующем ряду по эффективности (РХЧ, %): аскорбиновая кислота (83,6 ± 1,1 %) > гентизиновая кислота (72,1 ± 4,6 %) = цистеин (71,6 ± 1,7 %) > метионин (55,2 ± 2,5 %) = этанол (52,5 ± 2,8 %) > триптофан (17,47 ± 2,7 %) > гли-

цин (14,6 %) > гистидин (4,6 %); контроль – $9,1 \pm 2,3$ %. После 48 часов инкубирования результаты были следующими: аскорбиновая кислота ($75,0 \pm 1,3$ %) > цистеин ($54,3 \pm 0,9$ %) > гентизиновая кислота ($40,2 \pm 6,5$ %) > метионин ($33,5 \pm 3,2$ %) > этанол ($21,6 \pm 1,7$ %), при этом гистидин, триптофан и глицин не проявили радиопротекторные свойства. Кроме того, были исследованы стабилизирующие свойства селенорганических соединений – селен-метионина и селен-цистеина. Лучшие радиопротекторные свойства показаны образцами, содержащими селен-метионин: для препарата объемом 0,5 мл (814 МБк/мл ^{177}Lu , 24 мкг/мл АМВА, 0,04 М АсОНа (рН 4,8), 0,2 мг/мл радиопротектора и 0,8 мг/мл ЭДТА) радиохимическая чистота через 24 часа составила 72, 26 и 19 % для селен-метионина, цистеина и метионина соответственно. При использовании селен-метионина в сочетании с аскорбиновой кислотой РХЧ сохранялась на уровне 99 %. Однако при увеличении содержания селен-метионина в составе препарата (от 1 мг до 10 мг) наблюдалось существенное падение выхода реакции комплексообразования с 99 до 95 %. Следует отметить, что в данной работе авторы использовали сомнительный подход к дизайну исследования: вместо мольных соотношений использованы одинаковые численные значения различных видов концентраций для различных радиопротекторов (мг/мл, об.% – для ряда аминокислот, гентизиновой и аскорбиновой кислоты и этанола соответственно). Такой подход затрудняет сопоставление результатов работы и требует дополнительных исследований по влиянию концентрации каждого радиопротектора на стабильность препарата.

В недавно опубликованной работе [71] было проведено сравнение эффективности ряда радиопротекторов (7,4 мкМ/мл) в составе препарата [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (1 мл, 450 МБк/мл, 0,03 М АсОНа). Лучшие радиопротекторные свойства проявили цистеин, гентизиновая кислота и ванилин: цистеин (96,5 %) > гентизиновая кислота (95,9 %) > ванилин (95,4 %) > метионин (93,3 %) > аденин (91,9 %) > добезиловая кислота (90,9 %) > тимин (90,3 %) > урацил (82,5 %) > никотинамид (81,3 %) > меглюмин (67 %) > маннитол (63,3 %) > адметионин (59,6 %) спустя 72 часа хранения. На более ранних сроках (48 часов) наиболее эффективным веществом оказался цистеин ($98,6 \pm 0,7$ %, $97 \pm 0,6$ % и $96,3 \pm 1,1$ % для цистеина, гентизиновой кислоты и ванилина соответственно). Однако в процессе хранения образцов с цистеином было отмечено присутствие белого осадка цистина, образование которого было связано с радиационно-индуцированным окислением цистеина [96, 97]. Для стабилизации цистеина была добавлена димеркаптоантарная кислота (ДМСА), и препараты, содержащие ДМСА в смеси с цистеином, показали большую защиту от радиолитического распада, чем цистеин и гентизиновая кислота по отдельности (через 72 ч хранения РХЧ составила $97,3 \pm 0,3$ %, $97,5 \pm 0,3$ %, $95,7 \pm 0,7$ % и $95,1 \pm 0,8$ % для ДМСА, ДМСА + цистеин (1:1), цистеина и гентизи-

новой кислоты соответственно). Было отмечено, что сама ДМСА оказалась эффективным радиопротектором для препаратов ^{177}Lu : РХЧ препарата [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (1 мл, 470 МБк/мл, 100 мкг PSMA) с добавлением только ДМСА (32 мкмоль) была >97 % через 72 часа после синтеза. Для образцов [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 с клинической активностью (7,4 ГБк, объем проб – 2 мл, 0,15 М АсОНа) после 6,5 часов хранения при комнатной температуре РХЧ образца со смесью цистеина (3,9 мг, 32 мкмоль) и ДМСА (2,9 мг, 16 мкмоль) была выше, чем РХЧ образца с гентизиновой кислотой (5 мг, 32 мкмоль): $96,3 \pm 0,6$ % и $93,9 \pm 0,7$ % соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ опубликованных данных по оптимизации состава готовых лекарственных форм РФЛП показал значительное расхождение результатов исследований их стабильности в условиях радиолитического распада. Различные радионуклиды, входящие в состав РФЛП, будут создавать неодинаковые дозовые нагрузки из-за разницы ядерно-физических характеристик (скорость и тип распада, энергии испускаемых частиц), соответственно и векторные молекулы, имеющие различное строение, будут проявлять различную чувствительность к радиолитическому распаду. Однако сравнение результатов исследований затруднено даже для препаратов на основе одного и того же радионуклида – ^{177}Lu и одной векторной молекулы, уже применяемой в клинической практике, – PSMA-617 или DOTA-TATE. Различия между получаемыми данными могут быть обусловлены множеством факторов: разные условия синтеза препарата, его состав (природа и концентрации прекурсора, радиопротектора и буферного агента), объем реакционной смеси и температура хранения. Кроме того, возникает много вопросов относительно определения радиохимической чистоты радиофармпрепаратов. В некоторых исследованиях использовали только метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), тогда как в других использовали только методы ВЭЖХ или их комбинации. Зачастую только метода ТСХ для определения РХЧ препаратов бывает недостаточно. ТСХ является достаточно просто реализуемым методом, позволяющим быстро определить уровень радиохимической конверсии радионуклида, однако метод ВЭЖХ позволяет получить более полную информацию по содержанию в препарате родственных радиохимических примесей и продуктов деградации векторной молекулы [98]. Даже в случае использования аналогичных методов ТСХ и ВЭЖХ для определения РХЧ препаратов необходимо учитывать параметры аналитического оборудования, валидацию аналитических методик и подход к интерпретации полученных хроматограмм [98, 99].

В большинстве работ, рассмотренных в данном обзоре, используется эмпирический подход, при котором основным критерием эффективности радиопротектора является достаточная стабильность ГЛФ

РФЛП (т. е. сохранение значения РХЧ на приемлемом уровне) в течение срока хранения/годности. Кроме оценки эффективности в отношении стабилизации РФЛП, важным фактором при выборе радиопротектора является возможность его использования в инъекционных лекарственных формах, в том числе с учетом потенциальной токсичности веществ, образующихся в процессе радикальных реакций. Так, например, в препаратах, стабилизированных цистеином, образуется нерастворимый осадок цистина, при радиолитическом разложении гентизиновой кислоты образуются бензохиноны и т. д. На практике это приводит к серийной наработке и анализу во времени препаратов с использованием высокой активности радионуклидов с параллельным изменением состава РФЛП в отношении радиопротектора (его природы и концентрации в случае неудовлетворительного результата). Рыночная стоимость радионуклидов и прекурсоров обуславливает актуальность поиска альтернативных вариантов оценки радиолитической стабильности ГЛФ РФЛП и, соответственно, эффективного радиопротектора.

Одним из подходов можно считать масштабирование процесса авторадииолиза в модельных препаратах с меньшей объемной активностью и концентрациями остальных компонентов (так называемый «*downscaled samples*» по сравнению с ГЛФ) с одновременным контролем или оценкой таких параметров системы, как дозовый коэффициент ψ (Гр мл МБк⁻¹) [71]. В последних исследованиях показано, что основным параметром, характеризующим процессы радиолитического разложения в РФЛП, является величина поглощенной дозы. Причем установлены некоторые количественные закономерности, которые позволяют спрогнозировать уровень РХЧ препарата как в присутствии радиопротекторов, так и без них [58, 71, 100, 101].

Помимо этого, для выбора потенциальных антиоксидантов в ходе фармацевтической разработки РФЛП может быть использована информация о кинетике радикальных реакций в водных средах между различными молекулами и продуктами радиолитического разложения [63, 102, 103]¹. Так, например, становится очевидно, почему этанол является не столь эффективным радиопротектором по сравнению с гентизиновой и аскорбиновой кислотами: в диапазоне pH 3–7 константа скорости бимолекулярной радикальной реакции составляет $(0,7–1,7) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [103]. Для сравнения: в тех же условиях реакции радикала OH^\cdot с аскорбиновой и гентизиновой кислотами характеризуются константами на порядок выше. Ранее нами также было показано, что опубликованные данные об удельных бимолекулярных константах скорости реакций различных радикалов с рядом радиопро-

текторов качественно согласуются с результатами исследования стабильности радиокопьюгата лютеция-177 в присутствии этих веществ [71]. Так, наилучшие стабилизирующие свойства проявили цистеин и гентизиновая кислота (спустя 72 часа РХЧ [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 составила 96,5 и 95,9 % соответственно), имеющие константы $4,7 \times 10^{10}$ и $1,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ соответственно (pH 7, для радикалов $\cdot\text{OH}$) [63, 102]. Среди исследованных антиоксидантов как стабилизирующие свойства, так и величины константы скорости радикальных реакций (pH 5–9 для радикалов $\times\text{OH}$) падают в следующем ряду: метионин [$(5,1–8,5) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$] > тимин [$(3,1–6,4) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$] > урацил ($3,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) > никотинамид ($1,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [102, 103]. Однако стоит отметить, что в области разработки и оптимизации состава РФЛП данные о радикальных реакциях могут быть использованы лишь на стадии первичного отбора радиопротекторов ввиду существенного различия между условиями в ГЛФ радиофармпрепарата и условиями, в которых получены те или иные константы. Помимо этого, наблюдаемая разница значений констант для одной и той же реакции в различных источниках (зачастую сохраняется лишь порядок величины) также ограничивает применение литературных данных.

Таким образом, логичным представляется подход, объединяющий исследования кинетики радикальных реакций с исследованиями радиационно-химических выходов продуктов радиолитического разложения в одинаковых или максимально близких условиях с последующей проверкой стабильности ГЛФ. Данная стратегия будет способствовать более глубокому пониманию физико-химических процессов, происходящих в препарате, и потенциально снизит стоимость фармацевтической разработки радиофармацевтических препаратов. Клиническое применение радиофармпрепаратов лютеция-177, доказанная терапевтическая эффективность и оптимальные ядерно-физические характеристики ¹⁷⁷Lu являются основанием для расширения клинического применения ¹⁷⁷Lu-РФЛП. Крайне привлекательным представляется централизованное производство и поставка терапевтических РФЛП в лечебные учреждения (в том числе по принципу ядерной аптеки), что подразумевает необходимость обеспечения их высокого качества как на момент приготовления, так и в течение срока хранения и поставки конечному потребителю. Поэтому задача выбора оптимального состава лекарственной формы с обеспечением стабильности РФЛП является крайне актуальной.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sgouros G., Bodei L., McDevitt M. R., Nedrow J. R. Radiopharmaceutical Therapy in Cancer: Clinical Advances and Challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2020;19(9):589–608. DOI: 10.1038/s41573-020-0073-9.
2. Volkert W. A., Hoffman T. J. Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Chemical Reviews*. 1999;99(9):2269–2292. DOI: 10.1021/cr9804386.

¹ Higashi K., Washino K. Radiation protection agents suitable for use with radiopharmaceuticals comprising reducible active ingredients. Patent Eur. № EP0832654 B1. 18.09.1997. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/78/01/27/bf2d26d56114bf/EP0832654B1.pdf>. Accessed: 15.08.2023

3. Tagawa S.T., Akhtar N.H., Nikolopoulou A., Kaur G., Robinson B., Kahn R., Vallabhajosula S., Goldsmith S.J., Nanus D.M., Bander N.H. Bone Marrow Recovery and Subsequent Chemotherapy Following Radiolabeled Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Monoclonal Antibody J591 in Men with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2013;3. DOI: 10.3389/fonc.2013.00214.
4. Bander N.H., Milowsky M.I., Nanus D.M., Kostakoglu L., Vallabhajosula S., Goldsmith S.J. Phase I Trial of 177 Lutetium-Labeled J591, a Monoclonal Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen, in Patients With Androgen-Independent Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(21):4591–4601. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.160.
5. Reynolds T.S., Bandari R.P., Jiang Z., Smith C.J. Lutetium-177 Labeled Bombesin Peptides for Radionuclide Therapy. *Current Radiopharmaceuticals*. 2015;9(1):33–43. DOI: 10.2174/1874471008666150313112922.
6. Staniszevska M., Iking J., Lückerrath K., Hadaschik B., Herrmann K., Ferdinandus J., Fendler W.P. Drug and Molecular Radiotherapy Combinations for Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *Nuclear Medicine and Biology*. 2021;96–97101–111. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2021.03.009.
7. Dash A., Pillai M.R.A., Knapp F.F. Production of 177Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015;49(2):85–107. DOI: 10.1007/s13139-014-0315-z.
8. Das T., Banerjee S. Theranostic Applications of Lutetium-177 in Radionuclide Therapy. *Curr. Radiopharm*. 2016;994–101.
9. Shinto A.S., Shibu D., Kamaleshwaran K.K., Das T., Chakraborty S., Banerjee S., Thirumalaisamy P., Das P., Veersekhar G. 177Lu-EDTMP for Treatment of Bone Pain in Patients with Disseminated Skeletal Metastases. *Journal of Nuclear Medicine Technology*. 2014;42(1):55–61. DOI: 10.2967/jnmt.113.132266.
10. Solá G.A.R., Argüelles M.G., Bottazzini D.L., Furnari J.C., Parada I.G., Rojo A., Ruiz H.V. Lutetium-177-EDTMP for Bone Pain Palliation. Preparation, Biodistribution and Pre-Clinical Studies. *Radiochimica Acta*. 2000;88(3–4):157–161. DOI: 10.1524/ract.2000.88.3-4.157.
11. Banerjee S., Pillai M.R.A., Knapp F.F. (Russ). Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chemical Reviews*. 2015;115(8):2934–2974. DOI: 10.1021/cr500171e.
12. Kuznetsov R.A., Bobrovskaya K.S., Svetukhin V.V., Fomin A.N., Zhukov A.V. Production of Lutetium-177: Process Aspects. *Radiochemistry*. 2019;61(4):381–395. DOI: 10.1134/S1066362219040015.
13. Cremonesi M., Ferrari M., Bodei L., Tosi G., Paganelli G. Dosimetry in Peptide Radionuclide Receptor Therapy: A Review. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2006;47(9):1467–1475.
14. Wessels B.W., Meares C.F. Physical and Chemical Properties of Radionuclide Therapy. *Seminars in Radiation Oncology*. 2000;10(2):115–122. DOI: 10.1016/S1053-4296(00)80048-X.
15. Perkins A.C. In Vivo Molecular Targeted Radiotherapy. *Biomed. Imaging Interv. J*. 2005;1(2):e9. DOI: 10.2349/bij.1.2.e9.
16. Kwekkeboom D.J., de Herder W.W., Kam B.L., van Eijck C.H., van Essen M., Kooij P.P., Feelders R.A., van Aken M.O., Krenning E.P. Treatment With the Radiolabeled Somatostatin Analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]Octreotate: Toxicity, Efficacy, and Survival. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(13):2124–2130. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.2553.
17. Sabet A., Haslerud T., Pape U.-F., Sabet A., Ahmadzadehfah H., Grünwald F., Guhlke S., Biersack H.-J., Ezziddin S. Outcome and Toxicity of Salvage Therapy with 177Lu-Octreotate in Patients with Metastatic Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2014;41(2):205–210. DOI: 10.1007/s00259-013-2547-z.
18. Van Essen M., Krenning E.P., Kam B.L.R., de Herder W.W., Feelders R.A., Kwekkeboom D.J. Salvage Therapy with 177 Lu-Octreotate in Patients with Bronchial and Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Journal of Nuclear Medicine*. 2010;51(3):383–390. DOI: 10.2967/jnumed.109.068957.
19. Hennrich U., Kopka K. Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Pharmaceuticals*. 2019;12(3):114. DOI: 10.3390/ph12030114.
20. Keam S.J. Lutetium Lu-177 Vipivotide Tetraxetan: First Approval. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2022;26(4):467–475. DOI: 10.1007/s40291-022-00594-2.
21. Kratochwil C., Giesel F.L., Eder M., Afshar-Oromieh A., Benešová M., Mier W., Kopka K., Haberkorn U. [177Lu]Lutetium-Labeled PSMA Ligand-Induced Remission in a Patient with Metastatic Prostate Cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015;42(6):987–988. DOI: 10.1007/s00259-014-2978-1.
22. Ahmadzadehfah H., Eppard E., Kürpig S., Fimmers R., Yordanova A., Schlenkhoff C.D., Gärtner F., Rogenhofer S., Essler M. Therapeutic Response and Side Effects of Repeated Radioligand Therapy with 177Lu-PSMA-DKFZ-617 of Castrate-Resistant Metastatic Prostate Cancer. *Oncotarget*. 2016;7(11):12477–12488. DOI: 10.18632/oncotarget.7245.
23. Baum R.P., Kulkarni H.R., Schuchardt C., Singh A., Wirtz M., Wies-salla S., Schottelius M., Mueller D., Klette I., Wester H.-J. 177 Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. *Journal of Nuclear Medicine*. 2016;57(7):1006–1013. DOI: 10.2967/jnumed.115.168443.
24. Ahmadzadehfah H., Rahbar K., Kürpig S., Bögemann M., Claesener M., Eppard E., Gärtner F., Rogenhofer S., Schäfers M., Essler M. Early Side Effects and First Results of Radioligand Therapy with 177Lu-DKFZ-617 PSMA of Castrate-Resistant Metastatic Prostate Cancer: A Two-Centre Study. *EJNMMI Research*. 2015;5(1):114. DOI: 10.1186/s13550-015-0114-2.
25. Kratochwil C., Giesel F.L., Stefanova M., Benešová M., Bronzel M., Afshar-Oromieh A., Mier W., Eder M., Kopka K., Haberkorn U. PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with 177Lu-Labeled PSMA-617. *Journal of Nuclear Medicine*. 2016;57(8):1170–1176. DOI: 10.2967/jnumed.115.171397.
26. Rahbar K., Bode A., Weckesser M., Avramovic N., Claesener M., Stegger L., Bögemann M. Radioligand Therapy With 177Lu-PSMA-617 as A Novel Therapeutic Option in Patients With Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *Clinical Nuclear Medicine*. 2016;41(7):522–528. DOI: 10.1097/RLU.0000000000001240.
27. Rahbar K., Ahmadzadehfah H., Kratochwil C., Haberkorn U., Schäfers M., Baum R.P., Kulkarni H.R., Schmidt M., Drzezga A., Bartenstein P., Pfestroff A., Luster M., Lützen U., Marx M., Prasad V., Brenner W., Heinzel A., Mottaghy F.M., Ruf J., Meyer P.T., Heuschkel M., Eveslage M., Bögemann M., Fendler W.P., Krause B.J. German Multicenter Study Investigating 177Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *Journal of Nuclear Medicine*. 2017;58(1):85–90. DOI: 10.2967/jnumed.116.183194.
28. Hofman M.S., Violet J., Hicks R.J., Ferdinandus J., Thang S.P., Akhurst T., Irvani A., Kong G., Ravi Kumar A., Murphy D.G., Eu P., Jackson P., Scalzo M., Williams S.G., Sandhu S. [177Lu]-PSMA-617 Radionuclide Treatment in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (LuPSMA Trial): A Single-Centre, Single-Arm, Phase 2 Study. *The Lancet Oncology*. 2018;19(6):825–833. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30198-0.
29. Hofman M.S., Emmett L., Sandhu S., Irvani A., Joshua A.M., Goh J.C., Pattison D.A., Tan T.H., Kirkwood I.D., Ng S., Francis R.J., Gedye C., Rutherford N.K., Weickhardt A., Scott A.M., Lee S.-T., Kwan E.M., Azad A.A., Ramdave S., Redfern A.D., MacDonald W., Guminski A., Hsiao E., Chua W., Lin P., Zhang A.Y., McJannett M.M., Stockler M.R., Violet J.A., Williams S.G., Martin A.J., Davis I.D., Azad A.A., Chua W., Davis I.D., Dhiantravan N., Emmett L., Ford K., Hofman M.S., Francis R.J., Gedye C., Goh J.C., Guminski A., Hsiao E., Irvani A., Joshua A.M., Kirkwood I.D., Langford A., Lawrence N., Lee S.-T., Lin P., Martin A.J., McDonald W., McJannett M.M., Ng S., Pattison D.A., Ramdave S., Rana N., Redfern A.D., Rutherford N.K., Sandhu S., Scott A.M., Stockler M.R., Subramaniam S., Tan T.H., Violet J.A., Weickhardt A., Williams S.G., Yip S., Zhang A.Y. [177Lu]Lu-PSMA-617 versus Cabazitaxel in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (TheraP): A Randomised, Open-Label, Phase 2 Trial. *The Lancet*. 2021;397(10276):797–804. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00237-3.

30. Irvani A., Violet J., Azad A., Hofman M.S. Lutetium-177 Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Theranostics: Practical Nuances and Intricacies. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2020;23(1):38–52. DOI: 10.1038/s41391-019-0174-x.
31. Sartor O., de Bono J., Chi K.N., Fizazi K., Herrmann K., Rahbar K., Tagawa S.T., Nordquist L.T., Vaishampayan N., El-Haddad G., Park C.H., Beer T.M., Armour A., Pérez-Contreras W.J., DeSilvio M., Kpamegan E., Gericke G., Messmann R.A., Morris M.J., Krause B.J. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(12):1091–1103. DOI: 10.1056/NEJMoa2107322.
32. Ruigrok E.A.M., van Vliet N., Dalm S.U., de Blois E., van Gent D.C., Haeck J., de Ridder C., Stuurman D., Konijnenberg M.W., van Weerden W.M., de Jong M., Nonnekens J. Extensive Preclinical Evaluation of Lutetium-177-Labeled PSMA-Specific Tracers for Prostate Cancer Radionuclide Therapy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2021;48(5):1339–1350. DOI: 10.1007/s00259-020-05057-6.
33. Uijen M.J.M., Privé B.M., van Herpen C.M.L., Westdorp H., van Gemert W.A., de Bakker M., Gotthardt M., Konijnenberg M.W., Peters S.M.B., Nagarajah J. Kidney Absorbed Radiation Doses for [177Lu]Lu-PSMA-617 and [177Lu]Lu-PSMA-I&T Determined by 3D Clinical Dosimetry. *Nuclear Medicine Communications*. 2023;44(4):270–275. DOI: 10.1097/MNM.0000000000001658.
34. Demirkol M.O., Esen B., Sen M., Ucar B., Kurtuldu S., Mandel N.M., Bavbek S., Falay O., Tilki D., Esen T. MP11-07 radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-psma-I&T in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: oncological outcomes and toxicity profile. *Journal of Urology*. 2023;209(Supplement 4):125–126. DOI: 10.1097/JU.0000000000003226.07.
35. Hartrampf P.E., Weinzierl F.-X., Serfling S.E., Pomper M.G., Rowe S.P., Higuchi T., Seitz A.K., Kübler H., Buck A.K., Werner R.A. Hematotoxicity and Nephrotoxicity in Prostate Cancer Patients Undergoing Radioligand Therapy with [177Lu]Lu-PSMA-I&T. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3):647. DOI: 10.3390/cancers14030647.
36. Heck M.M., Retz M., D'Alessandria C., Rauscher I., Scheidhauer K., Maurer T., Storz E., Janssen F., Schottelius M., Wester H.-J., Gschwend J.E., Schwaiger M., Tauber R., Eiber M. Systemic Radioligand Therapy with ¹⁷⁷Lu-Labeled Prostate Specific Membrane Antigen Ligand for Imaging and Therapy in Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *Journal of Urology*. 2016;196(2):382–391. DOI: 10.1016/j.juro.2016.02.2969.
37. Heck M.M., Tauber R., Schwaiger S., Retz M., D'Alessandria C., Maurer T., Gafita A., Wester H.-J., Gschwend J.E., Weber W.A., Schwaiger M., Knorr K., Eiber M. Treatment Outcome, Toxicity, and Predictive Factors for Radioligand Therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA-I&T in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*. 2019;75(6):920–926. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.11.016.
38. Kesavan M., Turner J.H., Meyrick D., Yeo S., Cardaci G., Lenzo N.P. Salvage Radiopeptide Therapy of Advanced Castration-Resistant Prostate Cancer with Lutetium-177-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen: Efficacy and Safety in Routine Practice. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2018;33(7):274–281. DOI: 10.1089/cbr.2017.2403.
39. Heck M., Schwaiger S., Knorr K., Retz M., Maurer T., Janssen F., D'Alessandria C., Wester H.-J., Gschwend J., Schwaiger M., Tauber R., Eiber M. PD14-01 Clinical Experience with Lutetium 177-Labeled PSMA-I&T for Radioligand Therapy in 100 Consecutive Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Urology*. 2018;199(4S):e304. DOI: 10.1016/j.juro.2018.02.787.
40. Weineisen M., Schottelius M., Simecek J., Baum R.P., Yildiz A., Beykan S., Kulkarni H.R., Lassmann M., Klette I., Eiber M., Schwaiger M., Wester H.-J. ⁶⁸Ga- and ¹⁷⁷Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *Journal of Nuclear Medicine*. 2015;56(8):1169–1176. DOI: 10.2967/jnumed.115.158550.
41. Weineisen M., Schottelius M., Simecek J., Baum R.P., Yildiz A., Beykan S., Kulkarni H.R., Lassmann M., Klette I., Eiber M., Schwaiger M., Wester H.-J. ⁶⁸Ga- and ¹⁷⁷Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *Journal of Nuclear Medicine*. 2015;56(8):1169–1176. DOI: 10.2967/jnumed.115.158550.
42. Bander N. Targeted Systemic Therapy of Prostate Cancer with a Monoclonal Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen. *Seminars in Oncology*. 2003;30(5):667–676. DOI: 10.1016/S0093-7754(03)00358-0.
43. Tagawa S.T., Milowsky M.I., Morris M., Vallabhajosula S., Christos P., Akhtar N.H., Osborne J., Goldsmith S.J., Larson S., Taskar N.P., Scher H.I., Bander N.H., Nanus D.M. Phase II Study of Lutetium-177-Labeled Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Monoclonal Antibody J591 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(18):5182–5191. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0231.
44. Tagawa S.T., Vallabhajosula S., Christos P.J., Jhanwar Y.S., Batra J.S., Lam L., Osborne J., Beltran H., Molina A.M., Goldsmith S.J., Bander N.H., Nanus D.M. Phase 1/2 Study of Fractionated Dose Lutetium-177-Labeled Anti-Prostate-specific Membrane Antigen Monoclonal Antibody J591 (¹⁷⁷Lu-J591) for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Cancer*. 2019;125(15):2561–2569. DOI: 10.1002/cncr.32072.
45. Batra J.S., Niaz M.J., Whang Y.E., Sheikh A., Thomas C., Christos P., Vallabhajosula S., Jhanwar Y.S., Molina A.M., Nanus D.M., Osborne J.R., Bander N.H., Tagawa S.T. Phase I Trial of Docetaxel plus Lutetium-177-Labeled Anti-Prostate-specific Membrane Antigen Monoclonal Antibody J591 (¹⁷⁷Lu-J591) for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2020;38(11):848.e9–848.e16. DOI: 10.1016/j.urolonc.2020.05.028.
46. Van Nuland M., Ververs T.F., Lam M.G.E.H. Dosing Therapeutic Radiopharmaceuticals in Obese Patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(2):818. DOI: 10.3390/ijms23020818.
47. Ma J., Wang F., Mostafavi M. Ultrafast Chemistry of Water Radical Cation, H₂O⁺, in Aqueous Solutions. *Molecules*. 2018;23(2):244. DOI: 10.3390/molecules23020244.
48. Schwarz H.A. Free Radicals Generated by Radiolysis of Aqueous Solutions. *Journal of Chemical Education*. 1981;58(2):101. DOI: 10.1021/ed058p101.
49. Jay-Gerin J.-P., Ferradini C. A New Estimate of the Radical Yield at Early Times in the Radiolysis of Liquid Water. *Chemical Physics Letters*. 2000;317(3–5):388–391. DOI: 10.1016/S0009-2614(99)01397-4.
50. Serdons K., Verbruggen A., Bormans G. The Presence of Ethanol in Radiopharmaceutical Injections. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49(12):2071–2071. DOI: 10.2967/JNUMED.108.057026.
51. Evans E.A. Control of Self-Irradiation Decomposition of Tritium-Labelled Compounds at High Specific Activity. *Nature*. 1966;209(5019):169–171. DOI: 10.1038/209169a0.
52. Miller G.G., Raleigh J.A. Action of Some Hydroxyl Radical Scavengers on Radiation-Induced Haemolysis. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 1983;43(4):411–419. DOI: 10.1080/09553008314550471.
53. Mu L., Hesselmann R., Oezdemir U., Bertschi L., Blanc A., Dragic M., Löffler D., Smuda C., Johayem A., Schibli R. Identification, Characterization and Suppression of Side-Products Formed during the Synthesis of High Dose ⁶⁸Ga-DOTA-TATE. *Applied Radiation and Isotopes*. 2013;76:63–69. DOI: 10.1016/j.apradiso.2012.07.022.
54. Kim S., Han E. Changes in the Radiochemical Purity of [18F]FDG Radiopharmaceutical According to the Amount of Ethanol Added. *International Journal of Radiation Research*. 2020;18(3):593–598. DOI: 10.18869/acadpub.ijrr.18.3.593.
55. Walters L.R., Martin K.J., Jacobson M.S., Hung J.C., Mosman E.A. Stability Evaluation of 18F-FDG at High Radioactive Concentrations. *Journal of Nuclear Medicine Technology*. 2012;40(1):52–56. DOI: 10.2967/jnmt.111.097287.
56. Jacobson M.S., Dankwart H.R., Mahoney D.W. Radiolysis of 2-[18F]Fluoro-2-Deoxy-d-Glucose ([18F]FDG) and the Role of Ethanol and Radioactive Concentration. *Applied Radiation and Isotopes*. 2009;67(6):990–995. DOI: 10.1016/j.apradiso.2009.01.005.
57. Dantas N.M., Nascimento J.E., Santos-Magalhães N.S., Oliveira M.L. Radiolysis of 2-[18F]Fluoro-2-Deoxy-d-Glucose ([18F]FDG) and the Role of Ethanol, Radioactive Concentration and Temperature of Storage. *Applied Radiation and Isotopes*. 2013;72:158–162. DOI: 10.1016/j.apradiso.2012.10.017.

58. De Zanger R. M. S., Chan H. S., Breeman W. A. P., de Blois E. Maintaining Radiochemical Purity of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-PSMA-617 for PRRT by Reducing Radiolysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2019;321(1):285–291. DOI: 10.1007/s10967-019-06573-y.
59. Vats K., Satpati D., Division R., Atomic B. A Formulation of Lu-DOTA-TATE Dose for Administration in Cancer Patients. *BARC Newsl*. 2021;(August):1–4.
60. Roohi S., Rizvi S. K., Naqvi S. A. R. ¹⁷⁷Lu-DOTATATE Peptide Receptor Radionuclide Therapy: Indigenously Developed Freeze Dried Cold Kit and Biological Response in In-Vitro and In-Vivo Models. *Dose-Response*. 2021;19(1):155932582199014. DOI: 10.1177/1559325821990147.
61. Choy C. J., Ling X., Geruntho J. J., Beyer S. K., Latoche J. D., Langton-Webster B., Anderson C. J., Berkman C. E. 177 Lu-Labeled Phosphoramidate-Based PSMA Inhibitors: The Effect of an Albumin Binder on Biodistribution and Therapeutic Efficacy in Prostate Tumor-Bearing Mice. *Theranostics*. 2017;7(7):1928–1939. DOI: 10.7150/thno.18719.
62. Exner M., Hermann M., Hofbauer R., Kapiotis S., Speiser W., Held I., Seelos C., Gmeiner B. M. K. The Salicylate Metabolite Gentisic Acid, but Not the Parent Drug, Inhibits Glucose Autoxidation-Mediated Atherogenic Modification of Low Density Lipoprotein. *FEBS Letters*. 2000;470(1):47–50. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01289-8.
63. Joshi R., Gangabhairathi R., Venu S., Adhikari S., Mukherjee T. Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Reactions of Gentisic Acid: In-Vitro and Pulse Radiolysis Studies. *Free Radical Research*. 2012;46(1):11–20. DOI: 10.3109/10715762.2011.633518.
64. Fendler W. P., Reinhardt S., Ilhan H., Delker A., Böning G., Gildehaus F. J., Stief C., Bartenstein P., Gratzke C., Lehner S., Rominger A. Preliminary Experience with Dosimetry, Response and Patient Reported Outcome after 177Lu-PSMA-617 Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncotarget*. 2017;8(2):3581–3590. DOI: 10.18632/oncotarget.12240.
65. Mathur A., Prashant V., Sakhare N., Chakraborty S., Vimalnath K. V., Mohan R. K., Arjun C., Karkhanis B., Seshan R., Basu S., Korde A., Banerjee S., Dash A., Sachdev S. S. Bulk Scale Formulation of Therapeutic Doses of Clinical Grade Ready-to-Use 177 Lu-DOTA-TATE: The Intricate Radiochemistry Aspects. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2017;32(7):266–273. DOI: 10.1089/cbr.2017.2208.
66. Guleria M., Amirdhanayagam J., Sarma H. D., Rallapeta R. P., Krishnamohan V. S., Nimmagadda A., Ravi P., Patri S., Kalawat T., Das T. Preparation of 177Lu-PSMA-617 in Hospital Radiopharmacy: Convenient Formulation of a Clinical Dose Using a Single-Vial Freeze-Dried PSMA-617 Kit Developed In-House. *BioMed Research International*. 2021;2021:1–12. DOI: 10.1155/2021/1555712.
67. Chakraborty S., Vimalnath K. V., Chakravarty R., Sarma H. D., Dash A. Multidose Formulation of Ready-to-Use 177Lu-PSMA-617 in a Centralized Radiopharmacy Set-Up. *Applied Radiation and Isotopes*. 2018;139:91–97. DOI: 10.1016/j.apradiso.2018.04.033.
68. Bartoli F., Elsinga P., Nazario L. R., Zana A., Galbiati A., Millul J., Migliorini F., Cazzamalli S., Neri D., Slart R. H. J. A., Erba P. A. Automated Radiosynthesis, Preliminary In Vitro/In Vivo Characterization of OncoFAP-Based Radiopharmaceuticals for Cancer Imaging and Therapy. *Pharmaceuticals*. 2022;15(8):958. DOI: 10.3390/ph15080958.
69. Reissig F., Bauer D., Zarschler K., Novy Z., Bendova K., Ludik M. C., Kopka K., Pietzsch H. J., Petrik M., Mamat C. Towards Targeted Alpha Therapy with Actinium-225: Chelators for Mild Condition Radiolabeling and Targeting Psmα—a Proof of Concept Study. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1974. DOI: 10.3390/cancers13081974.
70. Trindade V., Balter H. Oxidant and Antioxidant Effects of Gentisic Acid in a ¹⁷⁷Lu-Labelled Methionine-Containing Minigastrin Analogue. *Current Radiopharmaceuticals*. 2020;13(2):107–119. DOI: 10.2174/1874471012666190916112904.
71. Larenkov A., Mitrofanov I., Pavlenko E., Rakhimov M. Radiolysis-Associated Decrease in Radiochemical Purity of 177Lu-Radiopharmaceuticals and Comparison of the Effectiveness of Selected Quenchers against This Process. *Molecules*. 2023;28(4):1884. DOI: 10.3390/molecules28041884.
72. Hosokawa S., Shukuya K., Sogabe K., Ejima Y., Morinishi T., Hirakawa E., Ohsaki H., Shimosawa T., Tokuhara Y. Novel Absorbance Peak of Gentisic Acid Following the Oxidation Reaction. *PLoS One*. 2020;15(4):e0232263. DOI: 10.1371/journal.pone.0232263.
73. Das T., Guleria M., Parab A., Kale C., Shah H., Sarma H. D., Lele V. R., Banerjee S. Clinical Translation of 177Lu-Labeled PSMA-617: Initial Experience in Prostate Cancer Patients. *Nuclear Medicine and Biology*. 2016;43(5):296–302. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2016.02.002.
74. Privé B. M., Janssen M. J. R., van Oort I. M., Muselaers C. H. J., Jonker M. A., de Groot M., Mehra N., Verzijlbergen J. F., Scheenen T. W. J., Zámečník P., Barents J. O., Gotthardt M., Noordzij W., Vogel W. V., Bergman A. M., van der Poel H. G., Vis A. N., Oprea-Lager D. E., Gerritsen W. R., Witjes J. A., Nagarajah J. Lutetium-177-PSMA-I&T as Metastases Directed Therapy in Oligometastatic Hormone Sensitive Prostate Cancer, a Randomized Controlled Trial. *BMC Cancer*. 2020;20(1):884. DOI: 10.1186/s12885-020-07386-z.
75. Aslani A., Snowden G. M., Bailey D. L., Schembri G. P., Bailey E. A., Pavlakis N., Roach P. J. Lutetium-177 DOTATATE Production with an Automated Radiopharmaceutical Synthesis System. *Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine and Biology*. 2015;3(2):107–115. DOI: 10.7508/aojnmb.2015.02.006.
76. Koumariou E., Mikołajczak R., Pawlak D., Zikos X., Bouziotis P., Garnuszek P., Karczmarczyk U., Maurin M., Archimandritis S. C. Comparative Study on DOTA-Derivatized Bombesin Analog Labeled with 90Y and 177Lu: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Nuclear Medicine and Biology*. 2009;36(6):591–603. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2009.03.006.
77. Liu S., Ellars C. E., Edwards D. S. Ascorbic Acid: Useful as a Buffer Agent and Radiolytic Stabilizer for Metalloradiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry*. 2003;14(5):1052–1056. DOI: 10.1021/bc034109i.
78. Iqbal K., Khan A., Ali M. M., Khattak K. Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health – A Review. *Pakistan J. Nutr*. 2004;3(1):5–13.
79. Njus D., Kelley P. M., Tu Y., Schlegel H. B. Ascorbic Acid: The Chemistry Underlying Its Antioxidant Properties. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020;159:37–43. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013.
80. Mukherjee A., Lohar S., Dash A., Sarma H. D., Samuel G., Korde A. Single Vial Kit Formulation of DOTATATE for Preparation of ¹⁷⁷Lu-Labeled Therapeutic Radiopharmaceutical at Hospital Radiopharmacy. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2015;58(4):166–172. DOI: 10.1002/jlcr.3267.
81. Nanabala R., Sasikumar A., Joy A., Pillai M. Preparation of [¹⁷⁷Lu] PSMA-617 Using Carrier Added (CA) 177Lu for Radionuclide Therapy of Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine & Radiation Therapy*. 2016;7(5). DOI: 10.4172/2155-9619.1000306.
82. Jowanaridhi B., Sriwiang W. Radiolabeling Efficiency and Stability Study on Lutetium-177 Labeled Bombesin Peptide. *Journal of Physics: Conference Series*. 2019;1380(1):012020. DOI: 10.1088/1742-6596/1380/1/012020.
83. Wiecezorek Villas Boas C. A., Pereira Dias L. A., Nakamura Matsuda M. M., Bortoleti de Araújo E. Stability in the Production and Transport of 177Lu Labelled PSMA. *Brazilian Journal of Radiation Sciences*. 2021;9(1). DOI: 10.15392/bjrs.v9i1.1619.
84. Ghosh A., Woolum K., Kothandaraman S., Tweedle M. F., Kumar K. Stability Evaluation and Stabilization of a Gastrin-Releasing Peptide Receptor (GRPR) Targeting Imaging Pharmaceutical. *Molecules*. 2019;24(16):2878. DOI: 10.3390/molecules24162878.
85. Golubitskii G. B., Budko E. V., Basova E. M., Kostarnoi A. V., Ivanov V. M. Stability of Ascorbic Acid in Aqueous and Aqueous-Organic Solutions for Quantitative Determination. *Journal of Analytical Chemistry*. 2007;62(8):742–747. DOI: 10.1134/S1061934807080096/METRICS.
86. Herbig A.-L., Renard C. M. G. C. Factors That Impact the Stability of Vitamin C at Intermediate Temperatures in a Food Matrix. *Food Chemistry*. 2017;220:444–451. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.012.
87. Yin X., Chen K., Cheng H., Chen X., Feng S., Song Y., Liang L. Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology. *Antioxidants*. 2022;11(1):153. DOI: 10.3390/ANTIOX11010153.
88. Martin S., Tönnesmann R., Hierlmeier I., Maus S., Rosar F., Ruf J., Holland J. P., Ezziddin S., Bartholomä M. D. Identification, Characterization, and Suppression of Side Products Formed during the Synthesis of [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;64(8):4960–4971. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00045.

89. Scott P. J. H., Kilbourn M. R. Determination of Residual Kryptonfix 2.2.2 Levels in [18F]-Labeled Radiopharmaceuticals for Human Use. *Applied Radiation and Isotopes*. 2007;65(12):1359–1362. DOI: 10.1016/j.apradiso.2007.04.020.
90. Mock B. H., Winkle W., Vavrek M. T. A Color Spot Test for the Detection of Kryptonfix 2.2.2 in [18F]FDG Preparations. *Nuclear Medicine and Biology*. 1997;24(2):193–195. DOI: 10.1016/S0969-8051(96)00212-0.
91. Breeman W. A. P. Practical Aspects of Labeling DTPA-and DO-TA-Peptides with 90Y, 111In, 177Lu, 68Ga for Peptide-Receptor Scintigraphy and Peptide-Receptor Radionuclide Therapy in Preclinical and Clinical Applications. In: *University of New Mexico Health Sciences Center, College of Pharmacy*. 2012. Vol. 16. P. 1–34.
92. De Blois E., Chan H. S., de Zanger R., Konijnenberg M., Breeman W. A. P. Application of Single-Vial Ready-for-Use Formulation of 111In- or 177Lu-Labelled Somatostatin Analogs. *Applied Radiation and Isotopes*. 2014;85:28–33. DOI: 10.1016/j.apradiso.2013.10.023.
93. Di Iorio V., Boschi S., Cuni C., Monti M., Severi S., Paganelli G., Masini C. Production and Quality Control of [177Lu]Lu-PSMA-I&T: Development of an Investigational Medicinal Product Dossier for Clinical Trials. *Molecules*. 2022;27(13):4143. DOI: 10.3390/molecules27134143.
94. Masłowska K., Witkowska E., Tymecka D., Halik P. K., Misicka A., Gniazdowska E. Synthesis, Physicochemical and Biological Study of Gallium-68-and Lutetium-177-Labeled VEGF-A165/NRP-1 Complex Inhibitors Based on Peptide A7R and Branched Peptidomimetic. *Pharmaceutics*. 2022;14(1):100. DOI: 10.3390/pharmaceutics14010100.
95. Chen J., Linder K. E., Cagnolini A., Metcalfe E., Raju N., Tweedle M. F., Swenson R. E. Synthesis, Stabilization and Formulation of [177Lu]Lu-AMBA, a Systemic Radiotherapeutic Agent for Gastrin Releasing Peptide Receptor Positive Tumors. *Applied Radiation and Isotopes*. 2008;66(4):497–505. DOI: 10.1016/j.apradiso.2007.11.007.
96. Yamagata S., Iwama T. Determination of a Small Quantity of Cystine in the Presence of a Large Amount of Cysteine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1999;63(8):1503–1505. DOI: 10.1271/BBB.63.1503.
97. Dewey D. L., Beecher J. Interconversion of Cystine and Cysteine Induced by X-Rays. *Nature*. 1965;206(4991):1369–1370. DOI: 10.1038/2061369a0.
98. Larenkov A. A., Mitrofanov Y. A., Rakhimov M. G. Features and Practical Aspects of Radiochemical Purity Determination of Receptor-Specific Lu-177 Radiopharmaceuticals as Exemplified by [177Lu]Lu-PSMA-617. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(4):455–467. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-4-455-467.
99. De Blois E., de Zanger R. M. S., Chan H. S., Konijnenberg M., Breeman W. A. P. Radiochemical and Analytical Aspects of Inter-Institutional Quality Control Measurements on Radiopharmaceuticals. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. 2019;4(1):3. DOI: 10.1186/s41181-018-0052-1.
100. De Blois E., Sze Chan H., Konijnenberg M., de Zanger R., Breeman W. A. P. Effectiveness of Quenchers to Reduce Radiolysis of 111In- or 177Lu-Labelled Methionine-Containing Regulatory Peptides. Maintaining Radiochemical Purity as Measured by HPLC. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2013;12(23):2677–2685. DOI: 10.2174/1568026611212230005.
101. Mitrofanov Y. A., Bubenshchikov V. B., Belousov A. V., Lunev A. S., Larenkov A. A. Evaluation of the Applicability of External X-Ray Radiation to Simulate the Autoradiolysis Processes in Therapeutic Radiopharmaceuticals (Exemplified by [153Sm]Sm-PSMA-617 and [177Lu]Lu-PSMA-617). *High Energy Chemistry*. 2023;57(1):18–27. DOI: 10.1134/S0018143923010095.
102. Buxton G. V., Greenstock C. L., Helman W. P., Ross A. B. Critical Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals (·OH/·O– in Aqueous Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1988;17(2):513–886. DOI: 10.1063/1.555805.
103. Anbar M., Neta P. A Compilation of Specific Bimolecular Rate Constants for the Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals with Inorganic and Organic Compounds in Aqueous Solution. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 1967;18(7):493–523. DOI: 10.1016/0020-708X(67)90115-9.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1581>
УДК 615.322



Оригинальная статья / Research article

Каллусная культура аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.): получение, подбор условий культивирования, индукция соматического эмбриогенеза

Д. А. Некрасова✉, М. Н. Повыдыш, Н. С. Пивоварова, К. О. Сидоров

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Некрасова Дарья Алексеевна. E-mail: nekrasova.darya@pharminnotech.com

ORCID: Д. А. Некрасова – <https://orcid.org/0000-0002-0028-9727>; М. Н. Повыдыш – <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>;
Н. С. Пивоварова – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>.

Статья поступила: 27.06.2023

Статья принята в печать: 21.09.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Клеточные технологии широко распространены в различных областях биологии, биотехнологии и сельского хозяйства. Аралия сердцевидная (*Aralia cordata* Thunb.) – многолетнее травянистое растение, внесенное в Красную книгу Российской Федерации. Препараты на основе сырья аралии обладают ценными видами фармакологической активности и широко используются в восточной медицине. Серьезным препятствием для возобновления естественных популяций является наличие у семян растения периода морфофизиологического покоя. Ограниченность природного ареала и выраженная биологическая активность делает аралию сердцевидную перспективным объектом для введения в культуру *in vitro*.

Цель. Целью работы являлось получение жизнеспособной каллусной культуры аралии сердцевидной, изучение условий индукции соматического эмбриогенеза.

Материалы и методы. В качестве первичного экспланта были использованы части листа растения, культивируемого в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН. Части листа стерилизовали в 2%-м растворе бензалкония хлорида в течение 5 минут, индукцию каллусогенеза осуществляли на среде Мурасиге – Скуга. С целью длительного пассивирования были изучены среды различного состава. Индукцию соматического эмбриогенеза проводили на средах с высоким содержанием ауксинов. Спиртовые извлечения из интактного растения и каллусных культур анализировали методом ВЭТСХ с использованием системы HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Швейцария).

Результаты и обсуждение. Спустя две недели культивирования на поверхности эксплантов наблюдали образование первичного каллуса. Наиболее подходящей средой для длительного поддержания культур была признана среда Линсмайера – Скуга с уменьшенным количеством сахарозы (20 г/л). Были получены эмбриоидные структуры аралии сердцевидной. Качественный анализ извлечений показал, что каллусные культуры накапливают тритерпеновые гликозиды, их состав приближен к таковому у интактного растения.

Заключение. Был получен жизнеспособный штамм каллусной культуры аралии сердцевидной, установлена питательная среда для длительного культивирования культур. Были получены соматические эмбриоиды. Предварительное фитохимическое исследование показало, что состав химических компонентов каллусов приближен к составу интактного растения.

Ключевые слова: аралиевые, аралия сердцевидная, каллус, культуры *in vitro*, соматический эмбриогенез

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

Вклад авторов. Д. А. Некрасова, М. Н. Повыдыш, Н. С. Пивоварова, К. О. Сидоров осуществили постановку цели исследования, выполнили экспериментальную часть, провели обсуждение результатов и написание статьи.

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

Для цитирования: Некрасова Д. А., Повыдыш М. Н., Пивоварова Н. С., Сидоров К. О. Каллусная культура аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.): получение, подбор условий культивирования, индукция соматического эмбриогенеза. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):40–45. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1581>

Callus Culture of *Aralia cordata* Thunb.: Obtaining, Selection of Cultivating Conditions, Somatic Embryogenesis Induction

Daria A. Nekrasova✉, Maria N. Povydysh, Nadezhda S. Pivovarova, Kirill O. Sidorov

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

✉ Corresponding author: Daria A. Nekrasova. E-mail: nekrasova.darya@pharminnotech.com

ORCID: Daria A. Nekrasova – <https://orcid.org/0000-0002-0028-9727>; Maria N. Povydysh – <https://orcid.org/0000-0002-7768-9059>;
Nadezhda S. Pivovarova – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>.

Received: 27.06.2023

Revised: 21.09.2023

Published: 24.11.2023

© Некрасова Д. А., Повыдыш М. Н., Пивоварова Н. С., Сидоров К. О., 2023

© Nekrasova D. A., Povydysh M. N., Pivovarova N. S., Sidorov K. O., 2023

Abstract

Introduction. Cell cultures spreads widely in different areas of biology, biotechnology and agriculture. *Aralia cordata* is a perennial herbaceous plant, which has been listed in Red book of the Russian Federation. Pharmaceuticals which are based on raw materials of *Aralia* ssp. have valuable types of pharmacological activity and are widely used in oriental medicine. A serious obstacle for resumption of the natural populations is the presence of the period of morphophysiological dormancy in the seeds of the plants, which requires a long-time stratification process. Limitation of the natural geographic range and the combination of biological activities useful for humans make *Aralia cordata* Thunb. prospective object for *in vitro* introduction.

Aim. The aim of the study is obtaining of the viable cell culture of *Aralia cordata* Thunb., investigation of the somatic embryogenesis conditions.

Materials and methods. Pieces of the leaves of *Aralia cordata* intact plant from Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences were used as a primary explants. Pieces of leaves were sterilized in a 2 % benzalkonium chloride solution for 5 minutes, induction of primary callogenesis was carried out on Murasige – Skoog medium. Nutrient media with different constituents were discovered for choosing one for long-time cultivation of calli. Induction of somatic embryogenesis was carried out on the nutrient media with high auxins content. Ethanol extracts from the intact plant and calli cultures were assayed with HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Switzerland).

Results and discussion. After two weeks of cultivation, the formation of primary callus was observed on the surface of the explants. The Linsmaier – Skoog medium with a reduced amount of sucrose (20 g/l) was recognized as the most suitable medium for long-term maintenance of cultures. Embryoid structures of *Aralia cordata* have been obtained, now we are continuing to collect analytics data about this process. Qualitative analysis of the extracts showed that callus cultures accumulate triterpene glycosides, their composition is close to that of the intact plant.

Conclusion. A viable strain of callus culture of *Aralia cordata* Thunb. was obtained, a nutrient medium for long-term cultivation of calli was established. Somatic embryoids have been obtained, and their further development is currently being monitored. A preliminary phytochemical study showed that the composition of the chemical components of calli is close to that of an intact plant.

Keywords: ginseng family, *Aralia cordata*, callus, *in vitro* culture, somatic embryogenesis

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. Daria A. Nekrasova, Maria N. Povydysh, Nadezhda S. Pivovarova, Kirill O. Sidorov carried out the statement of the problem, implementation of the experiment, processing of obtained data, discussion of the results, and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the 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: Nekrasova D. A., Povydysh M. N., Pivovarova N. S., Sidorov K. O. Callus culture of *Aralia cordata* Thunb.: obtaining, selection of cultivating conditions, somatic embryogenesis induction. *Drug development & registration*. 2023;12(4):40–45. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1581>

ВВЕДЕНИЕ

Культуры растительных клеток находят большое применение в различных областях биологии, биотехнологии и сельского хозяйства: с их помощью получают новые устойчивые сорта культурных растений, изучаются особенности пролиферации и дифференцировки растительных организмов, условия их адаптации к окружающей среде, а также закономерности накопления вторичных метаболитов [1].

Перспективным объектом для введения в культуру *in vitro* является аралия сердцевидная (*Aralia cordata* Thunb.) – растение, внесенное в Красную книгу России [2]. Вторичные метаболиты, входящие в состав сырья аралии, оказывают антибактериальное [3], гиполипидемическое [4], обезболивающее [5], противовоспалительное [6], адаптогенное [7] и др. [8] действие.

Возобновление природных популяций аралии сердцевидной затруднено в связи с наличием у растений периода морфофизиологического покоя, однако применение клеточных технологий [9], в частности соматического эмбриогенеза, позволяет решить эту проблему [10]. Сущность соматического эмбриогенеза заключается в образовании биполярных телец, способных давать начало как корню, так и побегу будущего растения. В связи с ограниченным ареалом, трудоемкостью культивирования и наличием ценных видов биологической активности получение сырья аралии сердцевидной с использованием фитобиотехнологических методов является актуальной задачей [11].

Целью исследования являлось получение жизнеспособной каллусной культуры аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) и последующее изучение условий индукции соматического эмбриогенеза.

МАТЕРИАЛЫ

Первичными эксплантами для введения аралии сердцевидной в культуру *in vitro* служили части листа интактного растения, произрастающего на территории Ботанического института имени В. Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН).

Бензалкония хлорид (CAS № 63449-41-2, ООО «ВитаРеактив», Россия), твин-80 (CAS № 9005-65-6, АО «ЛенРеактив», Россия), этанол медицинский 95%-й (ООО «РОСБИО», Россия), калий азотнокислый (CAS № 7757-79-1, АО «ВЕКТОН», Россия), аммоний азотнокислый (CAS № 6484-52-2, АО «ВЕКТОН», Россия), аммоний сернокислый (CAS № 7783-20-2, АО «ЛенРеактив», Россия), калий фосфорнокислый 1-замещенный (CAS № 7778-77-0, АО «ВЕКТОН», Россия), магний сернокислый, 7-водный (CAS № 10034-99-8, АО «ВЕКТОН», Россия), кальций хлористый, 2-водный (CAS № 10035-04-8, АО «ВЕКТОН», Россия), натрий молибденовокислый, 2-водный (CAS № 10102-40-6, АО «ВЕКТОН», Россия), медь сернокислая(II), 5-водная (CAS № 7758-99-8, АО «ВЕКТОН», Россия), борная кислота (CAS № 10043-35-3, АО «ВЕКТОН», Россия), марганец сернокислый(II), 5-водный (CAS № 15244-36-7, АО «ВЕКТОН», Россия), цинк сернокислый, 7-водный (CAS № 7446-20-0, АО «ВЕКТОН», Россия), калий сернокислый (CAS № 7778-80-5, АО «ВЕКТОН», Россия), калий йодистый (CAS № 7681-11-0, АО «ВЕКТОН», Россия), кобальт хлористый без никеля(II), 6-водный (АО «ВЕКТОН», Россия), железо сернокислое(II), безводное (АО «ВЕКТОН», Россия), трилон Б (CAS № 6381-92-6, АО «ВЕКТОН», Россия), тиамин гидрохлорид (CAS № 67-03-8, Merck KGaA, Германия), пиридоксин (CAS № 65-23-6, Merck KGaA, Германия), никотиновая кислота (CAS № 59-67-6, АО «ВЕКТОН», Россия), аминокислотная кислота (CAS № 56-40-6, АО «ВЕКТОН», Россия), мезоинозит (CAS № 87-89-8, Merck KGaA, Германия), сахароза (CAS № 57-50-1, АО «ВЕКТОН», Россия), агар-агар (ГОСТ 17206-96, ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», Россия), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) (CAS № 94-75-7, Merck KGaA, Германия), индолил-3-масляная кислота (ИМК) (CAS № 133-32-4, Duchefa Biochemie, Нидерланды), кинетин (CAS № 525-79-1, Merck KGaA, Германия), этилацетат (CAS № 141-78-6, АО «ВЕКТОН», Россия), хлороформ (CAS № 67-66-3, АО «ВЕКТОН», Россия), карбинол (CAS № 67-56-1, АО «ВЕКТОН», Россия), α-нафтилуксусная кислота (НУК) (CAS № 86-87-3, Shijiazhuang Lemandou Chemicals Co., Ltd., Китай), 6-бензиламинопурин (6-БАП) (CAS № 1214-39-7, Duchefa Biochemie, Нидерланды), кислота серная концентрированная (CAS № 7664-93-9, АО «ВЕКТОН», Россия).

МЕТОДЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Подготовка экспланта

Сбор растительного материала проводился с соблюдением принципов биологической этики. Предварительную стерилизацию эксплантов осуществля-

ли 2%-м раствором бензалкония хлорида в твин-80. Части листа помещали в раствор на 5 минут, затем трехкратно промывали в воде очищенной, выдерживая по 15 минут.

Получение первичного каллуса

Первичный каллус получали на среде Мурасиге – Скуга (MS) с добавлением 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина.

Питательную среду готовили из маточных растворов макро (калий азотнокислый, аммоний азотнокислый, калий фосфорнокислый 1-замещенный, магний сернокислый, 7-водный, кальций хлористый, 2-водный) и микросолей (натрий молибденовокислый, 2-водный, медь сернокислая(II), 5-водная, борная кислота, марганец сернокислый(II), 5-водный, цинк сернокислый, 7-водный, калий йодистый, кобальт хлористый без никеля(II), 6-водный), а также хелата железа (железо сернокислое(II), безводное, трилон Б) [12]. Порошкообразные компоненты среды (сахароза, мезоинозит, агар-агар) отвешивали на весах лабораторных электронных SE224C (ООО «Сартогосм»). Контроль pH среды осуществляли с помощью pH-метра лабораторного PB-11-P11 (ООО «Сартогосм»).

В условиях ламинарного шкафа ЛШ-Биоком-1 (ООО «Компания «БИОКОМ», Россия) листовые пластинки рассекали стерильным скальпелем (эксплант длиной 0,5–1 см, шириной 1 см) и помещали на питательную среду. Культивирование осуществляли на протяжении 2 пассажей в темноте при температуре 27–28 °С и поддержании влажности на уровне 60–70 %.

Подбор питательной среды для длительного культивирования каллусных культур

Следующим этапом исследования являлось установление оптимального состава питательной среды для длительного пассивирования каллусных культур аралии сердцевидной. Для этих целей нами были рассмотрены среды разных составов (таблица 1).

Индукция соматического эмбриогенеза

Для получения эмбриогенного каллуса части каллусной культуры аралии переносили на питательные среды, содержащие высокие концентрации ауксинов (таблица 2), и культивировали в течение двух недель [13, 14], а затем пересаживали на питательную среду WPM без добавления фитогормонов и переносили в световую комнату.

Эмбриогенные каллусы культивировали при температуре 23–26 °С и относительной влажности воздуха 65–70 % в течение тридцати дней при 16-часовом освещении фитолампами.

Таблица 1. Питательные среды для поддержания культур аралии сердцевидной

Table 1. Nutrient media for maintaining *Aralia cordata* culture

Название Name	Концентрация фитогормонов Concentration of phytohormones
MS	2 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л кинетин 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin
	1 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л НУК 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l NAA
	6 мг/л НУК + 1 мг/л кинетин 6 mg/l NAA + 1 mg/l kinetin
BT	0,5 мг/л кин + 0,5 мг/л 6-БАП 0.5 mg/l kin + 0.5 mg/l 6-BAP
WPM	2 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л кинетин 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin
LS	1 мг/л 2,4-Д + 0,25 мг/л кинетин 1 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l kinetin

Примечание. * MS – Мурасиге – Скуга; BT – broad leaf tree medium; WPM – woody plant media; LS – Линсмайера – Скуга; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; 6-БАП – 6-бензиламинопурин; НУК – α -нафтилуксусная кислота.

Note. * MS – Murasige – Skoog medium; BT – broad leaf medium; WPM – woody plant medium; LS – Linsmaier – Skoog medium; 2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 6-BAP – 6-benzylaminopurine; NAA – α -naphthaleneacetic acid.

Таблица 2. Питательные среды для индукции соматического эмбриогенеза

Table 2. Nutrient media for somatic embryogenesis induction

Название Name	Концентрация фитогормонов Concentration of phytohormones
SH	3 мг/л ИМК
MS	1 мг/л 2,4-Д

Примечание. * SH – среда Шенка – Хильдебрандта; MS – Мурасиге – Скуга; ИМК – индолил-3-масляная кислота; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.

Note. * SH – Schenk – Hildebrand medium; MS – Murasige – Skoog medium; IBA – Indole-3-butyric acid; 2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)

ВЭТСХ проводили с использованием оборудования HPTLC PRO SYSTEM (CAMAG AG, Швейцария) в системе растворителей этилацетат:метанол:вода:хлороформ (15:40:22:9). Образцами для исследования являлись спиртовые вытяжки из каллусных культур (10:1), полученные мацерацией в течение 24 часов.

Изображение хроматограмм получали с помощью CAMAG® TLC Visualize 2 (CAMAG AG, Швейцария). Детекцию пятен осуществляли в видимом свете после обработки пластины раствором серной кислоты в метаноле (1:10).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После двух недель культивирования на поверхности эксплантов наблюдалось образование первично-го каллуса. Визуально каллус представлял собой слой

желтовато-белых дедифференцированных клеток, находящихся в непрерывном делении.

Первичный каллус культивировали на среде MS с добавлением 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина в течение двух пассажей, затем части каллуса пересаживали на питательные среды различного состава (см. таблицу 1). Было установлено, что оптимальной средой для длительного пассивирования культур аралии сердцевидной является среда Линсмайера – Скуга (LS) со сниженной концентрацией сахарозы (20 г/л) и добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л кинетина. Она обеспечивала наилучший рост культуры без участков некротизации и гипергидрации (таблица 3).

Таблица 3. Аналитические параметры роста каллусной культуры аралии сердцевидной на среде Линсмайера – Скуга (LS) (приведены среднеарифметические значения результатов пяти определений, имеющих отклонение не более 5 %)

Table 3. Analytical parameters of growth of *Aralia cordata* callus culture on LS medium (the arithmetic mean values of the results of three determinations with a deviation of no more than 5 % are given)

Фаза роста Growth phase	Сутки роста Days of growth	Удельная скорость роста (сут ⁻¹) Specific growth rate (day ⁻¹)	Время удвоения биомассы (сут) Biomass doubling time (day)	Индекс роста Growth index
Латентная Latent	0	0	–	0
Ускорения роста Accelerating growth	2	0,47	1,93	11,10
	4	0,31	3,03	18,48
Экспоненциального роста Exponential growth	9	0,18	4,28	22,82
	11	0,14	5,39	25,27
	13	0,12	6,46	26,02
Замедленного роста Slow growth	19	0,10	7,58	26,86
	22	0,07	10,17	24,89
Стационарная Stationary	30	0,03	23,10	22,03

Результаты показывают, что наибольшая удельная скорость роста была отмечена на фазе ускорения роста (0,47 сут⁻¹), а затем она начала закономерно уменьшаться. За один цикл культивирования количество биомассы увеличилось в 22,03 раза.

В процессе культивирования каллус становился менее плотным, приобретал выраженный желтый оттенок. Процесс визуально представлен на рисунке 1.

Каллусы, культивируемые на питательных средах с высоким содержанием ауксинов, после пересадки на WPM видоизменялись, формировали бесцветные выросты, которые затем зеленели – образовывались эмбриониды (рисунок 2).

В настоящее время проводятся дополнительные наблюдения за ростом и развитием полученных структур.

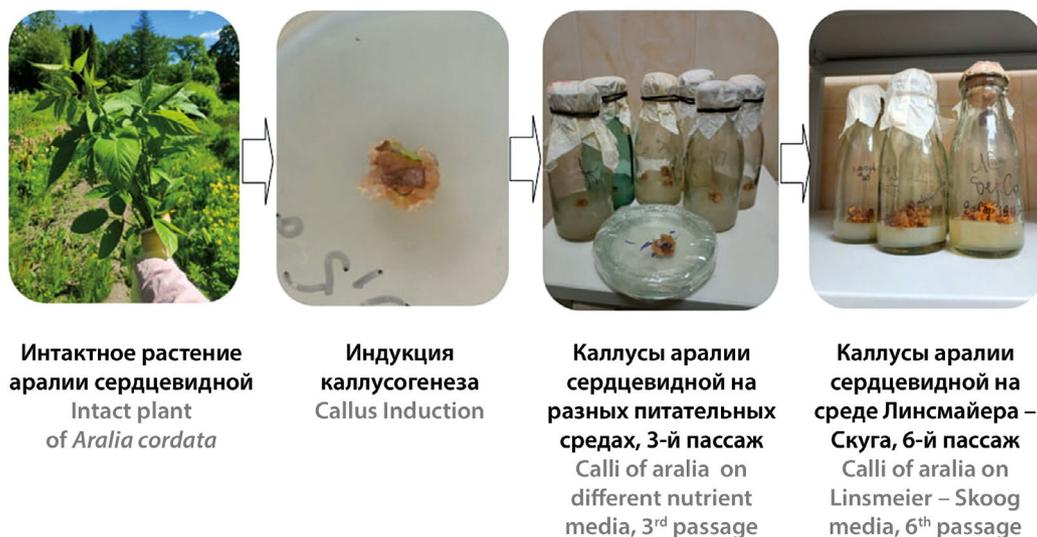


Рисунок 1. Визуализация введения аралии сердцевидной в культуру *in vitro*

Figure 1. Visualisation of the introduction of *Aralia cordata* into culture



Рисунок 2. Образование эмбриоидов из каллуса аралии

Figure 2. Somatic embryos formation from aralia calli

Анализ извлечений из каллусных культур методом ВЭТСХ позволил обнаружить как минимум 5 соединений ($R_f = 0,15; 0,22; 0,38; 0,43; 0,64$), характерных для всех исследуемых объектов, 2 вещества ($R_f = 0,57; 0,89$), свойственных как листьям аралии, так и каллусным культурам (рисунок 3). Также было показано, что химический состав каллусов с течением времени сохраняет свое постоянство.

Данные стандартных протоколов используемого хроматографа позволяют предположить, что все обнаруженные соединения относятся к классу тритерпеновых гликозидов¹.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило получить жизнеспособные культуры аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.). Было установлено, что индук-

¹Methods for identification of herbals. Available at: https://www.hptlc-association.org/methods/methods_for_identification_of_herbals.cfm. Accessed: 13.01.2023.

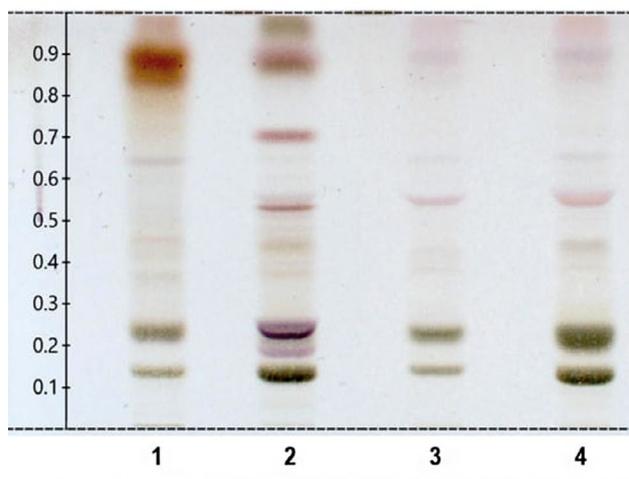
цию каллусогенеза целесообразно проводить с использованием среды MS + 0,5 мг/л 2,4 Д + 0,5 мг/л кинетина. Для длительного пассивирования культур наиболее оптимальной является среда Линсмайера – Скуга (LS) с добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л кинетина и пониженной концентрацией сахара (20 г/л).

Кроме того, в ходе исследования успешно проведена индукция соматического эмбриогенеза, последующее наблюдение и установление аналитических характеристик полученных эмбриоидов является актуальной задачей.

Предварительное фитохимическое исследование методом ВЭТСХ позволило установить, что химический состав каллуса сохраняет свое постоянство, а также в целом приближен к таковому у интактного растения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Носов А. М. Биотехнология растений и перспективы ее развития. *Физиология растений и генетика*. 2014;46(1):3–18.
2. Шустов М. В., Швецов А. Н., Ершова А. А., Джанаева В. В. Растения, занесенные в Красную книгу России, в экспозиции флоры Дальнего Востока ГБС РАН. *Биологическое разнообразие и интродукция растений*. 2021;1:242–246. DOI: 10.24412/cl-36598-2021-1-242-246.
3. Jeong S.-I., Yun Y.-H., Kim S.-M., Yoon K.-H., Kim K.-J. Antimicrobial activity of continentalic acid from *Aralia cordata* against *Enterococcus* strains. *International Journal of Oral Biology*. 2008;33(4):213–216.
4. Kim M. O., Lee S. H., Seo J. H., Kim I. S., Han A. R., Moon D. O., Cho S., Cui L., Kim J., Lee H. S. *Aralia cordata* Inhibits Triacylglycerol Biosynthesis in HepG2 Cells. *Journal of Medicinal Food*. 2013;16(12):1108–1114. DOI: 10.1089/jmf.2012.2636.
5. Okuyama E., Nishimura S., Yamazaki M. Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1991;39(2):405–407.
6. Kim T. D., Lee J. Y., Cho B. J., Park T. W., Kim C. J. The analgesic and anti-inflammatory effects of 7-oxosandaracopimaric acid isolated from the roots of *Aralia cordata*. *Archives of Pharmacol Research*. 2010;33(4):509–514. DOI: 10.1007/s12272-010-0403-2.



1. Корень аралии сердцевидной.
1. *Aralia cordate* root.
2. Лист аралии сердцевидной.
2. *Aralia cordate* leaf.
3. Каллус аралии сердцевидной,
сентябрь 2022 г.
3. *Aralia cordate* callus, September 2022
4. Каллус аралии сердцевидной,
ноябрь 2022 г.
4. *Aralia cordate* callus, November 2022

Система: этилацетат – метанол – вода – хлороформ в соотношении (15 : 40 : 22: 9)
System: ethyl acetate – methanol – water – chloroform in the ratio (15:40:22:9)

Рисунок 3. Хроматограмма ВЭТСХ-анализа спиртовых извлечений (96 %)

Figure 3. HPTLC profile of ethanol extracts (96 %)

7. Clement J. A., Clement E. The medicinal chemistry of genus *Aralia*. *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(24):2783–2801. DOI: 10.2174/1568026615666141208110021.
8. Xu Y., Liu J., Zeng Y., Jin S., Liu W., Li Z., Qin X., Bai Y. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicity and quality control of medicinal genus *Aralia*: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022;284:114671. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114671.
9. Шмарова А. А., Пивоварова Н. С., Абросимова О. Н. Риск-ориентированный подход при получении и анализе свойств суспензионных культур клеток шлемника байкальского. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):47–56. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56.
10. Ветчинкина Е. М., Ширнина И. В., Ширнин С. Ю., Молканова О. И. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro*. *Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки*. 2012;7:109–118.
11. Некрасова Д. А., Пovyдыш М. Н., Пивоварова Н. С., Гончаров М. Ю. Перспективы получения и исследования клеточных культур видов рода аралия (*Aralia* spp.). *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2022;4(38):55–72. DOI: 10.34907/JPQAI.2022.94.43.008.
12. Пивоварова Н. С., Шебитченко Т. С., Абросимова О. Н. Получение каллусной культуры шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.) и ее характеристика. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4): 40–46. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-40-46.
13. Lee K.-S., Lee J.-C., Soh W.-Y. High frequency plant regeneration from *Aralia cordata* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2002;68:241–246. DOI: 10.1023/A:1013989707725.
14. Dai J.-L., Tan X., Zhan Y.-G., Zhang Y.-Q., Xiao S., Gao Y., Xu D.-W., Wang T., Wang X.-C., You X.-L. Rapid and repetitive plant regeneration of *Aralia elata* Seem. via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2011;104(1):125–130. DOI: 10.1007/s11240-010-9801-x.
3. Jeong S.-I., Yun Y.-H., Kim, S.-M., Yoon K.-H., Kim K.-J. Antimicrobial activity of continentalic acid from *Aralia cordata* against *Enterococcus* strains. *International Journal of Oral Biology*. 2008;33(4):213–216.
4. Kim M. O., Lee S. H., Seo J. H., Kim I. S., Han A. R., Moon D. O., Cho S., Cui L., Kim J., Lee H. S. *Aralia cordata* Inhibits Triacylglycerol Biosynthesis in HepG2 Cells. *Journal of Medicinal Food*. 2013;16(12):1108–1114. DOI: 10.1089/jmf.2012.2636.
5. Okuyama E., Nishimura S., Yamazaki M. Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1991;39(2):405–407.
6. Kim T. D., Lee J. Y., Cho B. J., Park T. W., Kim C. J. The analgesic and anti-inflammatory effects of 7-oxosandaracopimaric acid isolated from the roots of *Aralia cordata*. *Archives of Pharmacological Research*. 2010;33(4):509–514. DOI: 10.1007/s12272-010-0403-2.
7. Clement J. A., Clement E. The medicinal chemistry of genus *Aralia*. *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(24):2783–2801. DOI: 10.2174/1568026615666141208110021.
8. Xu Y., Liu J., Zeng Y., Jin S., Liu W., Li Z., Qin X., Bai Y. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicity and quality control of medicinal genus *Aralia*: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022;284:114671. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114671.
9. Shmarova A. A., Pivovarova N. S., Abrosimova O. N. Risk-based Approach in Obtaining and Analysing the Characteristics of Baikal Skullcap Suspension Cultures. *Drug development & registration*. 2022;11(3):47–56. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-47-56
10. Vetchinkina E. M., Shirnina I. V., Shirnin S. Yu., Molkanova O. I. Conservation of rare plant species in genetic collections *in vitro*. *Vestnik Baltijskogo federal'nogo universiteta im. I. Kanta. Seriya: Estestvennye i meditsinskie nauki*. 2012;7:109–118. (In Russ.)
11. Nekrasova D. A., Povydysh M. N., Pivovarova N. S., Goncharov M. Yu. Prospects of obtaining and investigation of cell culture of *Aralia* spp. *Journal of Pharmaceuticals Quality Assurance Issues*. 2022;4(38):55–72. (In Russ.) DOI: 10.34907/JPQAI.2022.94.43.008.
12. Pivovarova N. S., Shebitchenko T. S., Abrosimova O. N. Obtaining Callus Culture of Sage Medicinal (*Salvia officinalis* L.) and its Characteristics. *Drug development & registration*. 2022;11(4):40–46. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-40-46.
13. Lee K.-S., Lee J.-C., Soh W.-Y. High frequency plant regeneration from *Aralia cordata* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2002;68:241–246. DOI: 10.1023/A:1013989707725.
14. Dai J.-L., Tan X., Zhan Y.-G., Zhang Y.-Q., Xiao S., Gao Y., Xu D.-W., Wang T., Wang X.-C., You X.-L. Rapid and repetitive plant regeneration of *Aralia elata* Seem. via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2011;104(1):125–130. DOI: 10.1007/s11240-010-9801-x.

REFERENCES

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1586>
УДК 615.451.16; 66.061



Оригинальная статья / Research article

Применение термодинамических моделей для прогнозирования растворимости биологически активных веществ

К. С. Степанов✉, Г. Н. Турманидзе, В. В. Сорокин, А. Д. Сахаров

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Степанов Константин Сергеевич. E-mail: stepanov.konstantin@pharminnotech.com

ORCID: К. С. Степанов – <https://orcid.org/0009-0000-5479-5257>; Г. Н. Турманидзе – <https://orcid.org/0000-0001-5121-2343>;
В. В. Сорокин – <https://orcid.org/0000-0002-7262-0941>; А. Д. Сахаров – <https://orcid.org/0009-0008-0098-7163>.

Статья поступила: 27.06.2023

Статья принята в печать: 06.10.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Выбор растворителей для процессов извлечения биологически активных веществ из природного сырья, процессов очистки природных и синтезированных субстанций методами экстракции, кристаллизации и растворения является важной проблемой современной фармацевтической промышленности, поскольку для определения оптимального растворителя или смеси растворителей необходимо выполнить большое количество экспериментов. Чтобы снизить затраты на разработку и оптимизацию стадий извлечения и очистки веществ, предложено использовать термодинамические модели на этапе предварительной оценки растворимости. В статье исследуется вопрос прогнозирования растворимости фармацевтических веществ на примере технологии выделения гесперидина и глицирризиновой кислоты из растительного сырья.

Цель. Теоретическое определение растворяющей способности различных растворителей по отношению к гесперидину и глицирризиновой кислоте.

Материалы и методы. Для прогнозирования растворимости использованы термодинамические модели PMUNIFAC и NRTL-SAC. Расчет растворимости по модели NRTL-SAC выполнен с помощью программного обеспечения «Aspen Properties V14», а по модели PMUNIFAC – с помощью «PTC Mathcad Prime V6». Для оценки результатов, полученных с использованием термодинамических моделей, проводили ряд экспериментов, объектом для которых служила кожура апельсина (высушенные флаведо и альbedo, степень измельчения 0,2–0,5 мм, влажность 8 %). Количественное содержание гесперидина определяли методом прямой спектрофотометрии при длине волны 290 нм. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Minitab v20 (Minitab Inc., США), различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На основе термодинамических моделей выполнен прогноз растворимости гесперидина и глицирризиновой кислоты. Показано, что оценку растворимости возможно производить как при наличии данных о растворимости по модели NRTL-SAC, так и при их полном отсутствии по модели PMUNIFAC. Соответствие теоретически рассчитанных данных экспериментальным подтверждает правильность расчетов термодинамических моделей. Результаты расчетов оценены, и рекомендованы растворители, которые могут быть использованы в технологии выделения гесперидина и глицирризиновой кислоты для стадий обезжиривания, экстракции и кристаллизации с антирастворителем.

Заключение. С помощью термодинамических моделей NRTL-SAC и PMUNIFAC определена растворяющая способность различных растворителей по отношению к гесперидину и глицирризиновой кислоте. По результатам расчетов построен список растворителей, ранжированный по растворимости в них изучаемых веществ. Полученный список может использоваться при разработке промышленной технологии извлечения и очистки гесперидина и глицирризиновой кислоты. Показано, что модели NRTL-SAC и PMUNIFAC имеют хорошие перспективы для количественного прогнозирования растворимости активных веществ.

Ключевые слова: NRTL-SAC, PMUNIFAC, термодинамическое моделирование, растворимость, прогнозирование, гесперидин, глицирризиновая кислота

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

Вклад авторов. К. С. Степанов, Г. Н. Турманидзе под руководством В. В. Сорокина разработали подходы к прогнозированию растворимости веществ на основе термодинамических моделей и провели ряд опытов для подтверждения расчетов, полученных с использованием моделей. В. В. Сорокин, К. С. Степанов, Г. Н. Турманидзе, А. Д. Сахаров участвовали в обработке данных и в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

Для цитирования: Степанов К. С., Турманидзе Г. Н., Сорокин В. В., Сахаров А. Д. Применение термодинамических моделей для прогнозирования растворимости биологически активных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):46–53. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1586>

© Степанов К. С., Турманидзе Г. Н., Сорокин В. В., Сахаров А. Д., 2023

© Stepanov K. S., Turmanidze G. N., Sorokin V. V., Sakharov A. D., 2023

Application of Thermodynamic Models to Predict the Solubility of Biologically Active Substances

Konstantin S. Stepanov✉, Georgii N. Turmanidze, Vladislav V. Sorokin, Artem D. Sakharov

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

✉ Corresponding author: Konstantin S. Stepanov. E-mail: stepanov.konstantin@pharminnotech.com

ORCID: Konstantin S. Stepanov – <https://orcid.org/0009-0000-5479-5257>; Georgii N. Turmanidze – <https://orcid.org/0000-0001-5121-2343>;
Vladislav V. Sorokin – <https://orcid.org/0000-0002-7262-0941>; Artem D. Sakharov – <https://orcid.org/0009-0008-0098-7163>.

Received: 27.06.2023 Revised: 06.10.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. The choice of solvents for the processes of extraction of biologically active substances from natural raw materials, the processes of purification of natural and synthesized substances by extraction, crystallization and dissolution methods is an important problem of the modern pharmaceutical industry, because a large number of experiments must be performed to determine the optimal solvent or mixture of solvents. To reduce the cost of developing and optimizing the extraction and purification of substances stages, it is proposed to use thermodynamic models at the stage of preliminary solubility assessment. The article investigates predicting the solubility of pharmaceutical substances issue on the example of the technology for isolating hesperidin and glycyrrhizic acid from plant materials.

Aim. Theoretical determination of the dissolving power of various solvents with respect to hesperidin and glycyrrhizic acid.

Materials and methods. The PMUNIFAC and NRTL-SAC thermodynamic models were used to predict solubility. The solubility calculation for the NRTL-SAC model was performed using Aspen Properties V14 software, and for the PMUNIFAC model using PTC Mathcad Prime V6. To evaluate the results obtained using thermodynamic models, a number of experiments were carried out, the object of which was the peel of an orange (dried flavedo and albedo, the degree of grinding is 0.2–0.5 mm, the moisture content is 8 %). The quantitative content of hesperidin was determined by direct spectrophotometry at a wavelength of 290 nm. Statistical data processing was performed using Minitab v20 software (Minitab Inc., USA), differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion. On the basis of thermodynamic models, the prediction of the solubility of hesperidin and glycyrrhizic acid was made. It has been shown that the solubility can be assessed both in the presence of solubility data according to the NRTL-SAC model, and in their complete absence according to PMUNIFAC. The correspondence of the theoretically calculated data to the experimental data confirms the correctness of the calculations of thermodynamic models. The results of the calculations are evaluated and solvents are recommended that can be used in the technology of isolating hesperidin and glycyrrhizic for the stages of degreasing, extraction and crystallization with the antisolvent.

Conclusion. Using the NRTL-SAC and PMUNIFAC thermodynamic models, the dissolving power of various solvents with respect to hesperidin and glycyrrhizic acid was determined. From the calculation results, a list of solvents was built, ranked by the solubility of the studied substances in them. The resulting list can be used in the development of an industrial technology for the isolation and purification of hesperidin and glycyrrhizic acid. It is shown that the NRTL-SAC and PMUNIFAC models have good prospects for quantitative prediction of the solubility of active substances.

Keywords: NRTL-SAC, PMUNIFAC, thermodynamic modeling, solubility, prediction, hesperidin, glycyrrhizic acid

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. Konstantin S. Stepanov and Georgii N. Turmanidze, under the direction of Vladislav V. Sorokin, developed approaches to predicting the solubility of substances based on thermodynamic models and carried out a series of experiments to confirm the calculations obtained using the models. Vladislav V. Sorokin, Konstantin S. Stepanov, Georgii N. Turmanidze, Artem D. Sakharov participated in data processing and in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

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

For citation: Stepanov K. S., Turmanidze G. N., Sorokin V. V., Sakharov A. D. Application of thermodynamic models to predict the solubility of biologically active substances. *Drug development & registration*. 2023;12(4):46–53. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1586>

ВВЕДЕНИЕ

Выбор растворителя для обеспечения процессов извлечения биологически активных веществ (БАВ) из природного сырья, очистки синтезированных и природных субстанций методами экстракции, кристаллизации и растворения является важной проблемой современной фармацевтической промышленности [1–5]. Несмотря на наличие множества экспериментальных исследований растворимости, не существует единого метода определения подходящего растворителя. В каждом конкретном слу-

чае субстанция требует индивидуального подхода и, как следствие, проведения большого количества экспериментов, чтобы установить пригодный растворитель для разрабатываемой технологии. Отсюда возникает важная задача: проработка подходов, которые позволят прогнозировать растворимость веществ и тем самым снизить затраты на разработку процессов [6].

В статье исследуется вопрос прогнозирования растворимости фармацевтических веществ на примере технологии производства гесперидина и глицирризиновой кислоты. Гесперидин и глицирризиновая

кислота (рисунок 1) являются ценными фармацевтическими веществами, получаемыми из растительного сырья. Гесперидин представляет собой флавоновый гликозид, природным источником которого являются цитрусовые. Глицирризиновая кислота – основной биологически активный тритерпеновый гликозид корней солодки.

Технологии выделения гесперидина и глицирризиновой кислоты из растительного сырья предполагают проведение стадии экстракции в системе твердое тело – жидкость. В основе ее проектирования лежит знание о растворимости целевых веществ, причем как в зависимости от природы растворителя (типа растворителя или состава растворяющей смеси), так и от его температуры. Например, для субстанций из природного сырья, получаемых экстрагированием, существует необходимость выбора экстрагента с высокой растворяющей способностью по отношению к целевому БАВ, чтобы обеспечить его высокий выход.

Помимо этапа экстракции, требуется проведение дополнительных стадий по выделению гесперидина и глицирризиновой кислоты из комплекса экстрагированных соединений, так как извлечения из природных источников, помимо целевого вещества, содержат большое количество других компонентов. К таким процедурам относятся различные процессы, включая те, принцип действия которых основан на растворимости: кристаллизация, перекристаллизация, замена растворителей, жидкостная экстракция.

Поэтому численные показатели растворимости обеих субстанций в разных растворителях играют

значимую роль при разработке технологий их получения. Однако для многих фармацевтических субстанций, и в частности для фитосубстанций, такие данные отсутствуют. В таком случае спрогнозированная растворимость может стать критерием выбора подходящих растворителей.

Растворимость гесперидина и глицирризиновой кислоты предложено рассчитывать с использованием термодинамических моделей, а именно прогностической модели PMUNIFAC и полупрогностической модели NRTL-SAC. Прогностические модели в отличие от полупрогностических не требуют начальных данных о растворимости изучаемого вещества. Расчет возможно провести исходя из молекулярных структур растворяемого вещества и растворителя, что является важным преимуществом для многих фармацевтических субстанций ввиду отсутствия точных оценок их растворимости.

Целью исследования являлось теоретическое определение растворяющей способности различных растворителей по отношению к гесперидину и глицирризиновой кислоте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Прогнозирование растворимости выполнено с помощью термодинамических моделей NRTL-SAC и PMUNIFAC. Для расчета растворимости по модели NRTL-SAC использовали программу Aspen Properties v14. Расчет растворимости по модели PMUNIFAC выполнен с помощью программного обеспечения PTC Mathcad Prime v6.

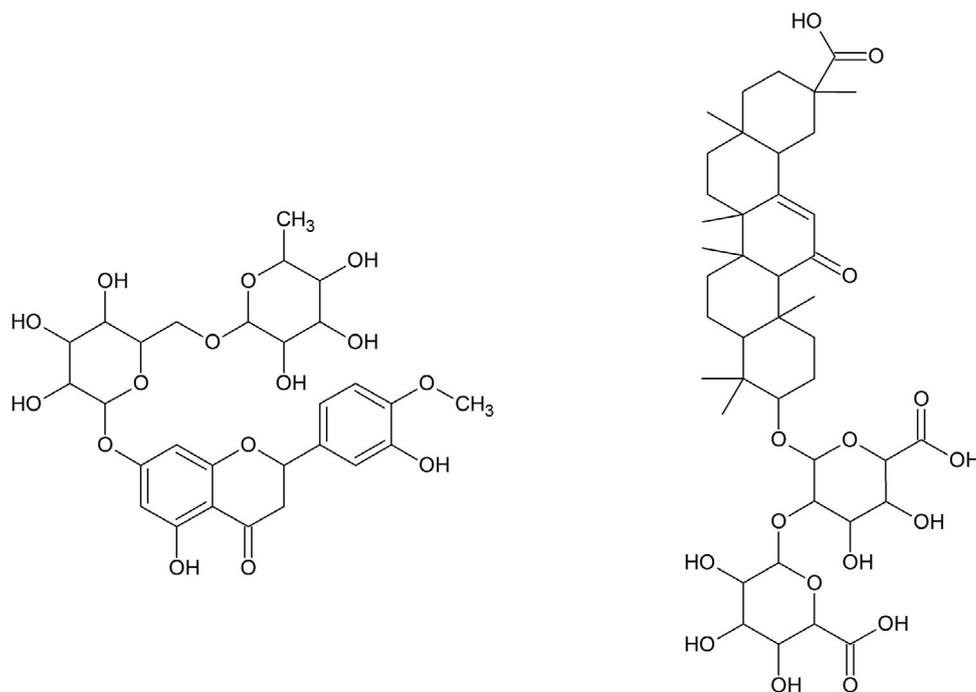


Рисунок 1. Молекулярная структура гесперидина (слева) и глицирризиновой кислоты (справа)

Figure 1. Molecular structure of hesperidin (left) and glycyrrhizic acid (right)

Растворяющую способность определяли согласно уравнению, позволяющему прогнозировать растворимость твердого вещества в жидкой фазе (1) [6, 7]:

$$\ln x = \frac{\Delta H_{fus}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) - \ln \gamma = K_{spA} - \frac{K_{spB}}{T} - \ln \gamma, \quad (1)$$

где x – мольная доля растворенного твердого вещества при насыщении им жидкой фазы; T – температура системы, К; T_m – температура плавления твердого вещества, К; ΔH_{fus} – теплота плавления твердого вещества, Дж/моль; R – универсальная газовая постоянная, Дж/(моль · К); γ – коэффициент активности растворимого вещества, оцениваемый с помощью термодинамических моделей; K_{spA} , K_{spB} – регулируемые параметры, определяемые регрессией экспериментальных данных.

Уравнение (1) показывает, что в случае идеальных систем, когда коэффициенты активности равны единице, растворимость твердого вещества зависит только от его свойств (теплота и температура плавления) и температуры системы. Вклад в уравнение (1) коэффициента активности растворенного вещества в растворе позволяет определять отклонение системы от идеального состояния и оценивать реальные системы.

Вместо температуры и энтальпии плавления в уравнении (1) можно использовать регулируемые параметры K_{spA} , K_{spB} которые определяют регрессией экспериментальных данных растворимости. Такой подход необходимо использовать в тех случаях, когда отсутствуют сведения о температуре и теплоте плавления или такие данные невозможно получить из-за термической деструкции изучаемого вещества. Кроме того, регрессированные параметры K_{spA} и K_{spB} зачастую позволяют лучше предсказывать растворимость, чем при подстановке в уравнение (1) реальных физических параметров, поскольку, во-первых, при выводе уравнения (1) используются некоторые допущения, во-вторых, в системах могут наблюдаться явления, не учитываемые моделью (например, образование кристаллогидратов) [8, 9].

В основе оценки коэффициента активности с помощью термодинамической модели NRTL-SAC лежит описание исследуемого вещества в виде совокупности четырех сегментов X, Y-, Y+ и Z. Гидрофобный сегмент X обозначает часть поверхности молекулы, которая не склонна к образованию водородных связей. Гидрофильный сегмент Z – часть молекулярной поверхности с тенденцией к образованию водородных связей. Полярные сегменты (Y- и Y+) представляют площади молекулярной поверхности, которые проявляют свойства донора или акцептора электронов. На основе величин сегментных параметров компонентов системы (растворяемое вещество и растворитель) модель NRTL-SAC определяет коэффициент активности вещества в растворе. Значения сегментных параметров многих растворителей определены

и описаны в литературе. Для растворимых веществ их необходимо регрессировать из доступных экспериментальных данных о растворимости изучаемых твердых веществ. Чтобы получить репрезентативные параметры X, Y-, Y+, Z растворимого вещества, которые в дальнейшем могут использоваться для предсказания растворимости в целевых растворителях, важно включить в исходный набор регрессируемых экспериментальных данных различные типы растворителей (гидрофильные, гидрофобные, полярные, гидрофобные – полярные, гидрофильные – гидрофобные) [7, 10].

Термодинамическая модель PMUNIFAC использует метод группового вклада для определения коэффициента активности. Молекулы растворителя и растворимого вещества рассматриваются как набор функциональных групп, каждая из которых обладает определенными численными параметрами, влияющими на растворимость. Также учитывается вклад от взаимодействия функциональных групп растворимого вещества и растворителя. Поэтому точность прогноза зависит от того, насколько полно описаны функциональные группы изучаемых веществ. Отличительная особенность модели PMUNIFAC как модели группового вклада в том, что она разработана специально для фармацевтической промышленности и учитывает специфику функциональных групп, характерных для лекарственных веществ [11].

Для валидации результатов, полученных расчетным способом по термодинамической модели NRTL-SAC, использовали флаведо и альbedo апельсина, высушенные при температуре 50–60 °С до остаточной влажности 8 ± 1 %. Экстракцию сырья проводили следующим образом: навеску сырья, измельченного до размера частиц 0,2–0,5 мм, взвешивали на весах лабораторных электронных «Сартогосм» CE224C, загружали в мацератор. Время экстракции составило 1 час, гидромодуль: 1:10, температура экстракции 50 °С.

Количественное определение гесперидина в извлечениях проводили по валидированной методике методом прямой спектрофотометрии при длине волны 290 нм с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (2009) (Shimadzu Corporation, Япония) [12]. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0013.15 Государственной фармакопеи XIV изд. [13] с использованием программного обеспечения Minitab v20 (Minitab Inc., США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прогнозирование растворимости гесперидина

Поскольку в литературе есть экспериментальные данные о количественной оценке растворимости гесперидина, то для его изучения использована по-

лупрогностическая модель NRTL-SAC. Преимущество данной модели в том, что она непосредственно не связывает растворимость с молекулярной структурой вещества. Благодаря этому точность прогнозирования растворимости не зависит от сложности структурных формул растворяемого вещества и растворителя. Это преимущество имеет особое значение для фармацевтической промышленности, где молекулы лекарственных веществ имеют большое число функциональных групп и разветвленную молекулярную структуру. Недостатком модели NRTL-SAC является необходимость надежного набора экспериментальных данных о растворимости изучаемого вещества, а также невысокая точность построения зависимости растворимости от температуры, так как коэффициент активности не включает в себя зависимость от температуры. Поэтому при определении параметров модели NRTL-SAC целесообразно регрессировать экспериментальные данные при той температуре, для которой будет выполняться прогнозирование.

Данные о точке плавления гесперидина (температуру и теплоту плавления) решено регрессировать из экспериментальных данных. Поэтому необходимое минимальное количество начальных экспериментальных данных о растворимости равно шести. Начальный набор экспериментальных данных растворимости гесперидина при 298 К представлен в таблице 1 [14–16]. Чтобы получить сегментные параметры X , Y_- , Y_+ , Z гесперидина и построить для него модель NRTL-SAC, в список растворителей для регрессии включены данные о растворимости гесперидина в растворителях, близких к эталонным (когда растворитель характеризуется только одним сегментным параметром): гидрофобно-полярном бензоле (характеризуется X), полярном диметилсульфоксиде (ДМСО) (характеризуется Y_-), гидрофобно-полярном ацетоне (характеризуется Y_+) и гидрофильной воде (характеризуется Z). Также для построения модели использованы гидрофобно-гидрофильные спирты (этанол, пропиленгликоль, изопропанол). На основе построенной модели NRTL-SAC спрогнозирована растворимость гесперидина в различных растворителях, которые используются в фармацевтической промышленности в технологии экстракции БАВ. Полученные с помощью созданной модели спрогнозированные значения растворяющей способности различных растворителей представлены в таблице 1.

Используем спрогнозированную растворимость гесперидина при 298 К из таблицы 1, чтобы определить перспективные растворители, которые могут использоваться в технологии выделения гесперидина. Выделим из них те, которые можно рекомендовать для технологических процедур обезжиривания, экстракции и кристаллизации с антирастворителем.

Важной технологической процедурой в технологии экстракции является обезжиривание. Оно может выполняться перед стадией экстракции для сырья

или после экстрагирования для полученной вытяжки. В обоих случаях обезжиривание позволяет избавляться от неполярных балластных веществ и тем самым улучшать чистоту продукта. К тому же предварительное обезжиривание сырья может приводить к более высокому выходу целевых веществ. Гидрофобные растворители бензол, хлороформ, диэтиловый эфир, дихлорметан и этилацетат не могут использоваться для экстракции гесперидина, поскольку спрогнозированная для них растворимость очень низкая. Однако благодаря этому они являются потенциальными растворителями для процедуры обезжиривания.

Таблица 1. Начальные данные модели и спрогнозированная растворимость гесперидина при 298 К по модели NRTL-SAC

Table 1. Initial model data and predicted solubility of hesperidin at 298 K according to the NRTL-SAC model

Растворитель Solvent	Спрогнозированная растворимость, г/л Predicted solubility, g/l	Растворимость для регрессии модели, г/л Solubility for model regression, g/l
Бензол Benzene	$1,12 \times 10^{-8}$	$1,00 \times 10^{-8}$
Хлороформ Chloroform	$5,68 \times 10^{-7}$	–
Диэтиловый эфир Diethyl ether	$1,87 \times 10^{-5}$	–
Дихлорметан Dichloromethane	$3,57 \times 10^{-5}$	–
Этилацетат Ethyl acetate	$2,15 \times 10^{-4}$	–
Вода Water	$6,21 \times 10^{-3}$	$4,98 \times 10^{-3}$
Ацетон Acetone	$5,25 \times 10^{-2}$	$5,00 \times 10^{-2}$
Изопропанол Isopropanol	$5,77 \times 10^{-2}$	0,122
Бутанол Butanol	0,180	–
Пропанол Propanol	0,255	–
ДМФА DMF	0,810	–
Этанол Ethanol	0,944	0,361
Метанол Methanol	2,27	–
Пропиленгликоль Propylene glycol	3,23	4,47
ДМСО DMSO	5,55	5,00
Пиридин Pyridine	35,4	–

Наиболее часто в качестве растворителей для экстракции используются спирты. Спрогнозированная растворимость гесперидина в спиртах уменьшается в ряду: пропиленгликоль, метанол, этанол, пропанол, бутанол, изопропанол. Для проведения экстракции гесперидина наиболее перспективны пропиленгликоль, метанол, этанол, поскольку для них величина спрогнозированной растворяющей способности значительно выше, чем у остальных спиртов.

Исследования по экстрагированию гесперидина методом однократной мацерации из флаведо и альбеда апельсина спиртами (метанолом, этанолом, изопропанолом) показали, что данные, полученные прогнозированием растворимости, коррелируют [с поправкой на температуру экстракции 323 К (50 °C)] с экспериментальными, представленными в таблице 2.

Таблица 2. Концентрация гесперидина в извлечении

Table 2. Hesperidin concentration in extract

Экстрагент Extragent	Концентрация гесперидина в извлечении, г/л Hesperidin concentration in extract, g/l
Метанол Methanol	3,87 ± 0,08
Этанол Ethanol	1,02 ± 0,02
Изопропанол Isopropanol	0,15 ± 0,01

Для повышения растворяющей способности экстрагентов вместо чистых веществ часто используют их смеси. Благодаря высокой растворяющей способности ДМСО и пиридина эти вещества являются перспективными добавками в многокомпонентные смеси растворителей.

Кристаллизация с помощью антирастворителя предполагает, что целевое растворенное вещество выпадает в осадок в результате снижения его растворимости при добавлении в раствор антирастворителя. Антирастворителем выступает вещество, в котором целевое вещество является относительно нерастворимым. Исходя из спрогнозированной растворимости в качестве антирастворителей могут использоваться бензол, хлороформ, диэтиловый эфир и дихлорметан.

Прогнозирование растворимости глицирризиновой кислоты

Для глицирризиновой кислоты отсутствует необходимый набор опытных данных о растворимости, чтобы реализовать полупрогностическую модель NRTLSC. Для нее возможно применить термодинамическое моделирование только через полностью

прогностические модели. Поэтому расчет растворимости глицирризиновой кислоты выполнен с помощью модели PMUNIFAC. Преимущество PMUNIFAC заключается в том, что она позволяет прогнозировать растворимость веществ без экспериментальных данных о растворимости. Недостатком модели является высокая погрешность результатов прогноза. Из-за низкой точности результаты прогнозирования не могут использоваться для точной количественной оценки. Несмотря на это, PMUNIFAC может применяться в тех случаях, когда точная количественная оценка не требуется. Например, на этапе скрининга для сравнения растворяющей способности разных растворителей и выбора наиболее перспективных из них для дальнейшего изучения.

В качестве температуры плавления глицирризиновой кислоты использовано значение 220 °C. Поскольку для глицирризиновой кислоты отсутствуют литературные сведения об энтальпии плавления, то этот параметр определен методом группового вклада согласно [17, 18]. Расчет по Jain [17] дал значение 107,950 кДж/моль, а по методу Morrero [18] – 116,897 кДж/моль. Рассчитанные по обоим методам величины теплоты плавления оказались довольно близки. Для построения термодинамической модели было выбрано значение, полученное по Morrero.

С помощью модели PMUNIFAC выполнен расчет растворимости глицирризиновой кислоты в 8 веществах. Модель дает более надежные результаты, если известны все взаимодействия функциональных групп молекул растворяемого вещества и растворителя. Наиболее точные прогнозы должны быть получены для спиртов (этанол, бутанол, октанол) и для углеводородов (гексан), поскольку для них есть описание всех взаимодействий. Для ацетона, ДМСО, этилацетата и дихлорметана взаимодействия между группами частично отсутствуют.

При использовании расчетной теплоты плавления спрогнозированные значения имели явно заниженные величины. Например, известна высокая растворимость глицирризиновой кислоты в ацетоне и этиловом спирте, в то же время модель спрогнозировала растворимость $5,41 \cdot 10^{-4}$ г/л для ацетона и $4,18 \cdot 10^{-4}$ г/л для этанола. Вероятно, использование в уравнении (1) нерегрессированных параметров привело к высокой погрешности модели. Поэтому для получения более точных значений растворимости целесообразно пересчитать теплоту плавления на основе данных о растворимости в веществе, имеющем все параметры взаимодействия с глицирризиновой кислотой. В качестве такого вещества выбран этанол, растворимость кислоты в котором принята равной 5 г/л. Полученная на основании расчета теплоты плавления равна 58,13 кДж/моль. На ее основе рассчитана растворимость глицирризиновой кислоты в различных растворителях при 298 К (таблица 3).

Таблица 3. Спрогнозированная растворимость глицирризиновой кислоты при 298 К по модели PMUNIFAC

Table 3. Predicted solubility of glycyrrhizic acid at 298 K according to the PMUNIFAC model

Растворитель Solvent	Растворимость, г/л Solubility, g/l
Гексан Hexane	$2,51 \cdot 10^{-14}$
Этилацетат Ethyl acetate	$3,54 \cdot 10^{-3}$
Дихлорметан Dichloromethane	$1,94 \cdot 10^{-2}$
Октанол Octanol	0,258
Бутанол Butanol	4,25
Этанол Ethanol	5,00
Ацетон Acetone	6,47
ДМСО DMSO	62,9

Модель PMUNIFAC определила, что среди изученных веществ наибольшей растворяющей способностью по отношению к глицирризиновой кислоте обладают ДМСО, ацетон, этанол и бутанол. Соответственно они являются перспективными экстрагентами и могут использоваться как компоненты для составления смесей растворителей. Известно, что глицирризиновая кислота плохо растворяется в неполярных растворителях, чему соответствуют спрогнозированные низкие растворимости в гексане, этилацетате и хлороформе. Благодаря этому они могут использоваться для процедуры обезжиривания. Дополнительно следует отметить, что рассчитанная в гексане растворимость значительно ниже, чем у других веществ. Поэтому гексан является перспективным антирастворителем для процесса кристаллизации глицирризиновой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано применение термодинамических моделей NRTL-SAC и PMUNIFAC для прогнозирования растворяющей способности различных растворителей по отношению к гесперидину и глицирризиновой кислоте. Выяснено, что полупрогностическая модель NRTL-SAC имеет хорошие перспективы для количественного прогнозирования растворимости. Ее главным ограничением является необходимость начального набора репрезентативных экспериментальных данных. Подобный случай рассмотрен на примере глицирризиновой кислоты, для которой отсутствуют необходимые для построения модели

NRTL-SAC эмпирические данные. Для такой ситуации может применяться полностью прогностическая модель PMUNIFAC. Однако ее использование характеризуется высокой погрешностью прогноза, и поэтому PMUNIFAC целесообразно применять на первоначальном этапе скрининга растворителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джавахян М. А., Прожогина Ю. Э. Глубокие эвтектические растворители на основе холина хлорида как перспективные экстрагенты флавоноидов из седативной растительной композиции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):79–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-79-86.
2. Жигалина А. А., Дударев В. Г., Тихонова В. В., Стрелова О. Ю. Разработка синтеза генистеина для использования в качестве стандартного образца. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):20–31. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-20-31.
3. Кутателадзе Г. Р., Федосеева Л. М. Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории алтайского края. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-80-86.
4. 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.
5. Богоутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбарян С. П., Пovyдыш М. Н. Выделение формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозиды из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):14–19. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19.
6. Maharana A., Sarkar D. Solubility measurements and thermodynamic modeling of pyrazinamide in five different solvent-antisolvent mixtures. *Fluid Phase Equilibria*. 2019;497:33–54. DOI: 10.1016/j.fluid.2019.06.004.
7. Seyf J. Y., Asgari M. Correlation and prediction of small to large sized pharmaceuticals solubility, and crystallization in binary and ternary mixed solvents using the UNIQUAC-SAC model. *Fluid Phase Equilibria*. 2020;519:112656. DOI: 10.1016/j.fluid.2020.112656.
8. Silva M., Garcia J., Ottens M. Polyphenol Liquid-Liquid Extraction Process Development using NRTL-SAC. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2018;57(29):9210–9221. DOI: 10.1021/acs.iecr.8b00613.
9. Tun H., Hao Y., Haddix M., Chen C.-C., Thermodynamic solubility modeling of 2, 2', 4, 4', 6, 6' – hexanitrostilbene (HNS). *Fluid Phase Equilibria*. 2023;565:113627. DOI: 10.1016/j.fluid.2022.113627.
10. Seyf J. Y., Shojaeian A. Vapor-liquid (azeotropic systems) and liquid-liquid equilibrium calculations using UNIFAC and NRTL-SAC activity coefficient models. *Fluid Phase Equilibria*. 2019;494:33–44. DOI: 10.1016/j.fluid.2019.04.029.
11. Diedrichs A., Gmehling J. Solubility Calculation of Active Pharmaceutical Ingredients in Alkanes, Alcohols, Water and their Mixtures Using Various Activity Coefficient Models. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2010;50(3):1757–1769. DOI: 10.1021/ie101373k.
12. Евсеева О. С., Андреева О. А., Оганесян Э. Т., Ароян М. В. О качественном составе флаванонов и их количественном содержании в кожуре *Citrus maxima*. *Фундаментальные исследования*. 2014;6(1):96–99.

13. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. ОФС.1.1.0013.15. Т. 1. М.: ФЭМБ. 2018. 1814 с.
14. Anwer M. K., Al-Shdefat R., Jamil S., Alam P., Abdel-Kader M., Sha-keel F. Solubility of Bioactive Compound Hesperidin in Six Pure Solvents at (298.15 to 333.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2014;59(6):2065–2069. DOI: 10.1021/je500206w.
15. Xu R., Cong Y., Zheng M., Chen G., Chen J., Zhao H. Solubility and Modeling of Hesperidin in Cosolvent Mixtures of Ethanol, Isopropanol, Propylene Glycol, and *n*-Propanol + Water. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2018;63(3):764–770. DOI: 10.1021/acs.jced.7b00948.
16. Jadeja Y. S., Kapadiya K. M., Jebaliya H. J., Shah A. K., Khunt R. C. Dihedral angle study in Hesperidin using NMR Spectroscopy: Dihedral angle study in Hesperidin. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2016;55(6):589–594. DOI: 10.1002/mrc.4559.
17. Jain A., Yalkowsky S. Estimation of Melting Points of Organic Compounds-II. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2006;95(12):2562–2618. DOI: 10.1002/jps.20634.
18. Marrero J., Gani R. Group Contribution Based Estimation of Pure Component Properties. *Fluid Phase Equilibria*. 2001;183–184:183–208. DOI: 10.1016/S0378-3812(01)00431-9.
11. Diedrichs A., Gmehling J. Solubility Calculation of Active Pharmaceutical Ingredients in Alkanes, Alcohols, Water and their Mixtures Using Various Activity Coefficient Models. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2010;50(3):1757–1769. DOI: 10.1021/ie101373k.
12. Evseeva O. S., Andreeva O. A., Oganesyanyan E. T., Aroyan M. V. On the qualitative composition of flavanones and their quantitative content in the peel of Citrus maxima. *Fundamental research*. 2014;6(1):96–99. (In Russ.)
13. State Pharmacopeia of the Russian Federation XIV edition. OFS.1.1.0013.15. Volume 1. Moscow: FEMB. 2018. 1814 p. (In Russ.)
14. Anwer M. K., Al-Shdefat R., Jamil S., Alam P., Abdel-Kader M., Sha-keel F. Solubility of Bioactive Compound Hesperidin in Six Pure Solvents at (298.15 to 333.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2014;59(6):2065–2069. DOI: 10.1021/je500206w.
15. Xu R., Cong Y., Zheng M., Chen G., Chen J., Zhao H. Solubility and Modeling of Hesperidin in Cosolvent Mixtures of Ethanol, Isopropanol, Propylene Glycol, and *n*-Propanol + Water. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2018;63(3):764–770. DOI: 10.1021/acs.jced.7b00948.
16. Jadeja Y. S., Kapadiya K. M., Jebaliya H. J., Shah A. K., Khunt R. C. Dihedral angle study in Hesperidin using NMR Spectroscopy: Dihedral angle study in Hesperidin. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2016;55(6):589–594. DOI: 10.1002/mrc.4559.
17. Jain A., Yalkowsky S. Estimation of Melting Points of Organic Compounds-II. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2006;95(12):2562–2618. DOI: 10.1002/jps.20634.
18. Marrero J., Gani R. Group Contribution Based Estimation of Pure Component Properties. *Fluid Phase Equilibria*. 2001;183–184:183–208. DOI: 10.1016/S0378-3812(01)00431-9.

REFERENCES

1. Dzhavakhyan M. A., Prozhogina Yu. E. Choline chloride based deep eutectic solvents as promising extractants of flavonoids from sedative plant composition. *Drug development & registration*. 2022;11(4):79–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-79-86.
2. Zhigalina A. A., Dudarev V. G., Tikhonova V. V., Strelova O. Yu. Development of genistein synthesis for use as a certified reference material. *Drug development & registration*. 2021;10(4):20–31. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-20-31.
3. Kutateladze G. R., Fedoseeva L. M. Research in the development and validation of the method of quantitative determination of flavonoids in the common sorrel herba, gathered in the altai territory. *Drug development & registration*. 2019;8(2):80–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-80-86.
4. 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.
5. Bogoutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharo M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullayeva D. Kh., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydysh M. N. Isolation of formononetin-7-O- β -D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and the assessment of its effect on induced platelet activation. *Drug development & registration*. 2021;10(4):14–19. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19.
6. Maharana A., Sarkar D. Solubility measurements and thermodynamic modeling of pyrazinamide in five different solvent-antisolvent mixtures. *Fluid Phase Equilibria*. 2019;497:33–54. DOI: 10.1016/j.fluid.2019.06.004.
7. Seyf J. Y., Asgari M. Correlation and prediction of small to large sized pharmaceuticals solubility, and crystallization in binary and ternary mixed solvents using the UNIQUAC-SAC model. *Fluid Phase Equilibria*. 2020;519:112656. DOI: 10.1016/j.fluid.2020.112656.
8. Silva M., García J., Ottens M. Polyphenol Liquid-Liquid Extraction Process Development using NRTL-SAC. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2018;57(29):9210–9221. DOI: 10.1021/acs.iecr.8b00613.
9. Tun H., Hao Y., Haddix M., Chen C.-C., Thermodynamic solubility modeling of 2, 2', 4, 4', 6, 6' – hexanitrostilbene (HNS). *Fluid Phase Equilibria*. 2023;565:113627. DOI: 10.1016/j.fluid.2022.113627.
10. Seyf J. Y., Shojaeian A. Vapor-liquid (azeotropic systems) and liquid-liquid equilibrium calculations using UNIFAC and NRTL-SAC activity coefficient models. *Fluid Phase Equilibria*. 2019;494:33–44. DOI: 10.1016/j.fluid.2019.04.029.



Обзорная статья / Review article

Лекарственные перспективы ретиноидов (обзор)

Л. В. Коваленко¹, А. Г. Поливанова¹✉, А. П. Ильин², И. Н. Соловьева¹,
Е. И. Горбачева³, М. С. Ощепков¹

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 Общество с ограниченной ответственностью «АФС-технологии». 141401, Россия, Московская область, г. Химки, ул. Рабочая, д. 2А, стр. 1

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). 117997, Россия, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

✉ Контактное лицо: Поливанова Анна Геннадьевна. E-mail: polivanova.a.g@muctr.ru

ORCID: Л. В. Коваленко – <https://orcid.org/0000-0002-0027-4664>; А. Г. Поливанова – <https://orcid.org/0000-0003-4502-0745>;

А. П. Ильин – <https://orcid.org/0009-0008-5177-2867>; И. Н. Соловьева – <https://orcid.org/0000-0002-0079-6710>;

Е. И. Горбачева – <https://orcid.org/0009-0009-3829-8109>; М. С. Ощепков – <https://orcid.org/0000-0002-2892-4884>.

Статья поступила: 13.07.2023

Статья принята в печать: 10.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Ретиноиды представляют собой группу эндогенных и синтетических веществ, регулирующих множество важных биологических процессов нормального развития. Синтез и изучение биологической активности новых ретиноидов являются перспективной областью химической биологии.

Текст. Геномные функции ретиноидов опосредованы их ядерными рецепторами RAR(α , β , γ) и RXR(α , β , γ), которые регулируют транскрипцию генов с привлечением корепрессоров и коактиваторов. Ретиноиды также обладают негеномными функциями, ацилируя белки и другие биомолекулы. Передовыми областями исследований биологической активности ретиноидов являются регенеративная медицина и биология стволовых клеток. Эндогенные и синтетические ретиноиды применяются для лечения кожных патологий и онкологических заболеваний. Есть данные о возможности использования их в терапии заболеваний легких. Разработка ретиноидов, обладающих высокой селективностью в отношении отдельных рецепторов и тканей, может открыть новые подходы к лечению и профилактике таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и другие. Ретиноиды необходимы для функционирования иммунной системы и являются очень мощными иммуномодуляторами. Кроме того, ретиноиды обладают потенциалом для терапии различных пролиферативных заболеваний.

Заключение. Многолетние исследования фармакологической активности ретиноевой кислоты и ее структурных аналогов направлены на изучение и установление точных механизмов их действия, а также степени их участия в патогенезе различных заболеваний. Получение синтетических ретиноидов преследует цель дизайна соединений с высокой избирательностью по отношению к определенным рецепторам, что позволило бы исключить мультитаргетное действие естественных регуляторных молекул и обусловленные этим побочные эффекты. Лишенные тератогенных и других побочных эффектов синтетические ретиноиды могут найти применение в качестве терапевтических средств для лечения дефектного метаболизма, различных злокачественных новообразований, а также заболеваний почек, легких и ЦНС. Кроме того, разработка пролекарств на основе ретиноидов с контролируемым высвобождением активных молекул также является перспективным направлением в этой области медицинской химии.

Ключевые слова: витамин А, ретиноиды, ретиненоиды, бексаротен, тамибаротен

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

Вклад авторов. Л. В. Коваленко – обзор публикаций по теме статьи, анализ и систематизация материала, написание текста статьи. А. Г. Поливанова – обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи, научное редактирование. А. П. Ильин – научное редактирование текста статьи. И. Н. Соловьева – научное редактирование текста статьи. Е. И. Горбачева – обзор публикаций по теме статьи, М. С. Ощепков – научное редактирование, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

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

Для цитирования: Коваленко Л. В., Поливанова А. Г., Ильин А. П., Соловьева И. Н., Горбачева Е. И., Ощепков М. С. Лекарственные перспективы ретиноидов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):54–62. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1521>

Medicinal Perspectives of Retinoids (Review)

Leonid V. Kovalenko¹, Anna G. Polivanova¹✉, Aleksey P. Ilyin², Inna N. Solovieva¹,
Evgenia I. Gorbacheva³, Maxim S. Oshchepkov¹

¹ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (D. Mendeleev University, MUCTR). 9, Miusskaya square, Moscow, 125047, Russia

² LLC «AFS-technologies». 2A/1, Rabochaya str., Khimki, Moscow region, 141401, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS (IBCh RAS). 16/10, Miklouho-Maklaya str., GSP-7, Moscow, 117997, Russia

✉ Corresponding author: Anna G. Polivanova. E-mail: polivanova.a.g@muctr.ru

ORCID: Leonid V. Kovalenko – <https://orcid.org/0000-0002-0027-4664>; Anna G. Polivanova – <https://orcid.org/0000-0003-4502-0745>;

Aleksey P. Ilyin – <https://orcid.org/0009-0008-5177-2867>; Inna N. Solovieva – <https://orcid.org/0000-0002-0079-6710>;

Evgenia I. Gorbacheva – <https://orcid.org/0009-0009-3829-8109>; Maxim S. Oshchepkov – <https://orcid.org/0000-0002-2892-4884>.

Received: 13.07.2023

Revised: 10.11.2023

Published: 24.11.2023

© Коваленко Л. В., Поливанова А. Г., Ильин А. П., Соловьева И. Н., Горбачева Е. И., Ощепков М. С., 2023

© Kovalenko L. V., Polivanova A. G., Ilyin A. P., Solovieva I. N., Gorbacheva E. I., Oshchepkov M. S., 2023

Abstract

Introduction. Retinoids are a group of endogenous and synthetic substances that regulate numerous important biological processes in normal development. The synthesis and study of the biological activity of new retinoids are a promising area of chemical biology.

Text. The genomic functions of retinoids are mediated by their nuclear receptors RAR(α , β , γ) and RXR(α , β , γ), which regulate gene transcription by recruiting corepressors and coactivators. Retinoids also possess non-genomic functions by acylating proteins and other biomolecules. Regenerative medicine and stem cell biology are advanced areas of research in the biological activity of retinoids. Endogenous and synthetic retinoids are used for the treatment of skin pathologies and in oncology. There is evidence of their potential use in the therapy of lung diseases. The development of retinoids with high selectivity towards specific receptors and tissues may open new approaches to the treatment and prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and others. Retinoids are necessary for the functioning of the immune system and are powerful immunomodulators. Additionally, retinoids have the potential for the therapy of various proliferative diseases.

Conclusion. Long-term studies of the pharmacological activity of retinoic acid and its structural analogs aim to investigate and establish the precise mechanisms of their actions, as well as their involvement in the pathogenesis of various diseases. The synthesis of retinoids aims to design compounds with high selectivity towards specific receptors, which would exclude the multitarget action of natural regulatory molecules and the associated side effects. Synthetic retinoids devoid of teratogenic and other side effects can find application as therapeutic agents for the treatment of metabolic disorders, various malignancies, as well as kidney, lung, and CNS diseases. Furthermore, the development of prodrugs based on retinoids with controlled release of active molecules is also a promising direction in this field of medicinal chemistry.

Keywords: vitamin A, retinoids, rexinoids, bexarotene, tamibarotene

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. Leonid V. Kovalenko – literature review, writing the text of the article, analysis and systematization of the material. Anna G. Polivanova – literature review, writing the text of the article, scientific editing. Aleksey P. Ilyin – scientific article editing. Inna N. Solovieva – scientific article editing. Evgenia I. Gorbachev – literature review. Maxim S. Oshchepkov – scientific article editing, critical revision with the introduction of valuable intellectual content.

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

For citation: Kovalenko L. V., Polivanova A. G., Ilyin A. P., Solovieva I. N., Gorbacheva E. I., Oshchepkov M. S. Medicinal perspectives of retinoids. *Drug development & registration*. 2023;12(4):54–62. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1521>

ВВЕДЕНИЕ

История витамина А, представляющего собой дитерпеновый спирт ретинол, насчитывает более ста лет. Долгое время его ассоциировали прежде всего с органами зрения, была установлена роль витамина А в функционировании слизистых оболочек и кожных покровов, связь с репродуктивными процессами, а его участие в работе центральной нервной системы стало выявляться лишь с конца прошлого века. Витамин А вовлечен в контроль сна и циркадных ритмов. Его простая молекула участвует во многих аспектах развития эмбриона, которые включают морфогенез черепа и лица, дифференцировку нейронов, развитие органов зрения, конечностей, легких, почек и сердца. Низкий уровень витамина А в организме может привести к ослаблению иммунной системы, анемии или слепоте. С недостатком витамина А связана смертность сотен тысяч детей [1], однако его избыток также может иметь фатальные последствия.

Ферменты дегидрирования преобразуют ретинол в отличающиеся геометрией двойных связей ретиноевые кислоты, которые активируют ядерные рецепторы, получившие обозначение RAR для ретиноевой кислоты, все двойные связи которой имеют транс-конфигурацию (рисунок 1).

Рецепторы цис-изомеров ретиноевой кислоты получили обозначение RXR. При этом у каждого из двух типов рецепторов есть еще три подтипа. Связываясь с ретиноевыми кислотами, RAR(α , β , γ) и RXR(α , β , γ) образуют множество гомо- и гетеродимеров, которые запускают транскрипцию соответствующих генов с образованием мРНК для синтеза структурных белков, ферментов и других протеиновых компонентов тканей, участвующих в таких физиологических процессах, как рост, зрительное восприятие, репродуктивные функции, иммунитет, дифференциация клеток, апоптоз и другие [2]. Часто 9-цис-ретиноевую кислоту и ее синтетические аналоги выделяют в ретксиноиды.

В сетчатке ретиноевая кислота действует как нейромодулятор световой сигнализации и регулирует связь между нейронами. В гиппокампе ретиноевая кислота играет важную физиологическую роль в синаптической пластичности, в обучении и памяти, а также в нейрогенезе сформировавшихся организмов. Недостаток витамина А во время беременности приводит к специфическому синдрому, с которым связан риск развития у детей аутизма [3].

ATRA способствует развитию сосудистой системы мозга, питающей нейроны, глиальные клетки и клетки сосудов, которые обеспечивают функциони-

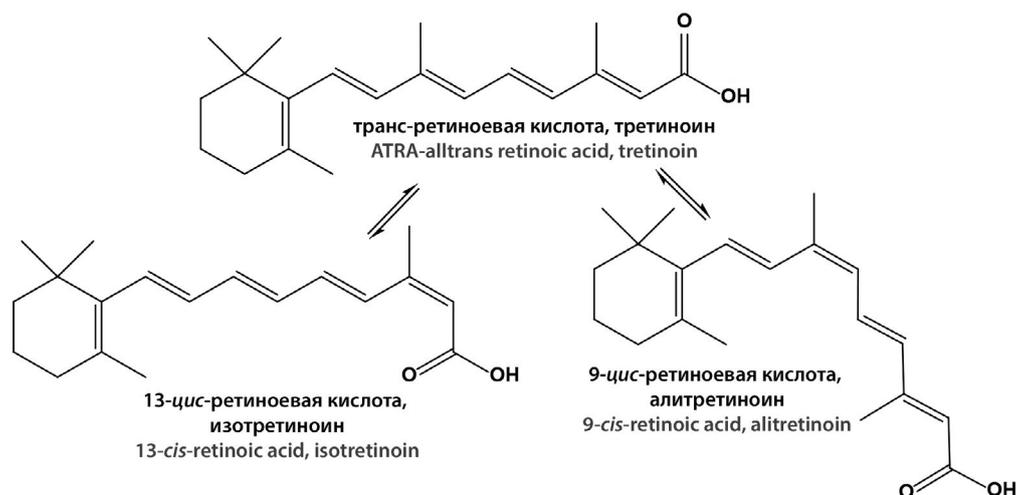


Рисунок 1. Ретиноиды и рексиноиды

Figure 1. Retinoids and Rexinoids

рование гематоэнцефалического барьера и в конечном итоге гомеостаз центральной нервной системы. Ретиновая кислота отвечает за физиологическую структурную целостность сосудисто-нервного узла, снижая риск развития неврологических расстройств [4]. Дефицит этого вещества приводит к таким нейродегенеративным заболеваниям, как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, шизофрения [5]. Кроме того, витамин А и ретиновая кислота участвуют в регуляции уровня глюкозы и в метаболизме липидов [6].

Связываясь с рецепторами RAR и RXR, пространственные изомеры ретиновой кислоты участвуют в пролиферации и дифференциации клеток как в эмбриогенезе, так и в морфогенезе. Активированные ретиновыми кислотами рецепторы RAR и RXR могут образовывать гетеродимерные лиганд-рецепторные комплексы и с другими типами ядерных рецепторов, например с рецепторами на витамин D, рецепторами тиреоидной сферы и с рецепторами, которые активируются пероксисомными пролифераторами [7].

В соответствии с изложенным регуляторная активность ретиноидов реализуется преимущественно по гормональному механизму, включающему взаимодействие с ядерными рецепторами, активирующими транскрипцию. Однако ретиноиды действуют не только на трансляционном уровне – они индуцируют, например, быструю кратковременную активацию киназных каскадов. Сочетание транскрипционных программ и негеномных эффектов составляет широкий спектр регулируемых ретиноидами биологических функций, обеспечивая им значительный терапевтический потенциал. В онкологии они применяются в основном в качестве химиотерапевтических средств для лечения лейкозов, хотя хорошие перспективы имеет и профилактика новообразований с помощью этих препаратов [8].

Детальное изучение молекулярных механизмов фармакологической активности ретиноидов и рексиноидов позволяет рассчитывать на выявление новых направлений их лекарственного действия. Важное значение имеют регуляторные функции ретиновых кислот в цитоплазме для контроля негеномных эффектов. Образование этих сигнальных молекул необходимо для обеспечения синаптической пластичности в таких участвующих в реализации когнитивных функций областях мозга, как гиппокамп. Дефицит предшественника ретиновых кислот витамина А приводит к ухудшению этих функций, а сбой в передаче опосредованных ретиновыми кислотами сигналов может быть связан с возрастным снижением когнитивных функций, а также с болезнью Альцгеймера. Кроме того, несколько нарушающих когнитивные способности психических расстройств и дефектов развития также связаны с витамином А, что указывает на возможность их лечения самим витамином или ретиноидами.

С негеномным эффектом ретиноидов может быть связана их роль в течении коронавирусной инфекции. В апреле 2022 года появилось сообщение о роли ретиноидных сигнальных путей в патогенезе COVID-19 [9]. В частности, было показано, что у тяжелых пациентов наблюдается резкое снижение уровня ретинола. Вызванный этим дефицит ретиноидной сигнализации приводит к нарушению регуляции в иммунной системе, в основе которого лежит уменьшение синтеза интерферона I типа и избыточное выделение воспалительных цитокинов. С этим согласуется двухфазный иммунопатогенез COVID-19. Можно предположить, что восстановление ретиноидной сигнализации имеет хорошие перспективы для лечения и профилактики этого заболевания. Оказалось также, что ретиноиды третьего поколения та-

мибаротен и адапален, по данным многофакторной компьютерной оценки зависимости «структура – активность» с моделированием молекулярным докинггом, могут быть противовирусными средствами для лечения вирулентного ковида штамма омикрон с тройной мутацией SARS-CoV-2 [10].

Плюрипотентность естественных ретиноидов включает системное введение пространственных изомеров ретиноевой кислоты, поскольку поступление в организм «лишних» ретиноидов приводит к экспрессии всех зависящих от них генов. При этом даже топическое применение этих активных веществ для лечения угревой сыпи, псориаза, солнечных ожогов, ихтиоза или для разглаживания морщин сопровождается рядом серьезных побочных эффектов, среди которых главное место занимает тератогенный эффект. Тем не менее ретиноиды используются в составе профилактических лекарственных средств местного действия для лечения кожных заболеваний, а также в виде средств системного действия для лечения злокачественных новообразований.

Исследования

Разработка новых синтетических ретиноидов с повышенной избирательностью к определенным сочетаниям рецепторов RAR и RXR привела к более глубокому пониманию клеточных эффектов, связанных с их активацией.

Лекарственное средство третиноин на основе ретиноевой кислоты вошло в практику лечения кожных заболеваний с середины прошлого века. На сегодняшний день существует уже четыре поколения лекарственных средств на основе ретиноидов. Первые опыты по получению синтетических структурных аналогов ретиноевой кислоты привели к получению ретиноидов второго поколения с ароматическим структурным элементом вместо циклогексенового в молекулах ретиноевых кислот. Более доступные в синтетическом отношении, они сохраняли все недостатки эндогенных лигандов. В качестве примера можно привести ацитретин, использовавшийся преимущественно в виде его этилового эфира этретината (рисунок 2).

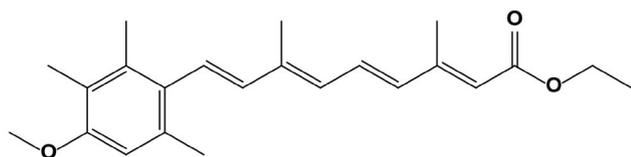


Рисунок 2. Структурная формула ацитретина

Figure 2. Structural formula of Acitretin

Сейчас ретиноиды второго поколения не используются, поскольку они являются такими же тератогенами, как и ретиноевые кислоты.

К ретиноидам второго поколения можно отнести и 4-гидроксифениламид ретиноевой кислоты фенолретинид (рисунок 3). Его перспективы как химиотерапевтического средства показаны в опытах *in vitro*, на животных, а также в небольшом объеме клинических испытаний.

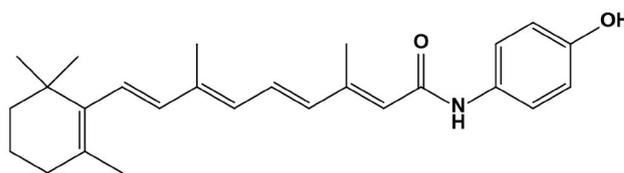


Рисунок 3. Структурная формула фенолретинида

Figure 3. The structural formula of Fenretinide

Это производное ретиноевой кислоты исследовалось в составе средств для лечения рака, муковисцидоза, акне, псориаза и ревматоидного артрита. Фенретинид показал хорошие нейропротекторные свойства, он легко преодолевает гематоэнцефалический барьер, защищая центральную нервную систему от оксидативного стресса в концентрациях $\leq 0,1$ мкМ независимо от способа введения [11]. Фенретинид не образует активных комплексов с RAR и RXR и не гидролизует в организме с образованием ретиноевых кислот.

Отличный от опосредованного взаимодействием с RAR и RXR механизм действия фенолретинида исключает проявление у него отрицательных побочных эффектов ретиноидов с карбоксилатной функциональной группой. Показано, что противораковая активность фенолретинида связана с активацией в клетках злокачественных опухолей биосинтеза церамидов, каспаз и активных форм кислорода, вызывающих их гибель в результате апоптоза.

Важным этапом в разработке новых структурных аналогов ретиноевых кислот стало обнаружение высокой ретиноидной активности у (E)-4-(5,6,7,8-тетрагидро-5,5,8,8-тетраметил-2-нафталенил-1-пропенил) бензойной кислоты (TTNPB) (рисунок 4) [12]. В молекуле TTNPB четыре двойные связи несущей карбоксильную группу экзоциклической цепи ретиноевых кислот включены в жесткую структуру двух ароматических циклов. Этот бзамещенный 1,1,4,4-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидронафталин стал соединением-лидером для получения других аналогов ретиноевой кислоты с варьированием заместителей, линкера, соединяющего два ароматических структурных элемента, и с заменой структурной единицы бензойной кислоты на замещенные ароматические и гетероароматические карбоновые кислоты.

До настоящего времени используются в фармакологической практике бексаротен («Таргретин»), тамибаротен и тазаротен (рисунок 5).

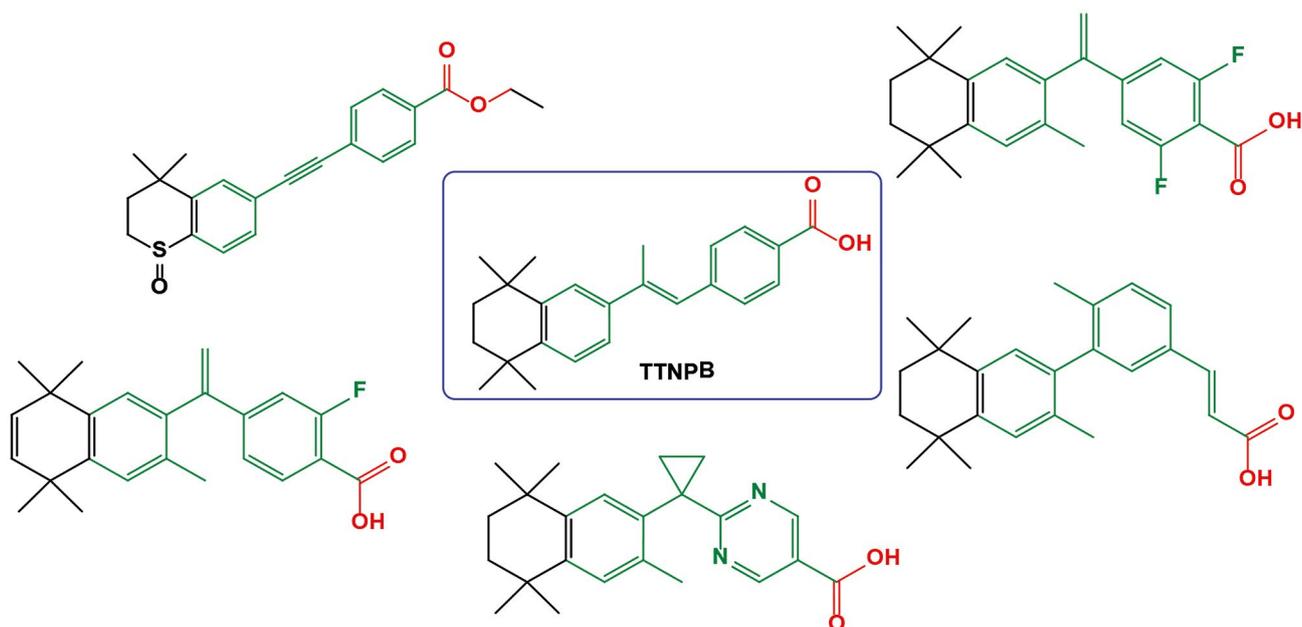


Рисунок 4. TTNPB и его структурные аналоги

Figure 4. TTNPB and its structural analogues

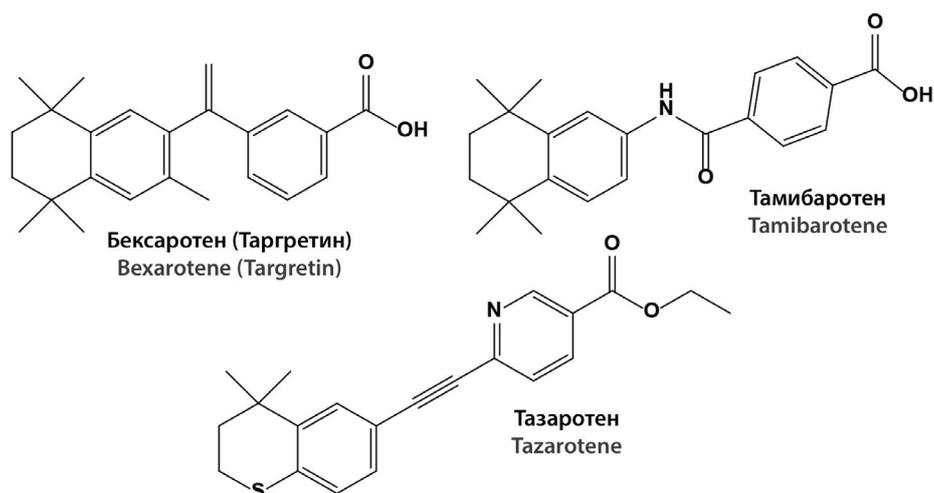


Рисунок 5. Структурные аналоги TTNPB, используемые в фармакологической практике

Figure 5. Structural analogues of TTNPB used in pharmacological practice

При этом бексаротен и тамибаротен используют в качестве противораковых средств: бексаротен – для лечения кожной Т-клеточной лимфомы и рака молочных желез, а тамибаротен – для лечения острого промиелоцитарного лейкоза и множественной миеломы. Механизм их действия основан на активации генов, кодирующих эндогенные факторы, защищающие организм от злокачественных клеток. Тазаротен используется преимущественно для лечения заболеваний кожи – псориаза, ихтиоза, акне и других. Исследуются также возможности применения бексаротена и тамибаротена для лечения болезни Альцгеймера и болезни Крона.

У ретиноидов третьего поколения сопровождающие лекарственное применение побочные эффекты, главными из которых являются гипотиреоз и повышение уровня липидов крови, выражены значительно слабее, чем у ретиноидов первого и второго поколений. В опытах на животных показан присущий производным ретиноевых кислот тератогенный эффект бексаротена. При использовании этих лекарств по жизненным показаниям такими отрицательными эффектами можно пренебречь, но лечение ретиноидами неврологических расстройств можно проводить только под наблюдением терапевта, контролируя

показатели крови по уровню триглицеридов и гормонов щитовидной железы. При этом было показано, что ретиноидная активность не всегда связана с резкими изменениями уровня липидов и с функционированием щитовидной железы [13].

Уже появились ретиноиды четвертого поколения, но область их применения ограничена в основном лечением заболеваний кожи. Главное достоинство этих препаратов – большая безопасность в практическом применении, чем у ретиноидов первого и второго поколений. В качестве примера можно привести адапален и трифаротен (рисунок 6).

Одна из последних разработок в области соединений с ретиноидной активностью для лечения возрастных и лучевых повреждений кожи представлена ретиноидом четвертого поколения, в составе которого нет карбоксильной группы (Seletinoid G, рисунок 6). Наружное применение средств на основе этого ретиноида ускоряет заживление ран, лечит возрастные изменения в соединительной ткани кожи и восполняет вызванный УФ-светом дефицит коллагена в молодой коже [14].

Хорошие клинические перспективы имеет новый ациклический ретиноид перетиноин (NIC-333) (рисунок 7).

Клинические исследования перетиноина по оценке профилактического эффекта при вторичной гепатоцеллюлярной карциноме показали, что пероральный прием препарата в течение 12 месяцев значительно уменьшал рецидив этой опухоли [15]. Интенсивно исследуется новый низкотоксичный ретиноид WYC-209 со свойствами агониста рецепторов RAR (рисунок 7). Он эффективно ингибирует клеточную пролиферацию различных опухолевых клеток меланомы мыши и блокирует более 80 % метастазов.

В целом можно отметить, что основные усилия синтетиков, работающих в области структурных аналогов ретиноевой кислоты, направлены преимущественно на получение соединений, которые можно отнести к структурной группе **ретинобензойные кислоты**, поскольку уже в ранних исследованиях было показано, что замена карбоксильной группы в составе претендентов на роль агонистов ретиноевых кислот на другие функциональные группы с кислотными свойствами лишает их рети-

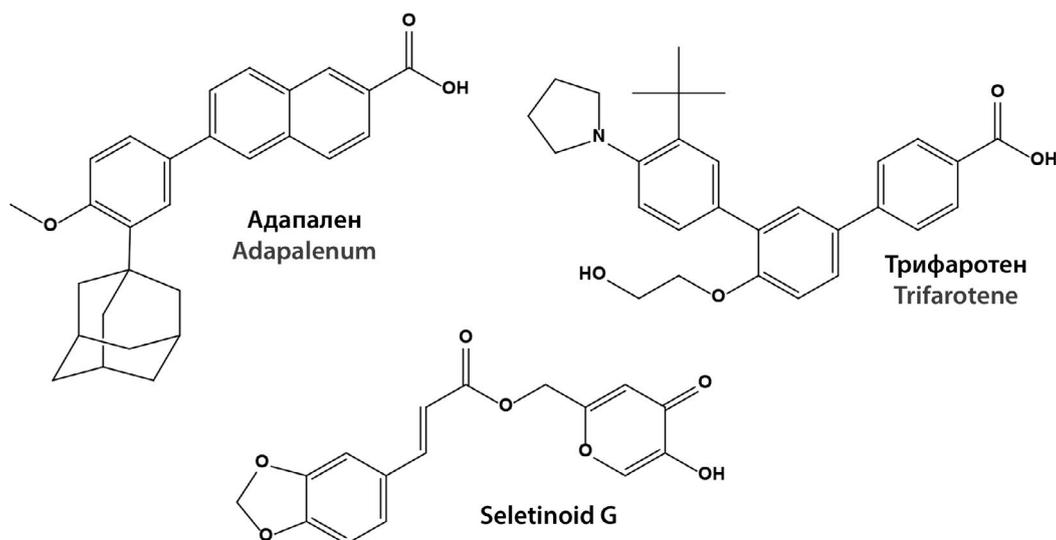


Рисунок 6. Структурные формулы ретиноидов четвертого поколения

Figure 6. Structural formulas of retinoids of the fourth generation

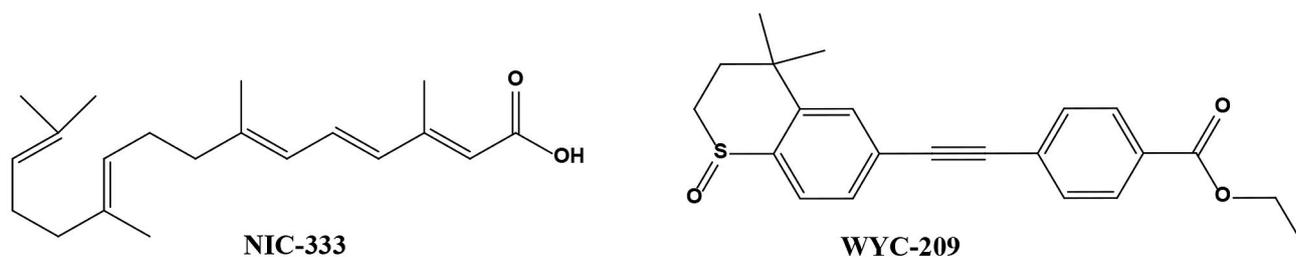


Рисунок 7. Структурная формула перетиноина (NIC-333) и ретиноида WYC-209

Figure 7. The structural formula of Peretinoin (NIC-333) and retinoid WYC-209

ноидной активности [16–18]. В частности, предполагалось, что введение в состав ретиноидов атомов галогенов повысит их избирательность и активность [19]. Были синтезированы также кремний- и германийорганические аналоги ретиноидов на основе тетраметилтетралина [20].

Накопленные данные по биологической активности ретиноидов показывают, что аномальная передача сигналов RXR влияет на стресс нервной системы и нейровоспалительные сети при нескольких невропатологических состояниях. Опосредованные рецепторами RXR защитные эффекты ретиноидов были установлены на различных клеточных и животных моделях повреждения нейронов, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, глаукому, рассеянный склероз и инсульт [21].

Еще на ранних стадиях изучения отклика организма на присутствие ретиноидов первого и второго поколений было отмечено их отрицательное воздействие на психику. В частности, этретинат и изотретиноин вызывали у пациентов депрессивный психоз с суицидальными настроениями [22]. В отличие от этого бексаротен помогает справиться с отрицательным воздействием на психическое состояние химио- и радиотерапии онкологических заболеваний, в основе которых лежит уменьшение плотности и структуры миелина в сенсомоторной коре и в поясной извилине головного мозга [23]. В опытах на мышах вызванное введением цисплатина нарушение когнитивных и сенсомоторных функций нормализовалось пятью дозами бексаротена. Кроме того, в терапевтических дозах на два порядка ниже тех, которые используются для лечения онкологических заболеваний, бексаротен защищает дофаминэргические отделы головного мозга, отвечающие за развитие паркинсонизма [24]. В опытах на приматах и мышах с меченным по карбоксильной группе бексаротеном было показано, что он проходит через гематоэнцефалический барьер [25] и в дозах 1 мг/кг/день его положительный эффект на дофаминэргических нейронах не сопровождается повышением уровня триглицеридов в крови. Активация рецепторов RXR бексаротеном ослабляла нейровоспаление и улучшала неврологический дефицит после субарахноидального кровоизлияния [26].

Значительное количество представленных в литературе данных подтверждает, что нарушение регуляции ретиноидной системы вовлечено также в этиологию шизофрении [27].

Нарушенная сигнализация ретиноидов и недостаток аполипопротеина E непосредственно ассоциируются с болезнью Альцгеймера. В опытах на мышах с экспериментальной болезнью Альцгеймера бексаротен индуцирует выведение из мозга β -амилоида вследствие активации гена аполипопротеина E – главного, связанного с возрастом генетического фактора риска болезни Альцгеймера. В лабораторных экспериментах и в опытах на животных по-

казано действие бексаротена на рецепторы RXR, а не на сам β -амилоид или на гематоэнцефалический барьер. Трансгенные мыши с экспериментальной болезнью Альцгеймера демонстрировали улучшение познавательных и поведенческих функций на фоне введения бексаротена [28–30].

Эти дополнительные эффекты показывают, что терапевтические возможности ретиноидов третьего поколения не исчерпаны. Многочисленные публикации, посвященные этому классу фармакологически активных веществ, практически не затрагивают возможность модификации их структур за счет получения производных по карбоксильной группе. Этиловый эфир ретиноидов применялись в качестве пролекарств с самого начала их использования в терапии. Фенретинид представляет собой 4-гидрокси-фениламид ретиноевой кислоты. Этиловым эфиром является ретиноид третьего поколения тазаротен. Есть публикация по противораковой активности ацилированного бексаротеном дофамина [31] и патент на получение производных ретиноидов третьего поколения с улучшенной проницаемостью через клеточные мембраны [32].

В ряде исследований последних лет, использующих стратегию мультитаргетной терапии, ретиноидный фрагмент комбинировали с молекулами, имеющими иной механизм физиологического действия. В частности, были получены производные тамибаротена, в структуре которых через небольшие линкеры его карбоксильная группа соединялась с эфирами и амидами вальпроевой кислоты, используемой в терапии заболеваний, ассоциированных с нарушением работы синапсов торможения (рисунок 8) [33].

В другом подобном исследовании фрагмент тамибаротена комбинировали с донорами монооксида азота в виде оксофуросанового структурного элемента [34]. В частности, соединение, в котором линкером между ретиноидным и оксофуросановым структурными элементами является остаток глицина (рисунок 8), заметно превосходило тамибаротен по антипролиферативной активности по отношению к трем исследованным линиям клеток лейкемии человека.

Примеры модификации структуры ретиноидов третьего поколения с образованием производных по карбоксильной группе показывают возможность получения новых биологически активных соединений – проретиноидов, механизм действия которых может быть опосредован их превращением в ретиноиды в определенных тканях в результате избирательной сорбции и избирательной биотрансформации с образованием ретиноидов. Так, например, получены эфиры бексаротена с алифатическими спиртами с числом атомов углерода от одного до восемнадцати, а также ацилированные по гидроксильной группе бексаротеном соединения с амидными, аминными и карбонатными функциональными группами

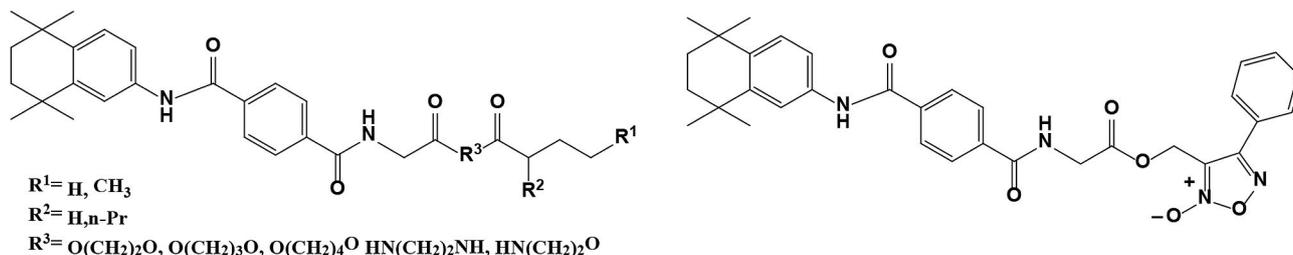


Рисунок 8. Мультицелевые производные тамибаротена

Figure 8. Multitarget derivatives of tamibarotene

с целью получения производных, накапливающихся и гидролизующихся в лимфатической системе кишечника с образованием бексаротена (рисунок 9). Лимфатическая система кишечника играет важную роль в патофизиологии таких заболеваний, как лимфомы, метастазы рака, аутоиммунные заболевания и СПИД. Введение представленного на рисунке 9 вещества обеспечивало достижение семнадцатикратной концентрации бексаротена в сосудах лимфатической системы кишечника в сравнении с введением самого бексаротена [35].

Аналогичный пролекарственный подход использовался для ограничения действия бексаротена клетками центральной нервной системы. Известно, что при нейродегенеративных заболеваниях в пораженных областях мозга повышена активность NAD(P)H/хиноноксидредуктазы (NQO1), субстратами которой являются, например, индолхиноны. В соответствии с этим были синтезированы эфиры бексаротена с общей формулой, представленной на рисунке 9. Эти вещества не расщепляются эстеразами, но в присутствии фермента NQO1 они подвергаются окислительно-восстановительным превращениям с образованием бексаротена [49]. Это означает, что биотрансформация этих производных с образованием бексаротена в клетках, в которых отсутствует этот фермент, сведена к минимуму.

Направление, связанное с избирательной сорбцией и избирательным превращением амидов и эфиров ретиноидов третьего поколения в соответствующие ретиноиды, может стать основой для получения новых средств для лечения нейродегенеративных заболеваний. В частности, противоречивость

данных по возможности использования бексаротена для лечения болезни Альцгеймера может быть следствием введения его в состав средств с разной биодоступностью активного вещества. Кроме того, у производных ретиноидов могут проявляться новые механизмы действия, как это было показано на примере фенретинида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом можно отметить, что в основе синтеза структурных аналогов пространственных изомеров ретиноевой кислоты лежит дизайн соединений с высокой избирательностью по отношению к определенным рецепторам и тканям. Это исключает мультицелевое действие естественных ретиноидов.

Ретиноиды обладают потенциалом для терапии различных пролиферативных заболеваний. Задача новых исследований состоит в том, чтобы расширить спектр их применения для лечения вирусных, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Black R. E., Allen L. H., Bhutta Z. A., Caulfield L. E., Onis M., Ezziati M., Mathers C., Rivera J. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *The Lancet*. 2008;371(9608):243–260. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61690-0.
2. Blomhoff R., Blomhoff H. K. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology*. 2006;66(7):606–630. DOI: 10.1002/neu.20242.
3. Liu Z., Wang J., Xu Q., Hong Q., Zhu J., Chi X. Research Progress in Vitamin A and Autism Spectrum Disorder. *Behavioural Neurology*. 2021;2021:5417497. DOI: 10.1155/2021/5417497.
4. Pouso M. R., Cairrao E. Effect of retinoic acid on the neurovascular unit: a review. *Brain Research Bulletin*. 2022;15;184:34–45. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2022.03.011.

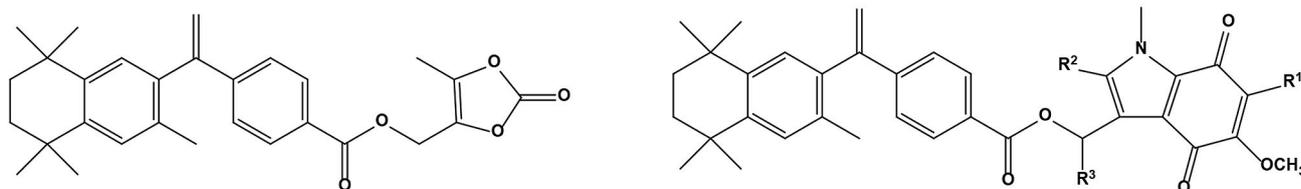


Рисунок 9. Производное бексаротена с пролекарственным принципом действия

Figure 9. A derivative of Bexarotene with a prodrug principle of action

- Reay W. R., Cairns M. J. The role of the retinoids in schizophrenia: genomic and clinical perspectives. *Molecular Psychiatry*. 2020;25(4):706–718. DOI: 10.1038/s41380-019-0566-2.
- Zhang Y., Wang T., Hu X., Chen G. Vitamin A and Diabetes. *Journal of Medicinal Food*. 2021;24(8):775–785. DOI: 10.1089/jmf.2020.0147.
- Das B. C., Thapa P., Karki R., Das S., Mahapatra S., Liu T.-C., Torregroza I., Wallace D. P., Kambhampati S., Van Veldhuizen P., Verma A., Ray S. K., Evans T. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014;22(2):673–683. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.11.025.
- Uray I. P., Dmitrovsky E., Brown P. H. Retinoids and rexinoids in cancer prevention: from laboratory to clinic. *Seminars in Oncology*. 2016;43(1):49–64. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.09.002.
- Sarohan A. R., Tuncar A., Sarohan A. Multi-receptor mechanism and retinoid signaling disorder in the pathogenesis of COVID-19. *Science Open Preprints*. 2022. DOI: 10.1590/SciELOPreprints.3863.
- Fidan O., Mujwar S., Kciuk M. Discovery of adapalene and dihydrotachysterol as antiviral agents for the Omicron variant of SARS-CoV-2 through computational drug repurposing. *Molec. Diversity*. 2023;27(1):463–475. DOI: 10.1007/s11030-022-10440-6.
- Orienti I., Armida M., Dobrowolny G., Pepponi R., Sollazzi G., Pezzola A., Casola I., Musarò A., Popoli P., Potenza R. L. Fenretinide Beneficial effects on amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1G93A mutant protein toxicity: in vitro and in vivo evidences. *Neuroscience*. 2021;473:1–12. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.07.033.
- Loeliger P., Bollag W., Mayer H. ChemInform Abstract: Arotinoids, a new class of highly active retinoids. *Chemischer Informationsdienst*. 1980;11(24). DOI: 10.1002/chin.198024145.
- Marshall P. A., Jurutka P. W., Wagner C. E., van der Vaart A., Kaneko I., Chavez P. I., Ma N., Bhogal J. S., Shahani P., Swierski J. C., MacNeill M. Analysis of differential secondary effects of novel rexinoids: select rexinoid X receptor ligands demonstrate differentiated side effect profiles. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2015;3(2):e00122. DOI: 10.1002/prp2.122.
- Lee E.-S., Ahn Y., Bae I.-H., Min D., Park N. H., Jung W., Kim S.-H., Hong Y. D., Park W. S., Lee C. S. Synthetic Retinoid Seletinoid G Improves Skin Barrier Function through Wound Healing and Collagen Realignment in Human Skin Equivalents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(9):3198. DOI: 10.3390/ijms21093198.
- Xin C., Quanlin A., Yehuda G. A., Xiangdong W. Retinoids offer new and promising cancer therapeutic avenues. *Journal of Molecular and Clinical Medicine*. 2019;2(2):23–28. DOI: 10.31083/j.jmcm.2019.02.9161.
- Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K., Himi T. Retinobenzoic acids. 1. Structure-activity relationships of aromatic amides with retinoidal activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1988;31(11):2182–2192. DOI: 10.1021/jm00119a021.
- Yamakawa T., Kagechika H., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K. Retinobenzoic acids. 5. Retinoidal activities of compounds having a trimethylsilyl or trimethylgermyl group(s) in human promyelocytic leukemia cells HL-60. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1990;33(5):1430–1437. DOI: 10.1021/jm00167a024.
- Boehm M. F., Zhang L., Badea B. A., White S. K., Mais D. E., Berger E., Suto C. M., Goldman M. E., Heyman R. A. Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1994;37(18):2930–2941. DOI: 10.1021/jm00044a014.
- Furmick J. K., Kaneko I., Walsh A. N., Yang J., Bhogal J. S., Gray G. M., Baso J. C., Browder D. O., Prentice J. L. S., Montano L. A., Huynh C. C., Marcus L. M., Tsosie D. G., Kwon J. S., Quezada A., Reyes N. M., Lemming B., Saini P., van der Vaart A., Groy T. L., Marshall P. A., Jurutka P. W., Wagner C. E. Modeling, synthesis and biological evaluation of potential retinoid X receptor-selective agonists: novel halogenated analogues of 4-[1-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)ethynyl]benzoic Acid (Bexarotene). *ChemMedChem*. 2012;7(9):1551–1566. DOI: 10.1002/cmdc.201200319.
- Lippert W. P., Burschka C., Götz K., Kaupp M., Ivanova D., Gaudon C., Sato Y., Antony P., Rochel N., Moras D., Gronemeyer H., Tacke R. Silicon analogues of the RXR-selective retinoid agonist SR11237 (BMS649): Chemistry and Biology. *ChemMedChem*. 2009;4(7):1143–1152. DOI: 10.1002/cmdc.200900090.
- Sharma S., Shen T., Chitranshi N., Gupta V., Basavarajappa D., Sarkar S., Mirzaei M., You Yu., Krezel W., Graham S. L., Gupta V. Retinoid X receptor: cellular and biochemical roles of nuclear receptor with a focus on neuropathological involvement. *Molecular Neurobiology*. 2022;59(4):2027–2050. DOI: 10.1007/s12035-021-02709-y.
- Hu P., van Dam A.-M., Wang Y., Lucassen P. J., Zhou J.-N. Retinoic acid and depressive disorders: Evidence and possible neurobiological mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2020;112:376–391. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2020.02.013.
- Chiang A. C. A., Seua A. V., Singhmar P., Arroyo L. D., Mahalingam R., Hu J., Kavelaars A., Heijnen C. J. Bexarotene normalizes chemotherapy-induced myelin decompaction and reverses cognitive and sensorimotor deficits in mice. *Acta Neuropathologica Communications*. 2020;8(1):193. DOI: 10.1186/s40478-020-01061-x.
- McFarland K., Spalding T. A., Hubbard D., Ma J.-N., Olsson R., Burstein E. S. Low dose bexarotene treatment rescues dopamine neurons and restores behavioral function in models of Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 2013;4(11):1430–1438. DOI: 10.1021/cn400100f.
- Rotstein B. H., Hooker J. M., Woo J., Collier T. L., Brady T. J., Liang S. H., Vasdev N. Synthesis of [11C]Bexarotene by Cu-mediated [11C]carbon dioxide fixation and preliminary PET imaging. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2014;5(6):668–672. DOI: 10.1021/ml500065q.
- Zuo Y., Huang L., Enkhjargal B., Xu W., Umut O., Travis Z. D., Zhang G., Tang J., Liu F., Zhang J. H. Activation of retinoid X receptor by bexarotene attenuates neuroinflammation via PPAR γ /SIRT6/FoxO3a pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16(1):47. DOI: 10.1186/s12974-019-1432-5.
- Reay W. R., Cairns M. J. The role of the retinoids in schizophrenia: genomic and clinical perspectives. *Molecular Psychiatry*. 2019;25(4):706–718. DOI: 10.1038/s41380-019-0566-2.
- Eftekhari A., Shanebandi D., Hoseinnejhad S., Ceferov Z., Asefy Z. Retinoids as Potential Therapeutic Approach in Prevention of Alzheimer's Disease. *Annals of Clinical and Laboratory Research*. 2021;9(9):371. DOI: 10.36648/2386-5180.21.9.371.
- Vidal V., Puente A., García-Cerro S., García Unzueta M. T., Rueda N., Riancho J., Martínez-Cué C. Bexarotene impairs cognition and produces hypothyroidism in a mouse model of down syndrome and Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12. DOI: 10.3389/fphar.2021.613211.
- Miziak B., Błaszczyk B., Czuczwar S. J. Some candidate drugs for pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals*. 2021;14(5):458. DOI: 10.3390/ph14050458.
- Gretskaya N. M., Gamisonia A. M., Dudina P. V., Zakharov S. S., Sherstyanikh G., Akasov R., Burov S., Serkov I. V., Akimov M. G., Bezuglov V. V., Markvicheva E. Novel bexarotene derivatives: Synthesis and cytotoxicity evaluation for glioma cells in 2D and 3D in vitro models. *European Journal of Pharmacology*. 2020;883:173346. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173346.
- Yu C. Positively charged water-soluble prodrugs of retinoids and retinoid-like compounds with very high skin penetration rates. Patent № CA2972344C. Available at: <https://patents.google.com/patent/CA2972344C/en>. Accessed: 25.09.2023.
- Bian H., Feng J., Xu W. Synthesis and biological evaluation of novel AM80 derivatives as antileukemic agents. *Medicinal Chemistry Research*. 2013;22(1):175–185. DOI: 10.1007/s00044-012-0019-9.
- Bian H., Feng J., Li M., Xu W. Novel antileukemic agents derived from tamibarotene and nitric oxide donors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011;21(23):7025–7029. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.09.103.
- Lee J. B., Zgair A., Malec J., Kim T. H., Kim M. G., Ali J., Qin C., Feng W., Chiang M., Gao X., Voronin G., Garces A. E., Lau C. L., Chan T.-H., Hume A., McIntosh T. M., Soukariéh F., Al-Hayali M., Cipolla E., Collins H. M., Heery D. M., Shin B. S., Yoo S. D., Kagan L., Stocks M. J., Bradshaw T. D., Fischer P. M., Gershkovich P. Lipophilic activated ester prodrug approach for drug delivery to the intestinal lymphatic system. *Journal of Controlled Release*. 2018;286:10–19. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.07.02.
- Schäfer A., Burstein E. S., Olsson R. Bexarotene prodrugs: targeting through cleavage by NQO1 (DT-diaphorase). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014;24(8):1944–1947. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.03.003.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592>
УДК 615.356:577.161.11



Оригинальная статья / Research article

Могут ли биолюминесцентные бактерии быть использованы для поиска новых антибактериальных веществ растительного происхождения?

А. М. Кацев, С. Л. Сафронюк, Е. В. Бурцева ✉, С. Я. Османова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (КФУ имени В. И. Вернадского). 295007, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, просп. Академика Вернадского, д. 4

✉ Контактное лицо: Бурцева Елена Владимировна. E-mail: burtsevaev2009@yandex.ru

ORCID: А. М. Кацев – <https://orcid.org/0000-0002-7762-3818>; С. Л. Сафронюк – <https://orcid.org/0000-0002-6276-7755>;
Е. В. Бурцева – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>; С. Я. Османова – <https://orcid.org/0009-0005-7494-1609>.

Статья поступила: 04.10.2023

Статья принята в печать: 10.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. В настоящее время поиск новых антибактериальных веществ является актуальной задачей из-за растущей устойчивости патогенов к существующим антибиотикам. Одним из ключевых направлений в этой области является расширение научных исследований лекарственного сырья растительного происхождения в качестве новых источников терапевтических средств. В данной работе изучается возможность применения для этих целей высокочувствительных бактериальных тест-объектов, обладающих биолюминесценцией, которые позволяют быстро выявить неспецифическую антимикробную активность и могут быть адаптированы к технологиям высокопроизводительного фармацевтического скрининга.

Цель. Изучение применимости биолюминесцентных бактерий для анализа антибактериальной активности биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения.

Материалы и методы. В работе использовали биологически активные вещества кверцетин, 8-гидроксихинолин, галловую кислоту и тимохинон, которые часто встречаются в лекарственном растительном сырье и с которыми связывают его антибактериальные свойства. В качестве тест-объектов использовали бактерии с конститутивной биолюминесценцией *Aliivibrio fischeri* F1 и *Escherichia coli* (pXen7), а также рекомбинантные биорепортерные штаммы с индуцибельным свечением: *E. coli* (pRecA-lux), *E. coli* (pColD-lux), реагирующие на повреждение нуклеиновых кислот; *E. coli* (pKatG-lux), *E. coli* (pSoxS-lux), чувствительные к окислительному стрессу.

Результаты и обсуждение. Установлено, что неспецифическая антимикробная активность исследуемых БАВ проявляется в ингибировании бактериальной биолюминесценции тест-штаммов с конститутивным свечением. Отмечено, что морские тест-бактерии *A. fischeri* F1 обладают значительно большей чувствительностью к действию БАВ растительного происхождения по сравнению с рекомбинантным штаммом *E. coli* (pXen7). Показано, что их ингибирующее действие начинается при концентрациях 2 мкг/мл, а бактерицидность наступает при концентрациях от 20 мкг/мл. Приводится сравнение полученных результатов с данными по МИК и МБК грамположительных и грамотрицательных патогенов. Изучение индукции биолюминесценции рекомбинантных биорепортерных штаммов показало, что антибактериальное действие исследуемых БАВ сопровождается окислительным стрессом. Также кверцетин вызывал активацию свечения *E. coli* (pRecA-lux) и *E. coli* (pColD-lux), что может свидетельствовать о его участии в повреждении нуклеиновых кислот. Анализ факторов индукции биорепортерных штаммов указывает на то, что выявленные механизмы антибактериальной активности не являются основными, а могут иметь второстепенный характер.

Заключение. Показано, что интенсивность свечения природных и рекомбинантных биолюминесцентных бактерий может быть показателем антибактериальной активности БАВ природного происхождения. Установлена высокая чувствительность бактерий *A. fischeri* F1 к действию таких веществ, как кверцетин, 8-гидроксихинолин, галловая кислота и тимохинон. Учитывая, что биолюминесцентный анализ является количественным инструментальным методом, он может быть легко адаптирован для проведения высокопроизводительного фармацевтического скрининга.

Ключевые слова: люминесцентные бактерии, биолюминесцентные биорепортеры, биологически активные вещества, лекарственное растительное сырье

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

Вклад авторов. А. М. Кацев, С. Л. Сафронюк и Е. В. Бурцева отвечали за общий дизайн эксперимента, обработку и интерпретацию полученных данных. Основные эксперименты с использованием *A. fischeri* F1 и *E. coli* (pXen7) были проведены А. М. Кацевым и С. Я. Османовой. Эксперименты с биорепортерными рекомбинантными бактериями были проведены С. Л. Сафронюком. Е. В. Бурцева проводила обработку данных. Литературный поиск, подготовка и корректировка рукописи выполнены всеми авторами. Научная идея принадлежит А. М. Кацеву.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20206, <https://rscf.ru/project/22-25-20206>.

Для цитирования: Кацев А. М., Сафронюк С. Л., Бурцева Е. В., Османова С. Я. Могут ли биолюминесцентные бактерии быть использованы для поиска новых антибактериальных веществ растительного происхождения? *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):63–70. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592>

© Кацев А. М., Сафронюк С. Л., Бурцева Е. В., Османова С. Я., 2023

© Katsev A. M., Safronyuk S. L., Burtseva Y. V., Osmanova S. Y., 2023

Could Bioluminescent Bacteria be Used in the Search for New Plant-derived Antibacterial Substances?

Andrei M. Katsev, Sergey L. Safronyuk, Yelena V. Burtseva✉, Selina Y. Osmanova

V. I. Vernadsky Crimean Federal University. 4, Akademika Vernadskogo ave., Republic of Crimea, Simferopol, 295007, Russia

✉ Corresponding author: Yelena V. Burtseva. E-mail: burtsevaev2009@yandex.ru

ORCID: Andrei M. Katsev – <https://orcid.org/0000-0002-7762-3818>; Sergey L. Safronyuk – <https://orcid.org/0000-0002-6276-7755>;
Yelena V. Burtseva – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>; Selina Y. Osmanova – <https://orcid.org/0009-0005-7494-1609>.

Received: 04.10.2023

Revised: 10.11.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Currently, the search for new antibacterial substances is an urgent task due to the growing resistance of pathogens to existing antibiotics. One of the key directions in this area is the expansion of scientific research of medicinal plants, as new sources of therapeutic agents. This article examines the possibility of using highly sensitive bioluminescent test bacteria for these purposes, which can quickly detect non-specific antimicrobial activity and can be adapted to highly effective pharmaceutical screening technologies.

Aim. To study the applicability of bioluminescent bacteria for the analysis of the antibacterial activity of biologically active substances (BAS) of plant origin.

Materials and methods. BAS quercetin, 8-hydroxyquinoline, gallic acid and thymoquinone, which are often found in medicinal plant raw materials and with which its antibacterial properties are associated, were used in the work. Bacteria with constitutive bioluminescence *Aliivibrio fischeri* F1 and *Escherichia coli* (pXen7), as well as recombinant bioreporter strains with inducible luminescence were used as test-objects: *E. coli* (pRecA-lux), *E. coli* (pColD-lux), reacting to nucleic acid damage; *E. coli* (pKatG-lux) and *E. coli* (pSoxS-lux), sensitive to oxidative stress.

Results and discussion. It was found that the nonspecific antimicrobial activity of the studied BAS is manifested in the inhibition of bacterial bioluminescence of test-strains with constitutive glowing. It was noted that the marine test-bacteria *A. fischeri* F1 have significantly greater sensitivity to the action of BAS, compared with the recombinant strain of *E. coli* (pXen7). It has been shown that their inhibitory effect begins at concentrations of 2 mcg/ml, and bactericidal activity occurs at concentrations of more than 20 mcg/ml. The results obtained are compared with the data on MIC and MBC of gram(+) and gram(-) pathogens. The study of the induction of bioluminescence of recombinant bioreporter strains showed that the antibacterial effect of the BAS is accompanied by oxidative stress. Also, quercetin caused activation of luminescence in *E. coli* (pRecA-lux) and *E. coli* (pColD-lux), which may indicate its participation in damage to nucleic acids. Analysis of the induction factors of bioreporter strains indicates that the revealed mechanisms of antibacterial activity are not major, but may be of a secondary nature.

Conclusion. It has been shown that the intensity of the glow of natural and recombinant bioluminescent bacteria can be an indicator of the antibacterial activity of BAS of natural origin. The high sensitivity of *A. fischeri* F1 bacteria to the action of substances such as quercetin, 8-hydroxyquinoline, gallic acid and thymoquinone has been shown. Considering that bioluminescence analysis is a quantitative instrumental method, it can be easily adapted for high-throughput pharmaceutical screening. It has been shown that the luminescence intensity of natural and recombinant bioluminescent bacteria can be an indicator of the antibacterial activity of BAS of natural origin. The high sensitivity of *A. fischeri* F1 to the action of substances such as quercetin, 8-hydroxyquinoline, gallic acid and thymoquinone has been established. Taking in an account that bioluminescent analysis is a quantitative instrumental method, it can be easily adapted for high-throughput pharmaceutical screening.

Keywords: luminescent bacteria, bioluminescent bioreporters, biologically active substances

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 M. Katsev, Sergey L. Safronyuk and Yelena V. Burtseva were responsible for the overall design of the experiment, processing and interpretation of the data obtained. The main experiments using *A. fischeri* F1 and *E. coli* (pXen7) were conducted by Andrei M. Katsev and Selina Y. Osmanova. Experiments with bioreporter recombinant bacteria were conducted by Sergey L. Safronyuk. Yelena V. Burtseva conducted data processing. Literary search, preparation and correction of the manuscript were carried out by all authors. The scientific idea belongs to Andrei M. Katsev.

Funding. The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Fund № 22-25-20206, <https://rscf.ru/project/22-25-20206>.

For citation: Katsev A. M., Safronyuk S. L., Burtseva Y. V., Osmanova S. Y. Could bioluminescent bacteria be used in the search for new plant-derived antibacterial substances? *Drug development & registration*. 2023;12(4):63–70. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время поиск новых антибактериальных веществ является актуальной задачей из-за растущей устойчивости патогенов к существующим антибиотикам [1]. Одним из ключевых направлений в этой области является расширение научных исследований лекарственного сырья растительного происхождения в качестве новых источников терапевтических средств. Считается, что фитопрепа-

раты обладают рядом преимуществ по сравнению с синтетическими лекарственными средствами: широким спектром терапевтического действия и безопасностью, более низким риском развития аллергических реакций, более мягким терапевтическим эффектом [2, 3]. Многие биологически активные вещества (БАВ) растительного происхождения, такие как дубильные вещества, терпеноиды, алкалоиды и флавоноиды, продемонстрировали антибактериальные и противовирусные эффекты в экспериментах на

животных и *in vitro*. Однако несмотря на то, что от 25 до 50 % современных фармацевтических препаратов получают из растений, на данный момент нет коммерчески успешного антибиотика, который был бы получен из растительного сырья [4].

Учитывая разнообразие патогенных микроорганизмов и их различную чувствительность к антибактериальным веществам, задача обнаружения и выделения таких веществ из растительного сырья представляется крайне сложной [4]. На наш взгляд, перспективным направлением может стать использование высокочувствительных тест-объектов, которые позволяют быстро выявить неспецифическую антимикробную активность и могут быть адаптированы к технологиям высокопроизводительного фармацевтического скрининга (high-throughput screening). Антибактериальная активность отобранных таким образом растений (вытяжек) далее может быть исследована более детально с применением стандартных или клинических патогенных штаммов микроорганизмов.

В качестве таких тест-объектов, которые обладают высокой чувствительностью и позволяют быстро выявить антибактериальную активность, в данной работе исследуются биолюминесцентные природные (морские) бактерии и ряд рекомбинантных биорепортерных штаммов на основе *E. coli*.

Цель работы: изучить применимость биолюминесцентных бактерий для анализа антибактериальной активности БАВ растительного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения антибактериального действия использовали БАВ различных классов, которые часто встречаются в лекарственном растительном сырье и с которыми связывают его антибактериальные свойства [3, 5]. Было изучено действие таких веществ, как кверцетин, 8-гидроксихинолин, галловая кислота и тимохинон (Sigma-Aldrich, США) (рисунок 1).

Для приготовления исходных растворов БАВ использовали такие растворители, как вода, этанол (ООО «Компонент-Реактив», Россия) и ДМСО (х. ч.,

ООО «Компонент-Реактив», Россия), которые применяются для получения вытяжек из лекарственного растительного сырья [6]. Пробы для проведения биотестирования готовили путем добавления полученных концентрированных растворов БАВ (20 мг/мл) к водным растворам NaCl (3 % для морских бактерий и 1 % для рекомбинантных штаммов) до конечных концентраций активного компонента 0,005–0,5 мг/мл. Дополнительно пробы содержали буфер 0,05 моль/л трис-HCl, pH = 7,0. Учитывая низкую растворимость кверцетина в воде, его биологическое действие изучалось в форме суспензий, которые образовывались в процессе пробоподготовки. Остальные БАВ исследовались в виде растворов, близких к истинным.

Анализ антибактериальной активности БАВ проводился биотестированием на природных и рекомбинантных биолюминесцентных тест-бактериях, обладающих способностью излучать свет в видимой области. В работе использовали морские светящиеся бактерии *Aliivibrio fischeri* F1 из коллекции культур биолюминесцентных бактерий, созданной и поддерживаемой лабораторией биохемилюминесцентных аналитических технологий (ЛБАТ) Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Бактерии были выделены из среды Черного моря и идентифицированы ранее с использованием микробиологических и биохимических методов [7].

Также в работе использовали пять рекомбинантных штаммов бактерии на основе *E. coli* MG1655 (*E. coli*), которые были сконструированы и любезно предоставлены для работы заведующим лабораторией молекулярной генетики МФТИ д. б. н. И. В. Мануховым. Для индуцибельных штаммов (биорепортеры) в качестве положительных контролей (K+), активирующих специфические промоторы и запускающих биолюминесценцию, использовали диоксидин (АО «Новосибхимформ», Россия) и перекись водорода (ОАО «Самарамедпром», Россия) в концентрациях 0,045 и 0,15 мМ соответственно [8].

Биотестирование на светящихся бактериях проводилось путем измерения интенсивности биолюминесценции по методикам, описанным ранее [9], а так-

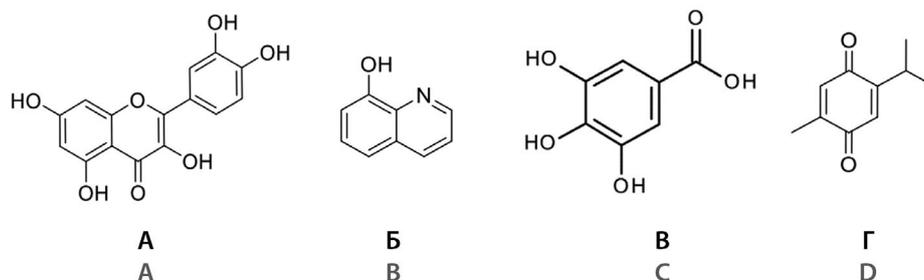


Рисунок 1. БАВ растительного происхождения, используемые в работе:

А – кверцетин; Б – 8-гидроксихинолин; В – галловая кислота; Г – тимохинон

Figure 1. Biologically active substances (BAS) of plant origin used in the work:

A – quercetin; B – 8-hydroxyquinoline; C – gallic acid; D – thymoquinone

же в соответствии со стандартом ISO11348-1:2007/Amd 1:2018¹. Анализ заключался в количественной оценке ингибирования свечения бактерий с конститутивным типом биолюминесценции [*A. fischeri* F1, *E. coli* (pXen7)] в зависимости от времени и концентрации БАВ. Результаты оценивали в виде эффективных концентраций веществ, ингибирующих биолюминесценцию на 50 % (ЭК₅₀).

Для оценки бактерицидного действия использовали спот-тест [10]. Тест-бактерии подвергались воздействию БАВ в течение суток при температуре 25 °С, после чего производили их высеив на плотную питательную среду путем нанесения по 3 мкл каждой пробы на поверхность питательного агара (M001, HiMedia, Индия). Через сутки роста при оптимальной для каждого вида бактерий температуре на поверхности агара образовывались зоны роста, которые оценивали визуально и фотографировали на свету и в темноте для оценки роста и биолюминесценции. Снижение интенсивности или исчезновение роста и биолюминесценции оценивали как проявления бактерицидности.

Биотестирование БАВ на рекомбинантных биорепортерных штаммах проводили для выявления возможных механизмов антибактериального действия, связанных с окислительным стрессом или тропностью к нуклеиновым кислотам, по методикам, описанным ранее [11]. Результаты измерения биолюминесценции выражали в виде биолюминесцентного индекса (БИ), как отношение интенсивностей биолюминесценции в пробе (I) и контроле (I₀): БИ = I/I₀.

Измерение интенсивности биолюминесценции проводили с использованием биолюминометров БЛМ-8801 (СКТБ «Наука», Россия) или Lum-100 (ООО «ДИСофт», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие БАВ на морские биолюминесцентные бактерии. Такие бактерии, а именно *A. fischeri*, широко используются во всем мире в качестве биотеста для выявления био-(эко-)токсичности в отношении водных организмов [12, 13]. Детекция осуществляется инструментально, путем оценки интенсивности свечения как показателя общего метаболизма бактериальной клетки. Предприняты попытки использовать такой биотест и для выявления токсичности по отношению к высшим организмам, антимикробной активности веществ синтетического и природного происхождения, а также лекарственного растительного сырья [13, 14]. Для ряда БАВ описываются корреляции между их действием на бактериальную биолюминесценцию и токсичностью для человека

¹ Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 1: Method using freshly prepared bacteria. ISO 11348-1:2007/Amd 1:2018. Available at: <https://www.iso.org/standard/40516.html/> Accessed: 26.10.2023.

и животных [13]. Однако применимость светящихся тест-бактерий для выявления антибактериальной активности лекарственных веществ в целом неоднозначна и является предметом исследований.

На рисунке 2 показано действие кверцетина на биолюминесценцию *A. fischeri* F1 через 30 мин воздействия. В целом кверцетин эффективно ингибировал биолюминесценцию тест-бактерии с ЭК₅₀ = 2–4 мкг/мл и вызывал полное тушение свечения при концентрациях 5–10 мкг/мл. Спиртовые и ДМСО-растворы обладали более сильным эффектом по сравнению с водными растворами, что, очевидно, связано с лучшей растворимостью кверцетина в органических растворителях. При этом действие самих растворителей исключалось малыми объемами вносимых проб и внесением их в контрольные пробы.

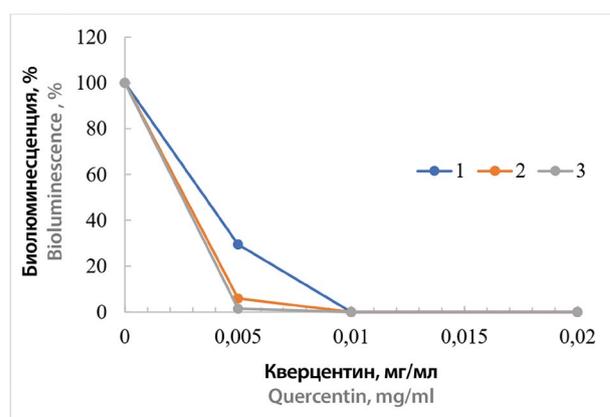


Рисунок 2. Действие кверцетина в различных растворителях на биолюминесценцию *A. fischeri* F1:

1 – вода; 2 – спирт 96%-й; 3 – ДМСО

Figure 2. The effect of quercetin in various solvents on the bioluminescence of *A. fischeri* F1:

1 – water; 2 – ethanol 96 %; 3 – DMSO

Еще одним типом биолюминесцентных тест-бактерий, которые используются при биотестировании, являются рекомбинантные бактерии с внедренными генами семейства Lux, кодирующими необходимые для свечения ферменты [11, 12]. Они делятся на тест-объекты с конститутивным типом биолюминесценции, которые используются аналогично природным фотобактериям, а также тест-штаммы, в которых гены Lux активируются специфическими промоторами. В данной работе наряду с морскими тест-бактериями *A. fischeri* F1 использовали рекомбинантный тест-штамм с конститутивной биолюминесценцией *E. coli* (pXen7). Исследования показали, что чувствительность этого тест-объекта к действию тестируемых веществ была значительно ниже, чем бактерий *A. fischeri* F1 (рисунок 3). Можно также отметить, что галловая кислота практически не оказывает влияние на биолюминесценцию *E. coli* (pXen7) при кон-

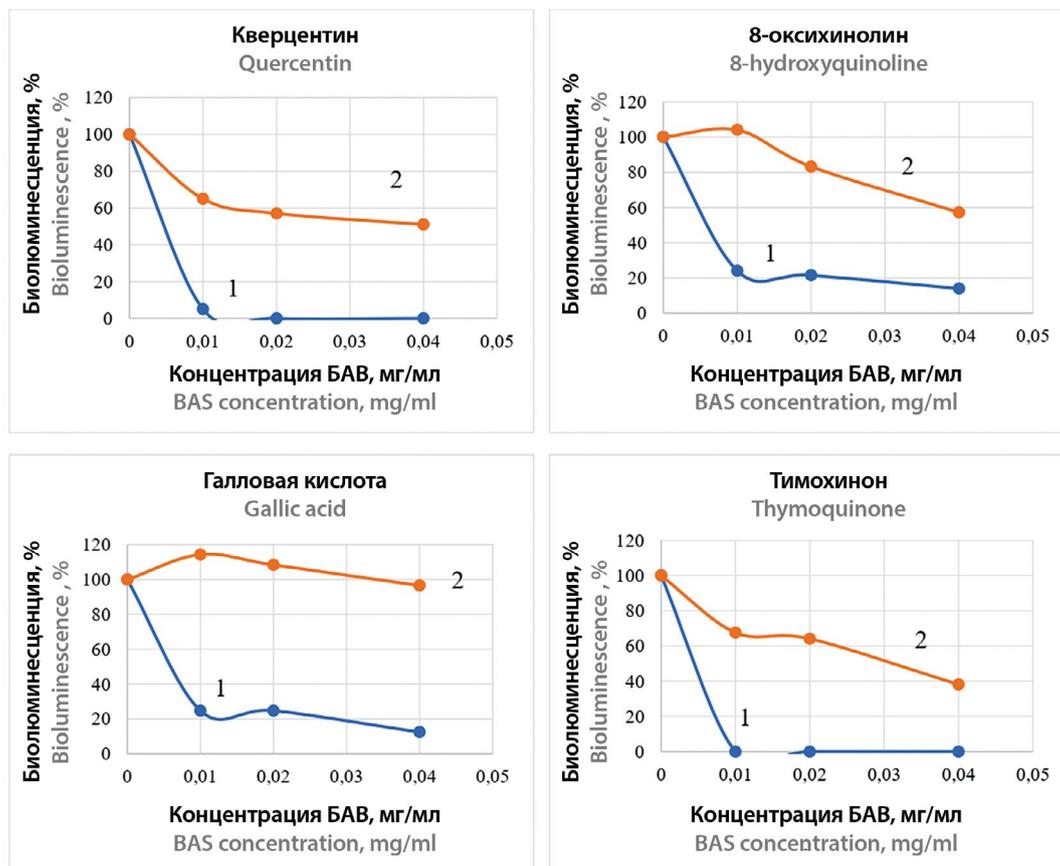


Рисунок 3. Действие БАВ на биолюминесценцию тест-бактерий с конститутивной биолюминесценцией:

1 – *A. fischeri* F1; 2 – *E. coli* (pXen7)

Figure 3. The effect of BAS on bioluminescence of test-bacteria with constitutive bioluminescence:

1 – *A. fischeri* F1; 2 – *E. coli* (pXen7)

центрациях до 40 мкг/мл. Низкой чувствительностью характеризуются бактерии и к действию кверцетина, в присутствии которого биолюминесценция снижается до 70–60 %.

При более высоких концентрациях ингибирующее действие 8-гидроксихинолина и тимохинона усиливалось, а кверцетина и галловой кислоты оставалось практически без изменений (рисунок 4). В этих условиях биолюминесценция *A. fischeri* F1 полностью подавлялась и была близка к 0.

Для изучения бактерицидного действия исследуемые БАВ инкубировали с тест-бактериями в течение суток при комнатной температуре, после чего производили высев на плотную питательную среду в виде капле объемом 3 мкл (спот-тест). Ингибирование или отсутствие роста тест-бактерий считали проявлением бактерицидности. Как видно из рисунка 5, рост бактерий *A. fischeri* F1 полностью подавлялся всеми исследуемыми веществами при концентрациях от 0,02 мг/мл и выше. Что касается *E. coli* (pXen7), то бактерицидное действие отмечено только для тимохинона при концентрации более 0,2 мг/мл.

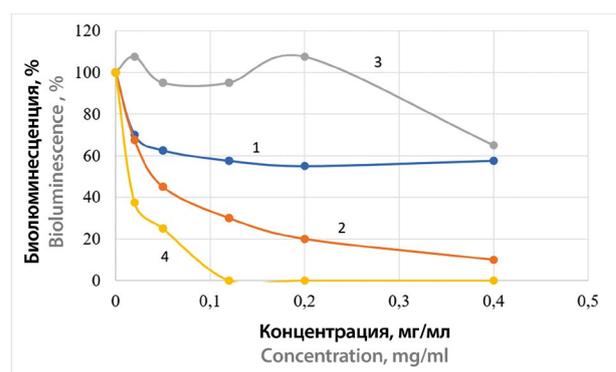


Рисунок 4. Действие БАВ на биолюминесценцию *E. coli* (pXen7) при высоких концентрациях:

1 – кверцетин; 2 – 8-гидроксихинолин; 3 – галловая кислота; 4 – тимохинон. Время воздействия 60 мин

Figure 4. The effect of BAS on the bioluminescence of *E. coli* (pXen7) at high concentrations:

1 – quercetin; 2 – 8-hydroxyquinoline; 3 – gallic acid; 4 – thymoquinone. Exposure time 60 min

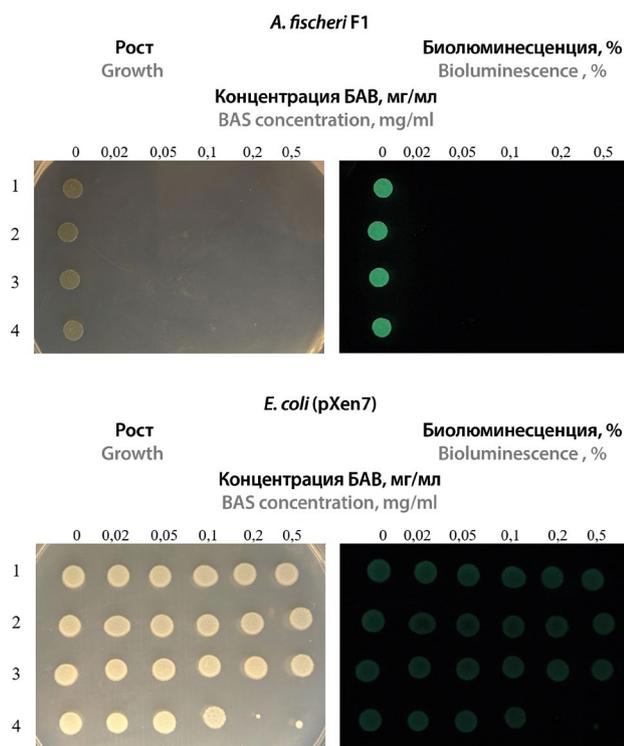


Рисунок 5. Рост и биолюминесценция тест-бактерий на плотной питательной среде в присутствии БАВ:

1 – кверцетин; 2 – 8-гидроксихинолин; 3 – галловая кислота; 4 – тимохинон

Figure 5. Growth and bioluminescence of test-bacteria on a solid nutrient medium at the presence of BAS:

1 – quercetin; 2 – 8-hydroxyquinoline; 3 – gallic acid; 4 – thymoquinone

Определенный интерес представляет сравнение результатов по антибактериальной активности БАВ, полученных с использованием биолюминесцентного анализа, с данными классических микробиологических методов на патогенных микроорганизмах. Анализ литературных данных показал, что все вещества ингибируют рост *S. aureus* (грамположительных) и *E. coli* (грамотрицательных), а также ряда других видов патогенных (условно патогенных) бактерий (таблица 1). Что касается бактерицидного действия, то по крайней мере для кверцетина, 8-гидроксихинолина и тимохинона такое действие установлено и минимальные бактерицидные концентрации (МБК) находятся в пределах от 12 до 120 мкг/мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что неспецифическая антимикробная активность БАВ растительного происхождения проявляется в ингибировании бактериальной биолюминесценции, что может быть связано с тем, что свечение является интегральным количественным показателем метаболизма бактериальной клетки. Также следует отметить, что морские тест-бактерии *A. fischeri* F1 обладают значительно большей чувствительно-

стью к действию исследуемых БАВ растительного происхождения по сравнению с рекомбинантным штаммом *E. coli* (pXen7).

Таблица 1. Сравнительный анализ антибактериальной активности БАВ

Table 1. Comparative analysis of BAS antibacterial activity

Биолюминесцентный анализ Bioluminescent assay				Тест-штамм Test-bacteria	МИК ¹ MIC ¹	МБК ² MBK ²	Источник References
<i>A. fischeri</i> F1		<i>E. coli</i> (pXen7)					
ЭК ₅₀ EC ₅₀	МБК MBK	ЭК ₅₀ EC ₅₀	МБК MBK				
мкг/мл mcg/ml				мкг/мл mcg/ml			
Кверцетин Quercetin							
2,4	<20	>50	>500	<i>S. aureus</i>	20	50	[15, 16]
				<i>E. coli</i>	400	>500	
				<i>P. aeruginosa</i>	20	50	
8-гидроксихинолин 8-hydroxyquinoline							
6,0	<20	40	>500	<i>S. aureus</i>	2–10	25	[17]
				<i>E. coli</i>	32	128	
				<i>P. aeruginosa</i>	256	нет данных	
Галловая кислота Gallic acid							
6,9	<20	>400	>500	<i>S. aureus</i>	1750	>5000	[18]
				<i>E. coli</i>	93	5000	
				<i>P. aeruginosa</i>	500	500	
Тимохинон Thymoquinone							
2,2	<20	15	200	<i>S. aureus</i>	3,1	12,5	[19]
				<i>E. coli</i>	100	100	
				<i>P. aeruginosa</i>	1,56	1,56	

Примечание. ¹ МИК – минимальная ингибирующая концентрация.

² МБК – минимальная бактерицидная концентрация.

Note. ¹ MIC – minimal inhibitory concentration.

² MBK – minimal bactericidal concentration.

Еще один важный вопрос связан с тем, как действуют БАВ растений на бактериальные клетки и в чем состоит механизм их антибактериальной активности. Отмечается, что кверцетин обладает широким спектром биологической активности. Установлено его противоопухолевое, бактериостатическое и антиоксидантное действия [15]. В то же время было показано, что кверцетин может обладать прооксидантным, мутагенным и цитотоксическим действиями. Среди механизмов его антибактериальной активности отмечают действие на мембраны клеток, взаимодействие с белками. Из-за низкой растворимости кверцетина в воде его биологическая активность ограничена низкой биодоступностью [16]. Хинолины, гетероциклические соединения, лежащие в основе ряда алкалоидов, известны своей антибактериальной и антисептической активностью, а также

хелатирующими свойствами [17]. Фенольные соединения, такие как галловая кислота и ее производные, также известны своей антибактериальной активностью, которую связывают с действием на клеточные мембраны, взаимодействием с белками, ингибированием ферментов [18].

Тимохинон обладает широким спектром биологической активности, включая антибактериальную, направленную против грамположительных и грамотрицательных патогенов. Показано, что он ингибирует биопленкообразование, а также оказывает антимикробный эффект за счет генерирования активных форм кислорода [19].

В данной работе для изучения механизмов антибактериального действия были использованы четыре биолюминесцентных биорепортерных штамма [7]. Из них *E. coli* (pRecA-lux) и *E. coli* (pColD-lux) реагируют индукцией биолюминесценции на повреждение нуклеиновых кислот, а *E. coli* (pKatG-lux) и *E. coli* (pSoxS-lux) активируются окислительным стрессом, вызванным перекисью водорода и супероксид-анионами соответственно. Реакции биорепортерных штаммов на соответствующие специфические индукторы, которые были использованы в качестве положительных контролей (K+), приведены на рисунке 6.

Исследование индуцирующего действия БАВ показало, что все они вызывают активацию биолюминесценции *E. coli* (pSoxS-lux). Также для кверцетина наблюдалась незначительная активация биолюминесценции *E. coli* (pRecA-lux) и *E. coli* (pColD-lux). Тимохинон и галловая кислота при этом вызвали незначительную индукцию биолюминесценции *E. coli* (pKatG-lux) (рисунок 7).

Полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на антиоксидантные свойства исследуемых БАВ [3], их антибактериальное действие может быть

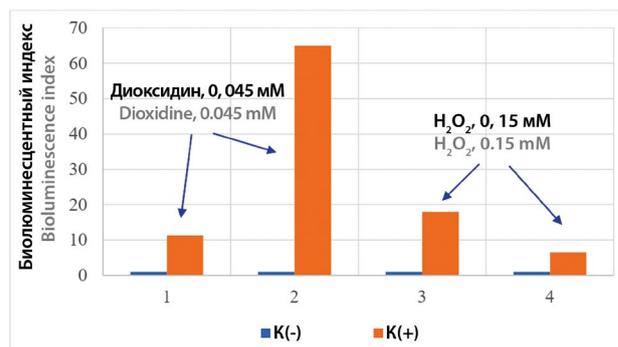


Рисунок 6. Действие специфических индукторов на биолюминесценцию биорепортерных штаммов:

1 – *E. coli* (pRecA-lux) 2 – *E. coli* (pColD-lux); 3 – *E. coli* (pKatG-lux); 4 – *E. coli* (pSoxS-lux). K(-) – контрольные пробы без добавления индукторов, K(+) – пробы с добавлением специфических индукторов

Figure 6. The effect of specific inducers on bioluminescence of bioreporter strains:

1 – *E. coli* (pRecA-lux) 2 – *E. coli* (pColD-lux); 3 – *E. coli* (pKatG-lux); 4 – *E. coli* (pSoxS-lux). K(-) – control samples without the addition of inducers, K(+) – the samples with the addition of inducers

связано с окислительным стрессом. Как уже отмечалось, прооксидантное действие ранее было показано для кверцетина и тимохинона [16, 19]. Кроме этого, по крайней мере для кверцетина антибактериальная активность может быть также связана с ДНК-тропностью и повреждением нуклеиновых кислот (активация биолюминесценции *E. coli* (pRecA-lux) и *E. coli* (pColD-lux)). Следует отметить, что низкие значения БИ (1,5–2,5, за исключением 8-оксихинолина), которые являются показателями индукции биолюминесценции, могут означать, что выявленные механизмы не являются основными, а имеют второстепенный характер.

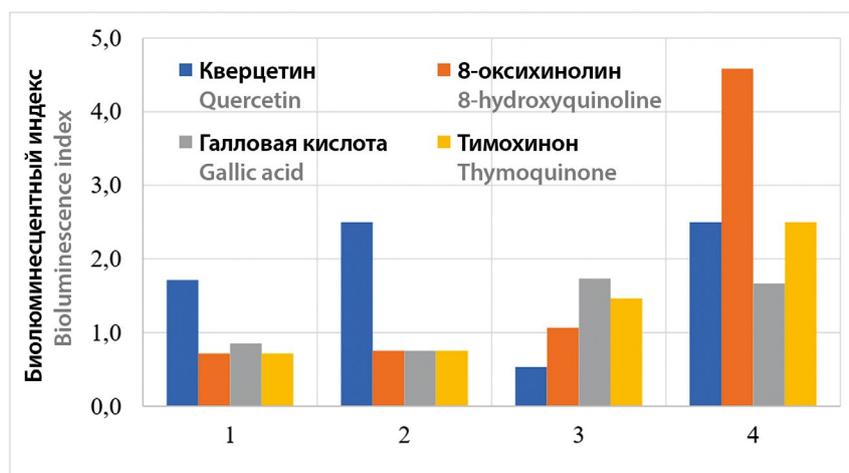


Рисунок 7. Действие БАВ на биолюминесценцию биорепортерных штаммов:

1 – *E. coli* (pRecA-lux); 2 – *E. coli* (pColD-lux); 3 – *E. coli* (pKatG-lux); 4 – *E. coli* (pSoxS-lux)

Figure 7. The effect of BAS on bioluminescence of bioreporter strains:

1 – *E. coli* (pRecA-lux), 2 – *E. coli* (pColD-lux); 3 – *E. coli* (pKatG-lux); 4 – *E. coli* (pSoxS-lux)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе установлено, что интенсивность свечения природных и рекомбинатных биолюминесцентных бактерий может быть показателем антибактериальной активности БАВ природного происхождения. Показана высокая чувствительность бактерий *A. fischeri* F1 к действию таких веществ, как кверцетин, 8-гидроксихинолин, галловая кислота и тимохинон, для которых МИК ($ЭК_{50}$) были в пределах 2–7 мкг/мл. Бактерицидный эффект проявлялся при 20 мкг/мл. Учитывая, что биолюминесцентный анализ является количественным инструментальным методом [20], он может быть легко адаптирован для проведения высокопроизводительного фармацевтического скрининга растительного сырья на антибактериальную активность.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Durand G. A., Raoult D., Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019;53(4):371–382. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010.
2. Hemeg H. A., Moussa I. M., Ibrahim S., Dawoud T. M., Alhaji J. H., Mubarak A. S., Kabli S. A., Alsubki R. A., Tawfik A. M., Marouf S. A. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27(12):3221–3227. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.08.015.
3. Porras G., Chassagne F., Lyles J. T., Marquez L., Dettweiler M., Salam A. M., Samarakoon T., Shabih S., Farrokhi D. R., Quave C. L. Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chemical Reviews*. 2021;121(6):3495–3560. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00922.
4. Eloff J. N. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19(1):106. DOI: 10.1186/s12906-019-2519-3.
5. Bittner Fialová S., Rendeková K., Mučaji P., Nagy M., Slobodníková L. Antibacterial Activity of Medicinal Plants and Their Constituents in the Context of Skin and Wound Infections, Considering European Legislation and Folk Medicine—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10746. DOI: 10.3390/ijms221910746.
6. Burdejova L., Tobolkova B., Polovka M., Neugebauerova J. Differentiation of Medicinal Plants According to Solvents, Processing, Origin, and Season by Means of Multivariate Analysis of Spectroscopic and Liquid Chromatography Data. *Molecules*. 2023;28:4075. DOI: 10.3390/molecules28104075.
7. Safronyuk S. L., Sharipov E. T., Katsev A. M. Identification of luminous bacteria isolated from the Black and th Azov seas. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*. 2017;5-6:19–23. (In Russ.)
8. Burtseva Ye. V., Kuldyrkaeva E. V., Mekhonoshina I. S., Timasheva L. A., Pekhova O. A., Katsev A. M. Chemical composition and biological activity of *Hyssopus officinalis* L. hydrolates. *Medical & pharmaceutical journal "Pulse"*. 2023;25(3):25–34. (In Russ.) DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-3-25-34.
9. Antypenko O. M., Antypenko L. M., Kovalenko S. I., Katsev A. M., Achkasova O. M. Potential of N-aryl (benzyl,heteryl)-2-(tetrazolo[1,5-c]quinazolin-5-ylthio)acetamides as anticancer and antimicrobial agents. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016;9(6):792–805. DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.09.009.
10. Suppi S., Kasemets K., Ivask A., Künnis-Beres K., Sihtmäe M., Kurvet I., Aruoja V., Kahru A. A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Journal of Hazardous Materials*. 2015;286(9):75–84. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.027.
11. Chugunova E., Boga C., Sazykin I., Cino S., Micheletti G., Mazzanti A., Sazykina M., Burilov A., Khmelevtsova L., Kostina N. Synthesis and antimicrobial activity of novel structural hybrids of benzofuroxan and benzothiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;93:349–359. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.02.023.
12. Li Y., He X., Zhu W., Li H., Wang W. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(1):75–83. DOI: 10.1007/s00216-021-03695-9.
13. Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*. 2006;32(2):265–268. DOI: 10.1016/j.envint.2005.08.022.
14. Kováts N., Ács A., Göllöncsér F., Barabás A. Quantifying of bactericide properties of medicinal plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(6):777–779. DOI: 10.4161/psb.6.6.15356.
15. Salehi B., Machin L., Monzote L., Sharifi-Rad J., Ezzat S. M., Saleem M. A., Merghany R. M., El Mahdy N. M., Kılıç C. S., Sytar O., Sharifi-Rad M., Sharopov F., Martins N., Martorell M., Cho W. C. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*. 2020;5(20):11849–11872. DOI: 10.1021/acsomega.0c01818.
16. Carrillo-Garmendia A., Madrigal-Perez L. A., Regalado-Gonzalez C. The multifaceted role of quercetin derived from its mitochondrial mechanism. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2023. DOI: 10.1007/s11010-023-04833-w.
17. Cherdtrakulkiat R., Lawung R., Nabu S., Tantimavanich S., Sinthupoom N., Prachayasittikul S., Prachayasittikul V. Nitroxoline: a potent antimicrobial agent against multidrug resistant Enterobacteriaceae. *EXCLI Journal*. 2019;18:445–453. DOI: 10.17179/excli2019-1378.
18. Borges A., Ferreira C., Saavedra M. J., Simões M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(4):256–265. DOI: 10.1089/mdr.2012.0244.
19. Goel S., Mishra P. Thymoquinone inhibits biofilm formation and has selective antibacterial activity due to ROS generation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(4):1955–1967. DOI: 10.1007/s00253-018-8736-8.
20. Niwa K., Kubota H., Enomoto T., Ichino Y., Ohmiya Y. Quantitative Analysis of Bioluminescence Optical Signal. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(2):223. DOI: 10.3390/bios13020223.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1585>
УДК 615.322; 615.451.16



Оригинальная статья / Research article

Совершенствование технологий выделения и очистки биологически активных веществ из растительного сырья

Г. Н. Турманидзе✉, В. В. Сорокин, К. С. Степанов, М. А. Игнатенко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Турманидзе Георгий Нодарович. E-mail: georgij.turmanidze@spscpu.ru

ORCID: Г. Н. Турманидзе – <https://orcid.org/0000-0001-5121-2343>; В. В. Сорокин – <https://orcid.org/0000-0002-7262-0941>;
К. С. Степанов – <https://orcid.org/0009-0000-5479-5257>; М. А. Игнатенко – <https://orcid.org/0009-0006-9032-1335>.

Статья поступила: 27.06.2023

Статья принята в печать: 09.10.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Совершенствование технологий выделения и очистки биологически активных веществ из растительного сырья – важная задача для фармацевтической, пищевой и косметической отраслей промышленности. Разработка технологий зачастую требует внесения изменений в конструкцию существующего оборудования. При модернизации оборудования для реализации новых технологий возможна доработка его конфигурации, позволяющая с минимальными затратами значительно повышать выход активных веществ. Для повышения эффективности процесса выделения гесперидина из растительного сырья нами предложен ряд технологических решений. В частности, предложено использовать перемешивающие устройства с конфигурацией импеллеров, разработанных на основе методов вычислительной гидродинамики, а при применении экстрактора Сокслета – обогреваемую экстракционную камеру, полученную путем добавления внешней змеевиковой рубашки, позволяющей регулировать температуру внутри экстракционной камеры для ускорения процессов диффузии и массообмена, а растворитель и экстрагент выбирать на основе термодинамических моделей расчетным способом.

Цель. Совершенствование технологии выделения и очистки гесперидина из растительного сырья с использованием модернизированного оборудования.

Материалы и методы. Моделирование распределения потоков в экстракционных аппаратах осуществляли с помощью методов вычислительной гидродинамики. Для оценки результатов, полученных на основе моделирования, проводили ряд экспериментов, объектом для которых служила кожура апельсина (высушенные флаведо и альбедо, степень измельчения – 0,1–0,2 мм, влажность – 3,5 %). Количественное содержание комплекса флавоноидов в пересчете на гесперидин определяли методом прямой спектрофотометрии при длине волны 290 нм, количественное содержание гесперидина определяли гравиметрически. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Minitab v21 (Minitab Inc., США), различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения. На основе методов вычислительной гидродинамики для интенсификации процессов перемешивания и растворения на стадиях предварительного обезжиривания сырья и экстрагирования спроектирован шестиллопастный импеллер, позволяющий ускорить процессы за счет создания осевых и радиальных потоков движения жидкости в емкостном аппарате и поддержания сырья во взвешенном состоянии в объеме жидкости при малых скоростях перемешивания и низком потреблении электроэнергии. Оснащение экстракционной камеры змеевиковой рубашкой позволило значительно повысить растворимость активного вещества и извлекать больше целевого компонента за один экстракционный цикл. Разработана технология выделения и очистки гесперидина, определены и оптимизированы параметры проведения процессов.

Заключение. В результате исследования показано, что возможно интенсифицировать процессы экстракции и растворения активных веществ путем подбора перемешивающих устройств методом вычислительной гидродинамики. Для выделения плохо растворимых соединений из плотного сырья (корни, кора и пр.) предложена модификация аппарата Сокслета с обогреваемой экстракционной камерой. Модернизация типовых технологических установок позволила получить субстанцию гесперидина с выходом до 95 % и чистотой до 90 % при однократной перекристаллизации.

Ключевые слова: гесперидин, растворимость, оборудование, мацерация, Сокслет, обезжиривание, экстракция

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

Вклад авторов. Г. Н. Турманидзе под руководством В. В. Сорокина разработал проект конструкции импеллера и провел модернизацию аппарата Сокслета. К. С. Степанов, Г. Н. Турманидзе разработали подходы к прогнозированию растворимости веществ на основе термодинамических моделей. В. В. Сорокин, К. С. Степанов, Г. Н. Турманидзе, М. А. Игнатенко участвовали в разработке технологии получения гесперидина, обработке данных и написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

Для цитирования: Турманидзе Г. Н., Сорокин В. В., Степанов К. С., Игнатенко М. А. Совершенствование технологий выделения и очистки биологически активных веществ из растительного сырья. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):71–79. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1585>

© Турманидзе Г. Н., Сорокин В. В., Степанов К. С., Игнатенко М. А., 2023

© Turmanidze G. N., Sorokin V. V., Stepanov K. S., Ignatenko M. A., 2023

Improvement of Technologies for Isolation and Purification of Biologically Active Substances from Plant Raw Materials

Georgii N. Turmanidze✉, Vladislav V. Sorokin, Konstantin S. Stepanov, Maxim A. Ignatenko

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

✉ Corresponding author: Georgii N. Turmanidze. E-mail: georgij.turmanidze@spcpu.ru

ORCID: Georgii N. Turmanidze – <https://orcid.org/0000-0001-5121-2343>; Vladislav V. Sorokin – <https://orcid.org/0000-0002-7262-0941>;
Konstantin S. Stepanov – <https://orcid.org/0009-0000-5479-5257>; Maxim A. Ignatenko – <https://orcid.org/0009-0006-9032-1335>.

Received: 27.06.2023 Revised: 09.10.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Improving the technologies for isolating and purifying biologically active substances from plant materials is an important task for the pharmaceutical, food and cosmetic industries. Technology development often requires changes to the design of existing equipment. During the modernization of equipment for the implementation of new technologies, it is possible to improve its configuration, which makes it possible to significantly increase the yield of active substances at minimal cost. To increase the efficiency of the process of isolating hesperidin from plant materials, we proposed to use a number of technological solutions. In particular, it is proposed to use mixing devices with the configuration of impellers obtained by computational fluid dynamics, when using a Soxhlet extractor to use a heated extraction chamber, by adding an external coil jacket, which makes it possible to regulate the temperature inside the extraction chamber to accelerate the processes of diffusion and mass transfer, and to select the solvent and extractant on the basis of thermodynamic models by calculation.

Aim. Improving the technology for isolating and purifying hesperidin from plant materials using modernized equipment.

Materials and methods. Flow distribution in extraction apparatuses was modeled using computational fluid dynamics methods. To evaluate the results obtained on the basis of modeling, a number of experiments were carried out, the object of which was the peel of an orange (dried flavedo and albedo, grinding degree 0.1–0.2 mm, moisture content 3.5 %). The quantitative content of the flavonoid complex in terms of hesperidin was determined by direct spectrophotometry at a wavelength of 290 nm, the quantitative content of hesperidin was determined gravimetrically. Statistical data processing was performed using Minitab v21 software (Minitab Inc., USA), differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion. Based on the methods of computational fluid dynamics, to intensify the processes of mixing and dissolution at the stages of preliminary degreasing of raw materials and extraction, a six-bladed impeller was designed, which makes it possible to accelerate these processes by creating axial and radial flows of fluid movement in a capacitive apparatus and maintaining raw materials in suspended state in the volume of liquid at low mixing speeds and energy consumption. Equipping the extraction chamber with a coiled jacket made it possible to significantly increase the solubility of the active substance and extract more of the target component in one extraction cycle. A technology for the isolation and purification of hesperidin was developed, and the parameters of the processes were determined and optimized.

Conclusion. As a result of the study, it was shown that it is possible to intensify the processes of extraction and dissolution of active substances by selecting mixing devices using the method of computational fluid dynamics. To isolate poorly soluble compounds from dense raw materials (roots, bark, etc.), a modification of the Soxhlet apparatus with a heated extraction chamber was proposed. Modernization of typical technological units made it possible to obtain the substance of hesperidin with a yield of up to 95 % and a purity of up to 90 % with a single recrystallization.

Keywords: hesperidin, solubility, equipment, maceration, Soxhlet, degreasing, extraction

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. Georgii N. Turmanidze, under the leadership of Vladislav V. Sorokin, developed the design of the impeller design and carried out the modernization of the Soxhlet apparatus. Konstantin S. Stepanov, Georgii N. Turmanidze developed approaches to predicting the solubility of substances based on thermodynamic models. Vladislav V. Sorokin, Konstantin S. Stepanov, Georgii N. Turmanidze, Maxim A. Ignatenko participated in the development of technology for obtaining hesperidin, data processing and in writing the text of the article. All the authors participated in the discussion of the results.

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

For citation: Turmanidze G. N., Sorokin V. V., Stepanov K. S., Ignatenko M. A. Improvement of technologies for isolation and purification of biologically active substances from plant raw materials. *Drug development & registration*. 2023;12(4):71–79. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1585>

ВВЕДЕНИЕ

Модернизация технологического оборудования и совершенствование технологий выделения и очистки биологически активных веществ из растительного сырья – важная задача для различных отраслей промышленности, таких как фармацевтиче-

ская, пищевая, косметическая и другие. При модернизации экстракционного оборудования с использованием современных технологий возможна доработка его конфигурации, позволяющая с минимальными затратами значительно повышать выход целевых веществ в экстрагент. Модернизация особенно актуальна при выделении активных субстан-

ций, так как реализация таких процессов на оборудовании, произведенном под конкретный процесс или группу процессов, позволяет направленно извлекать вещества, сокращать количество стадий очистки и время проведения процессов.

В рамках данного исследования разработана технология получения гесперидина из растительного сырья, предложены новые конструкции оборудования и технологические решения на их основе.

Гесперидин – одно из широко используемых активных веществ, получаемых из растительного сырья, относится к классу флавоноидов, в значительных количествах он и его производные содержатся в кожуре и мякоти цитрусовых: апельсинов (*Citrus sinensis*), мандаринов (*Citrus reticulata*), лайма (*Citrus aurantifolia*), лимона (*Citrus limon*). Гесперидин является ценной субстанцией, так как проявляет несколько фармакологических эффектов, включая антиоксидантный, противовоспалительный, антиаллергический, противоотечный, противокариесный, кардиопротективный [1–3]. Эти фармакологические эффекты гесперидина обуславливают его широкое применение в качестве ингредиента в диетических добавках и фармацевтических препаратах. На данный момент проведено несколько исследований, которые показывают эффективность гесперидина при лечении Covid-19 при приеме в качестве дополнительного средства и при использовании для снижения проявления негативных последствий для здоровья у переболевших [4]. Гесперидин является также полупродуктом для получения диосмина, вещества, проявляющего схожие фармакологические эффекты, но обладающего более выраженным фармакологическим действием.

Для выделения гесперидина наиболее целесообразным с экономической точки зрения представляется использование в качестве сырья кожуры апельсинов ввиду ее большой распространенности как отхода пищевой промышленности. Около 30 % собираемых ежегодно апельсинов (в среднем около 70 млн тонн в год в мире) используется в производстве соков, где практически 50 % всей фруктовой массы приходится на отходы производства (шрот)¹ [5, 6].

В промышленности гесперидин получают из кожуры с помощью щелочной экстракции. Измельченную кожуру смешивают с водой и раствором NaOH, доводя pH до значений 11,0–11,5. Далее проводят процесс мацерации при перемешивании с числом оборотов мешалки 100–300 об/мин. Через 1–3 часа отделяют сырье, а жидкую фазу направляют на стадию фильтрования. Затем к отфильтрованному продукту добавляют кислоту (серная, соляная, уксусная) для доведения pH до 4,2–4,5 и нагревают раствор при 40–45 °С в течение 12–24 часов. Образовавшиеся таким образом кристаллы гесперидина и со-

путствующих веществ отделяют и сушат. Как правило, эта процедура позволяет сформировать флавоноидный комплекс, содержащий 60–70 % гесперидина. Для получения более чистого гесперидина требуются дополнительные стадии перекристаллизации. Для получения гесперидина с чистотой более 90 % требуется не менее трех перекристаллизаций [7–10].

Данная технология обладает существенными недостатками. Традиционный метод экстракции – мацерация, – применяемый в данной технологии, является очень длительным и трудоемким [11, 12]. Полученные после стадии экстракции извлечения являются сильно загрязненными и трудно фильтруемыми. Как показали наши исследования, при гидромодуле 1:5 и температуре экстрагента 20 °С через 20–30 минут наблюдается распад сырья в щелочной среде с образованием раствора повышенной вязкости, что, в свою очередь, приводит к сложности отделения жидкости от твердых частиц. Кроме того, одновременно экстрагируются и другие соединения, что снижает чистоту выделяемых кристаллов гесперидина. В связи с загрязненностью полученного первичного осадка гесперидина процесс получения очищенной субстанции занимает много времени и требует значительного расхода кислот и оснований.

Целью исследования является совершенствование технологии выделения и очистки гесперидина из растительного сырья и модернизация конструкций применяемого оборудования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали кожуру (флаведо и альбеда) апельсина, высушенную при температуре 50–60 °С до остаточной влажности $3,5 \pm 1,0$ %.

В качестве экстрагентов использовали спирт этиловый 96%-й (х. ч., «Альфа», АО «АминоСиб», Россия, ГОСТ Р 5962-2013), петролейный эфир (40/70, ООО «НеваРеактив», Россия, ТУ 2631-074-44493179-2001).

Для создания щелочной среды использовали кальция гидроокись (ГОСТ 9262-77), натрия гидроокись (х. ч., ГОСТ 4328-77, АО «АМК-Групп», Россия).

Для создания кислой среды использовали соляную кислоту (х. ч., «Химмаг-СПб»).

Экстракцию сырья методом мацерации проводили следующим образом: навеску сырья, измельченного до размера частиц 0,1–0,2 мм, взвешивали на весах лабораторных электронных Sartogосм SE224-C (ООО «Сартогосм», Россия), загружали в емкостной аппарат. Аппарат термостатировали с помощью водяной бани, температура экстракции – 50 °С.

Экстракцию сырья на модернизированном аппарате типа «соклет» проводили при температуре экстракционной камеры 50 °С. Конструкция аппарата – собственная разработка кафедры процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ.

¹ Statistics Division. Crops and livestock products. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed: 10.03.2023.

Количественное определение суммы флавоноидов проводили на многоцелевом спектрофотометре UV-1280 фирмы Shimadzu спектрофотометрическим методом при длине волны 290 нм, используя в качестве стандартного образца рабочий стандартный образец гесперидина (CAS № 520-26-3, ООО «Геофарма», Россия).

Содержание гесперидина определяли гравиметрическим методом. Образцы кожуры апельсина высушивали при 70 °С до влажности 3 % и измельчали. Сырье помещали в экстрактор, где проводили три последовательные экстракции с перемешиванием. Каждую экстракцию проводили раствором этанола 96% в соотношении 1:200 (масс./об.). Три экстракта объединяли, гесперидин выделяли перекристаллизацией. Измеряли массу осадка.

Проводили качественный анализ ВЭЖХ-хроматограмм, полученных на жидкостном хроматографе Prominence LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония) с колонкой Supelcosil C18 (250 × 4,6, 5 мкм), оснащенном диодно-матричным детектором SPD-M20A.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0013.15 Государственной фармакопеи РФ XIV издания [13] с использованием программного обеспечения Minitab v21 (Minitab Inc., США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Важной технологической процедурой в технологии экстракции сырья, содержащего значительные количества эфирных масел и других веществ липофильной природы, является обезжиривание. Оно может выполняться перед стадией экстракции (обезжиривание сырья) или после экстрагирования (экстракция «жидкость – жидкость») для полученной вытяжки. В обоих случаях обезжиривание позволяет избавиться от неполярных балластных веществ и тем са-

мым улучшить чистоту продукта. Предварительное обезжиривание сырья также может приводить к более высокому выходу целевых веществ за счет открытия пор растительного сырья и ускорения процессов диффузии [5, 14].

Предварительные расчеты растворимости гесперидина на основе термодинамических моделей показали, что гесперидин обладает низкой растворимостью в бензоле, хлороформе, дихлорметане, диэтиловом эфире.

В кожуре апельсина в большом количестве содержится эфирное масло и пигменты, которые являются хорошо растворимыми как в вышеперечисленных органических растворителях, так и в концентрированных спиртах. Поэтому применение дихлорметана или диэтилового эфира для предварительного обезжиривания представляется целесообразным.

Произведено трехкратное обезжиривание сырья петролевым эфиром. В ходе дальнейших опытов было установлено, что достаточным условием получения гесперидина с чистотой 90 % является однократная мацерация при соотношении «сырье:эфир» 1:10, времени экстрагирования 1 час, скорости перемешивания 200 об/мин, температуре 20 °С.

Для повышения эффективности мацерации использовали мешалку с импеллером собственной разработки, создающую радиально-осевые течения в жидкости и обеспечивающую интенсивное перемешивание сырья во всем объеме аппарата при низких скоростях вращения. Проектирование импеллера провели на основе вычислительной гидродинамики – современного метода моделирования, который позволяет предсказывать и оптимизировать производительность устройства на стадии проектирования. С помощью аддитивных технологий на основе модели был изготовлен импеллер из стали (рисунок 1).

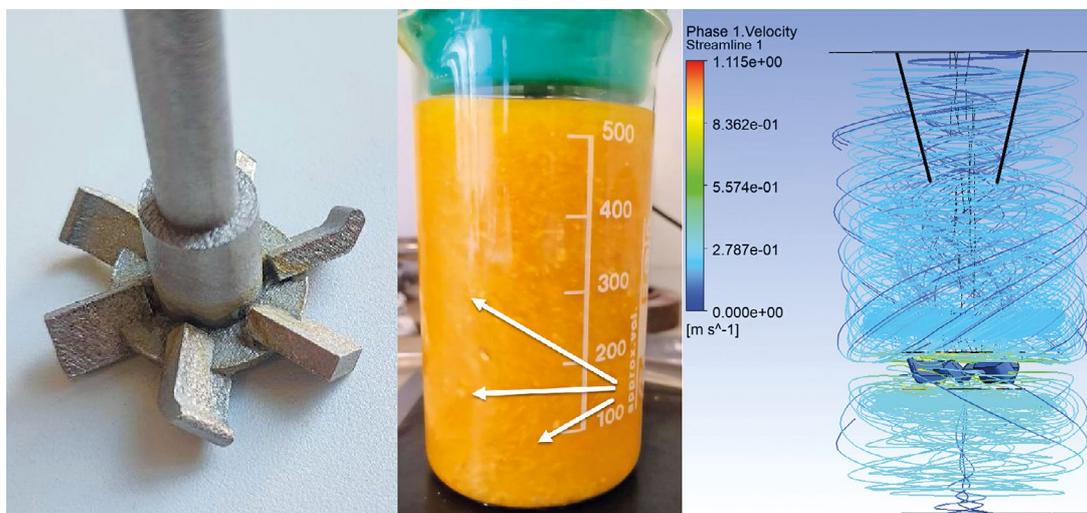


Рисунок 1. Модернизированный шестилопастный импеллер (направление движения частиц сырья указано стрелками)

Figure 1. Upgraded six-blade impeller (the direction of movement of raw material particles is indicated by arrows)

Особенностью конфигурации импеллера является наличие лопаток разной формы, что приводит к циркуляции сырья в нескольких направлениях одновременно: тангенциально по окружности аппарата и радиально в верхнем и нижнем направлении. Такая интенсификация процесса перемешивания приводит к более быстрому переходу липофильной фракции в экстрагент и его насыщению по сравнению с использованием турбинной и стандартной шестилопастной мешалки.

Альтернативой щелочному методу экстракции является использование органических растворителей [15]. Оценка растворимости гесперидина в различных спиртах на основе термодинамических моделей показала, что гесперидин обладает удовлетворительной растворимостью в концентрированных метиловом и этиловом спиртах. Спрогнозированная растворимость гесперидина в спиртах уменьшается в ряду: пропиленгликоль, метанол, этанол, пропанол, бутанол, изопропанол.

Хотя метанол и этанол являются селективными растворителями для экстракции гесперидина, проявляемая ими относительно низкая экстрагирующая и растворяющая способность ограничивает их применение. Для извлечения гесперидина из сырья необходима многократная обработка сырья экстрагентом, например, методами перколяции, ремацерации с делением экстрагента на части, экстракции в аппарате Сокслета [16, 17]. Применение перколяции и ремацерации в данном случае не является целесообразным, так как требует значительного расхода спирта ввиду низкой растворимости гесперидина. Недостатком использования типового аппарата Сокслета является то, что экстрагент после испарения попадает в холодильник-конденсатор и далее, охлажденный, направляется на экстракцию. Холодный спирт не может обеспечить необходимую скорость экстракции и растворения, процесс насыщения экстрагента будет занимать длительное время.

Нами было предложено провести модернизацию типового аппарата Сокслета путем обеспечения нагрева спирта в экстракционной камере. Обогрев камеры ускоряет процесс экстракции, поскольку повышение температуры способствует повышению скорости диффузионных и массообменных процессов внутри клеток и на границах фаз.

Выход гесперидина увеличивается с повышением температуры [18]. Нагрев обеспечили змеевиковой рубашкой, выполненной из силиконового шланга, подача обогревающей воды обеспечивалась циркуляционным термостатом. Температура жидкости в обогреваемой камере не должна превышать температуру кипения растворителя, в связи с чем она была установлена на уровне 50 ± 5 °С. Контроль температуры осуществляли с помощью цифровых термометров, установленных в пробоотборниках в верхней и нижней части рабочей камеры (рисунок 2).



Рисунок 2. Модернизированная обогреваемая камера аппарата Сокслета

Figure 2. Upgraded heated chamber of the Soxhlet apparatus

Экстракцию гесперидина на разработанной установке исследовали, варьируя состав растворителя и массообъемное соотношение твердого вещества (сырья) к растворителю, время экстракции (количество циклов). Оценку эффективности экстракции осуществляли, сравнивая выход флавоноидов (в пересчете на гесперидин) к массе сырья в сравнении с методом мацерации и общим содержанием флавоноидов в сырье.

Как известно, гидромодуль может оказывать значительное влияние на выход активных веществ в экстрагент [19]. Влияние гидромодуля на выход флавоноидов из сырья при температуре экстракции 50 °С представлено в таблице 1.

Таблица 1. Зависимость содержания флавоноидов в % в пересчете на массу сырья от гидромодуля

Table 1. The dependence of the flavonoid content in % in terms of the mass of raw materials on the hydromodule

Соотношение «масса сырья : объем экстрагента» The ratio of the mass of raw materials to the volume of extractant	1:5	1:10	1:20
Содержание флавоноидов в % в пересчете на массу сырья The content of flavonoids (%) in relation to the mass of raw materials	1,4	2,1	2,1

Исходя из данных, подставленных в таблице 1, оптимальным массообъемным соотношением является 1:10. Результаты динамики экстрагирования суммы флавоноидов в пересчете на гесперидин метода-

ми мацерации (1) и по Сокслету (2) представлены на рисунке 3.

После проведения процесса экстрагирования в течение 12 часов содержание флавоноидов достигает 3,85 % и далее практически не повышается. Таким образом, по результатам исследований установлено, что экстракция сырья на разработанной установке позволяет извлечь на 30 % больше веществ флавоноидной природы по сравнению с мацерацией при проведении процесса в течение 6 часов или на 50 % при проведении экстракции в течение 12 часов.

Дополнительным преимуществом проведения процесса в установке Сокслета является чистота получаемого извлечения и повышенная скорость фильтрации раствора после проведения процесса экстрагирования.

Для выделения гесперидина из экстракта была проведена замена растворителя на воду с помощью выпаривания спирта. Полученный водный экстракт охлаждали до комнатной температуры и выстаивали в течение 2 дней. Полученный осадок сушили в полочной сушилке при температуре 50 °С в течение трех часов.

Очистку проводили в 2 стадии. На первом этапе полученный сухой осадок растворяли в растворе NaOH с pH 10,5–11,0. Не рекомендуется превышать значение pH = 11,0 ввиду наличия сведений в литературе о нестабильности соединения при значениях pH выше 11,0. На втором этапе для выделения очищенного гесперидина раствор фильтровали под вакуумом, а затем к полученному фильтрату добавляли 0,1 н. раствор HCl доводя его pH до 5,5–6,0. Полученный раствор термостатировали в течение 24 часов при комнатной температуре в темном месте. Гесперидин выпадал в осадок, который далее направляли на стадию фильтрации под вакуумом и промывали его десятикратным (по отношению к массе осадка) количеством дистиллированной воды не ме-

нее 3 раз. Затем промытый осадок высушивали в полочном сушильном шкафу при 50 °С в течение 3 часов. Полученный осадок представлял собой порошок белого цвета с кремовым оттенком.

Выход гесперидина при использовании аппарата Сокслета составил $0,305 \pm 0,028$ % от массы сырья, при проведении мацерации выход составил $0,230 \pm 0,018$ %. Установлено, что в среднем содержание гесперидина в кожуре апельсина составляет 0,32 %. Таким образом, можно говорить о том, что при экстракции сырья в модернизированной установке Сокслета извлекается около 95 % гесперидина, выход при экстракции методом мацерации – около 65–70 % гесперидина.

Провели качественный анализ полученного осадка методом ВЭЖХ [7, 20]. Условия аналитической хроматографии представлены в таблице 2: подвижная фаза А – 0,1 % об. тетрафторуксусной кислоты (ТФУ) в сверхчистой H₂O; подвижная фаза В – 0,1 % об. ТФУ в ацетонитриле класса «для ВЭЖХ», скорость подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Чистоту гесперидина сравнивали со стандартным рабочим образцом, чистота которого по сертификату ≥ 95 %.

Таблица 2. Условия аналитической ВЭЖХ

Table 2. Analytical HPLC conditions

Состав подвижной фазы, %В Mobile phase composition, %B	Время, мин Time, min
5	0
5	5
100	45,75
100	50
5	60
5	65

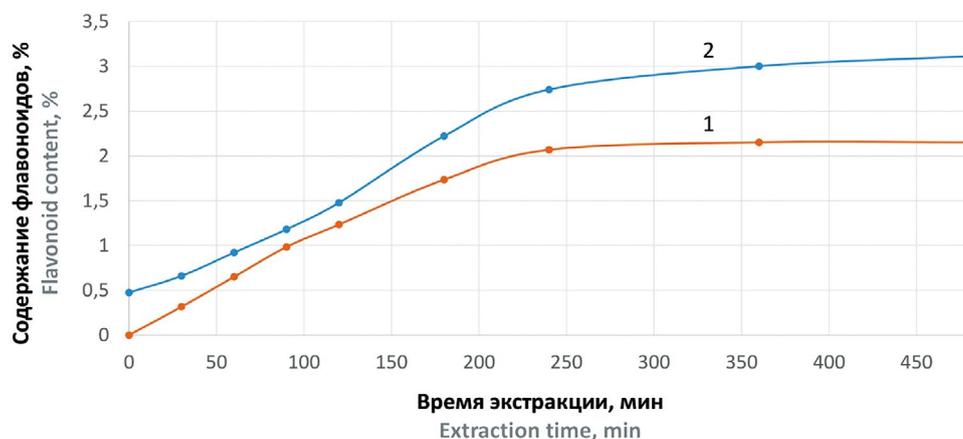


Рисунок 3. Кинетика экстракции суммы флавоноидов из кожуры апельсина методом мацерации (1) и по Сокслету (2)

Figure 3. Kinetics of extraction of the sum of flavonoids from orange peel by maceration (1) and soxhlet (2) methods

На рисунке 4 представлена хроматограмма гесперидина при 280 нм стандартного образца, на рисунке 5 – полученной субстанции гесперидина. Чистота полученного гесперидина по методу ВЭЖХ составила 90 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология выделения очищенного гесперидина с содержанием целевого компонента в субстанции 90 % (при однократной перекристаллизации). Для повышения выхода и чистоты продукта разработаны модификации оборудования под процесс: методом вычислительной гидродинамики с помощью аддитивных технологий получена новая конфигурация перемешивающего устройства, позволяющая интенсифицировать процесс экстраги-

рования; предложена модификация аппарата Соклета с обогреваемой камерой для повышения растворимости гесперидина в экстрагенте. С помощью термодинамических методов установлены растворители, использование которых на стадиях производства позволяет получать гесперидин с высоким выходом.

Установлены основные параметры процессов обезжиривания и экстрагирования. Рекомендовано однократное обезжиривание, соотношение «сырье:растворитель» 1:10, температура – 20 °С, скорость перемешивания – 200 об/мин. Показано, что при использовании мацерации в качестве метода экстрагирования выход гесперидина составляет 65–70 % от содержания в сырье. Рекомендованные параметры проведения процесса: экстрагент – спирт этиловый 96%-й, гидромодуль 1:10, температура

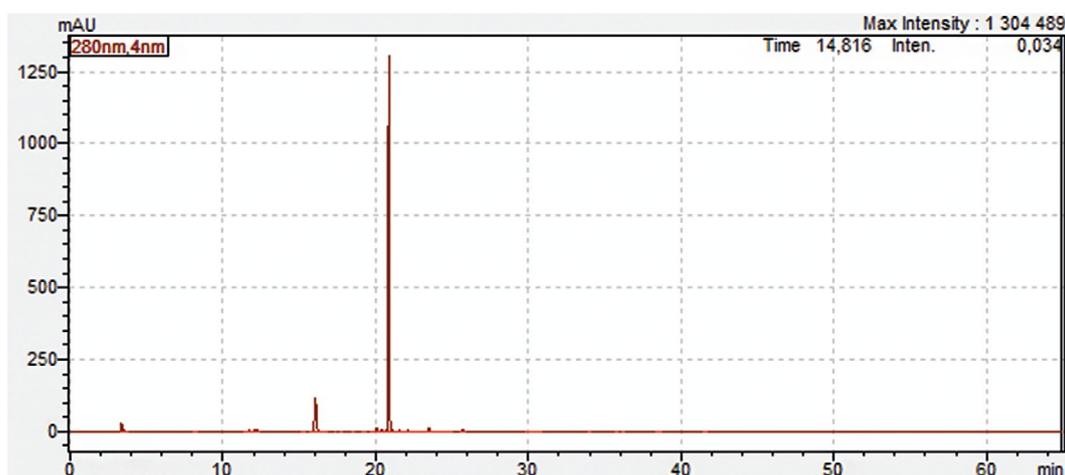


Рисунок 4. Хроматограмма стандартного образца гесперидина

Figure 4. Chromatogram of Hesperidin Reference Standard

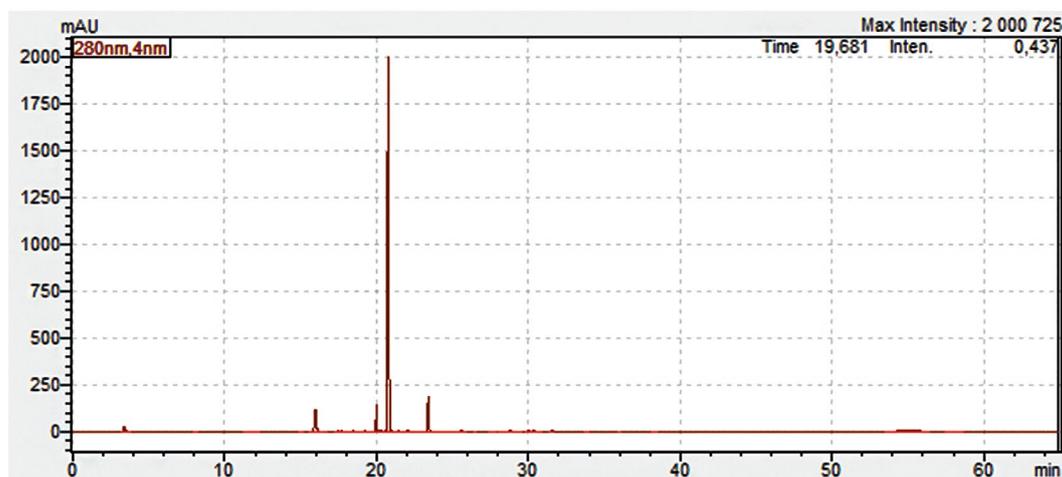


Рисунок 5. Хроматограмма гесперидина, полученного по разработанной технологии

Figure 5. Chromatogram of hesperidin obtained using the developed technology

экстракции – 50 °С, время экстракции – 6 часов. При экстрагировании в установке Сокслета рекомендуемые параметры: экстрагент – спирт этиловый 96%-й, гидромодуль 1:10, температура экстракции – 50 °С (обогреваемая камера), время экстракции – 6 часов. Выход гесперидина – 90–95 % от содержания в сырье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Syahputra R. A., Harahap U., Dalimunthe A., Nasution M. P., Satria D. The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules*. 2022;27(4):1320. DOI: 10.3390/molecules27041320.
2. Li C., Schluesener H. Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(3):613–631. DOI: 10.1080/10408398.2014.906382.
3. Jiang Q., Charoensiddhi S., Xue X., Sun B., Liu Y., El-Seedi H. R., Wang K. A review on the gastrointestinal protective effects of tropical fruit polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023;63(24):7197–7223. DOI: 10.1080/10408398.2022.2145456.
4. Tirado-Kulieva V. A., Hernández-Martínez E., Choque-Rivera T. J., Phenolic compounds versus SARS-CoV-2: An update on the main findings against COVID-19. *Heliyon*. 2022;8(9):e10702. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10702.
5. Zheng W., Wu F., Luo X., Bian C., Zhang Y., Yin F., Liu H., Fu Y. Separation of Citrus Essential Oil and Hesperidin from Citrus Peel Through Combined Mixed-Solvent and Multi-Phase Salting Out Extraction. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2022;25(4):899–909. DOI: 10.1080/0972060X.2022.2113147.
6. Kim J.-W., Ko H. C., Jang M.-G., Han S. H., Kim H. J., Kim S.-J. Phytochemical content and antioxidant activity in eight citrus cultivars grown in Jeju Island according to harvest time. *International Journal of Food Properties*. 2023;26(1):14–23. DOI: 10.1080/10942912.2022.2151620.
7. Ichim M. C., Scotti F., Booker A. Quality evaluation of commercial herbal products using chemical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022:1–21. DOI: 10.1080/10408398.2022.2140120.
8. Peng Q., Zhang Y., Zhu M., Bao F., Deng J., Li W. Polymethoxyflavones from citrus peel: advances in extraction methods, biological properties, and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022:1–13. DOI: 10.1080/10408398.2022.2156476.
9. Zhou P., Zheng M., Li X., Zhou J., Shang Y., Li Z., Qu L. A consecutive extraction of pectin and hesperidin from Citrus aurantium L.: Process optimization, extract mechanism, characterization and bio-activity analysis. *Industrial Crops and Products*. 2022;182:114849. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114849.
10. Sanches V. L., de Souza Mesquita L. M., Viganó J., Contieri L. S., Pizani R., Chaves J., da Silva L. C., de Souza M. C., Breitkreitz M. C., Rostagno M. A. Insights on the Extraction and Analysis of Phenolic Compounds from Citrus Fruits: Green Perspectives and Current Status. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2022:1–27. DOI: 10.1080/10408347.2022.2107871.
11. Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Смехова И. Е. Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного с высоким содержанием биологически активных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):35–39.
12. Oliveira A. M. B., Viganó J., Sanches V. L., Rostagno M. A., Martínez J. Extraction of potential bioactive compounds from industrial Tahiti lime (*Citrus latifolia* Tan.) by-product using pressurized liquids and ultrasound-assisted extraction. *Food Research International*. 2022;157:111381. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111381.
13. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М.: ФЭМБ; 2018. 1814 с.

14. Бубенчиков Р. А., Саканян Е. И., Зубкова Н. В., Добрынин В. П., Горяинов С. В., Хажжар Ф., Платонов Е. А., Писарев Д. И., Абрамович Р. А. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в препаратах аллергенов методом ГЖХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):159–168. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168
15. Вайнштейн В. А., Каухова И. Е., Амелина П. С., Колдашова Ю. А., Минина С. А., Иванова А. В. Полиэкстракция травы эхинацеи системами экстрагентов с возрастающей полярностью. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(3):54–63.
16. Чистова Ю. И. Определение оптимальных условий экстракции сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа методами математического планирования многофакторного эксперимента. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):24–28. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-24-28.
17. Pyrzynska K. Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients*. 2022;14(12):2387. DOI: 10.3390/nu14122387.
18. Zhou P., Li X., Zhou J., Yang Y., Zhi J., Shen L. Mass transfer mechanism of the multivariate consecutive extraction process of pectin and hesperidin from Citrus aurantium L.: Kinetics, thermodynamics, diffusion and mass transfer coefficients. *Separation and Purification Technology*. 2023;311:123339. DOI: 10.1016/j.seppur.2023.123339.
19. Каухова И. Е., Новикова Е. К., Чачин Д. А. Разработка условий экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, рещешка обыкновенного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(3):64–67.
20. Chen L., Zhu S., Wang C., Chen L. Development of a HPLC-UV Method for the Separation and Quantification of Hesperidin, Neohesperidin, Neohesperidin Dihydrochalcone and Hesperetin. *Natural Product Research*. 2023;37(10):1714–1718. DOI: 10.1080/14786419.2022.2104275.

REFERENCES

1. Syahputra R. A., Harahap U., Dalimunthe A., Nasution M. P., Satria D. The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules*. 2022;27(4):1320. DOI: 10.3390/molecules27041320.
2. Li C., Schluesener H. Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(3):613–631. DOI: 10.1080/10408398.2014.906382.
3. Jiang Q., Charoensiddhi S., Xue X., Sun B., Liu Y., El-Seedi H. R., Wang K. A review on the gastrointestinal protective effects of tropical fruit polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023;63(24):7197–7223. DOI: 10.1080/10408398.2022.2145456.
4. Tirado-Kulieva V. A., Hernández-Martínez E., Choque-Rivera T. J., Phenolic compounds versus SARS-CoV-2: An update on the main findings against COVID-19. *Heliyon*. 2022;8(9):e10702. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10702.
5. Zheng W., Wu F., Luo X., Bian C., Zhang Y., Yin F., Liu H., Fu Y. Separation of Citrus Essential Oil and Hesperidin from Citrus Peel Through Combined Mixed-Solvent and Multi-Phase Salting Out Extraction. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2022;25(4):899–909. DOI: 10.1080/0972060X.2022.2113147.
6. Kim J.-W., Ko H. C., Jang M.-G., Han S. H., Kim H. J., Kim S.-J. Phytochemical content and antioxidant activity in eight citrus cultivars grown in Jeju Island according to harvest time. *International Journal of Food Properties*. 2023;26(1):14–23. DOI: 10.1080/10942912.2022.2151620.
7. Ichim M. C., Scotti F., Booker A. Quality evaluation of commercial herbal products using chemical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022:1–21. DOI: 10.1080/10408398.2022.2140120.
8. Peng Q., Zhang Y., Zhu M., Bao F., Deng J., Li W. Polymethoxyflavones from citrus peel: advances in extraction methods, biological properties, and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022:1–13. DOI: 10.1080/10408398.2022.2156476.

9. Zhou P., Zheng M., Li X., Zhou J., Shang Y., Li Z., Qu L. A consecutive extraction of pectin and hesperidin from *Citrus aurantium* L.: Process optimization, extract mechanism, characterization and bio-activity analysis. *Industrial Crops and Products*. 2022;182:114849. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114849.
10. Sanches V. L., de Souza Mesquita L. M., Viganó J., Contieri L. S., Pizani R., Chaves J., da Silva L. C., de Souza M. C., Breikreitz M. C., Rostagno M. A. Insights on the Extraction and Analysis of Phenolic Compounds from Citrus Fruits: Green Perspectives and Current Status. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2022:1–27. DOI: 10.1080/10408347.2022.2107871.
11. Belokurov S. S., Flysyuk E. V., Smekhova I. E. Choice of extraction method for receiving extraction from seeds of payne hay with the high content of biologically active substances. *Drug development & registration*. 2019;8(3):35–39. (In Russ.)
12. Oliveira A. M. B., Viganó J., Sanches V. L., Rostagno M. A., Martínez J. Extraction of potential bioactive compounds from industrial Tahiti lime (*Citrus latifolia* Tan.) by-product using pressurized liquids and ultrasound-assisted extraction. *Food Research International*. 2022;157:111381. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111381.
13. State Pharmacopeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 1. Moscow: FEMB; 2018. 1814 p. (In Russ.)
14. Bubenchikov R. A., Sakanyan E. I., Zubkova N. V., Dobrynin V. P., Goriainov S. V., Hajjar F., Platonov E. A., Pisarev D. I., Abramovich R. A. Development and Validation of a Procedure for the Quantitative Determination of Residual Organic Solvents in Allergen Preparations by GC. *Drug development & registration*. 2022;11(2):159–168. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-159-168
15. Vainshtein V. A., Kauhova I. E., Amelina P. S., Koldashova Yu. A., Minina S. A., Ivanova A. V. Polyextraction of herbs of echinacea by systems of extractions with rising polarity. *Drug development & registration*. 2018;(3):54–63. (In Russ.)
16. Chistova Yu. I. Determination of the optimal extraction conditions of dandelion herb and large burdock leaf specie by methods of mathematical planning of a multifactorial experiment. *Drug development & registration*. 2019;8(1):24–28. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-24-28.
17. Pyrzynska K. Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients*. 2022;14(12):2387. DOI: 10.3390/nu14122387.
18. Zhou P., Li X., Zhou J., Yang Y., Zhi J., Shen L. Mass transfer mechanism of the multivariate consecutive extraction process of pectin and hesperidin from *Citrus aurantium* L.: Kinetics, thermodynamics, diffusion and mass transfer coefficients. *Separation and Purification Technology*. 2023;311:123339. DOI: 10.1016/j.seppur.2023.123339.
19. Kauhova 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.)
20. Chen L., Zhu S., Wang C., Chen L. Development of a HPLC-UV Method for the Separation and Quantification of Hesperidin, Neohesperidin, Neohesperidin Dihydrochalcone and Hesperetin. *Natural Product Research*. 2023;37(10):1714–1718. DOI: 10.1080/14786419.2022.2104275.



Оригинальная статья / Research article

Разработка оптимальной технологии сушки лекарственного растительного сырья из полыни осенней (*Artemisia serotina* Bunge) на основе сравнительного анализа

А. Кадырбай¹, З. Б. Сакипова¹, Н. А. Криштанова³, Л. Н. Ибрагимова¹,
М. Б. Ибраева¹✉, А. Е. Сакипов¹, Э. Н. Бекболатова², Ч. Ридванов²,
О. В. Сермухамедова^{1,4}, Е. Адилбек¹, Т. Е. Сейдуали¹, А. Х. Анартаева¹, А. Ю. Казим²

¹ Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова (КазНМУ), 050000, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Толе Би, д. 88, к. 4

² ТОО «Абди Ибрахим Глобал Фарм», 040703, Республика Казахстан, Алматинская область, Илийский район, с. Мухаметжан Туймебаев

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

⁴ ТОО «Фитолеум», 040400, Республика Казахстан, г. Есик, ул. Маметова, д. 25

✉ Контактное лицо: Ибраева Мариям Булатовна. E-mail: ibraevamb2001@gmail.com

ORCID: А. Кадырбай – <https://orcid.org/0000-0002-5288-6742>; З. Б. Сакипова – <https://orcid.org/0000-0003-4477-4051>;

Н. А. Криштанова – <https://orcid.org/0000-0002-4761-2077>; Л. Н. Ибрагимова – <https://orcid.org/0000-0002-8381-5330>;

М. Б. Ибраева – <https://orcid.org/0000-0003-1916-8084>; А. Е. Сакипов – <https://orcid.org/0000-0003-1400-1971>;

Э. Н. Бекболатова – <https://orcid.org/0000-0003-4695-1947>; Ч. Ридванов – <https://orcid.org/0009-0003-3689-1757>;

О. В. Сермухамедова – <https://orcid.org/0000-0002-0179-1858>; Е. Адилбек – <https://orcid.org/0009-0003-3386-6978>;

Т. Е. Сейдуали – <https://orcid.org/0009-0003-9991-2236>; А. Х. Анартаева – <https://orcid.org/0009-0002-0929-8002>; А. Ю. Казим – <https://orcid.org/0009-0003-9795-4774>.

Статья поступила: 19.09.2023

Статья принята в печать: 19.10.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Выбор оптимального способа сушки ЛРС является важным аспектом получения растительного сырья фармакопейного качества. На площадке фармацевтического предприятия ТОО «Fitoleum» (г. Есик, Казахстан) проведена разработка технологии получения растительной фармацевтической субстанции из травы полыни осенней (*Artemisia serotina* Bunge), в рамках которой изучены различные способы сушки с применением ИК-излучения, конвективной сушки и теневой сушки в естественных условиях. Параллельно с экспериментальным подходом реализован способ моделирования условий сушки. Разработка технологии получения растительных фармацевтических субстанций реализуется с применением концепции «Quality by Design», одним из принципов которой является моделирование экспериментов (Design of experiments, DoE). Преимущество моделирования при изучении процессов заключается в том, что данная методика позволяет одновременно анализировать несколько входных параметров и их влияние на показатели качества, при этом значительно сокращая количество экспериментов.

Цель. Выбор оптимального способа сушки травы полыни осенней для дальнейшего получения растительного лекарственного препарата или РФС.

Материалы и методы. В процессе эксперимента было использовано следующее оборудование: ручной комбайн для сбора растений, поддоны или стеллажи с сетчатым дном, инфракрасные подложки, конвективный сушильный шкаф, стеллажи с поддонами под навесом в естественных условиях, траворезка, вибросита. Также исследование проведено в соответствии с принципами концепции «Quality by Design» с применением программы Minitab Statistical Software 21, с использованием статистического инструмента – моделирование экспериментов (Design of experiments, DoE).

Результаты и обсуждение. Результаты исследований различных методов сушки показали, что наиболее оптимальной является сушка ИК-излучением, которая позволяет сохранить содержание ЭМ (основной группы БАВ) на оптимальном уровне – около 1,7 % при влажности сырья не более 13 %. Данные, полученные при моделировании эксперимента в программе Minitab, были сопоставимы с результатами классической схемы эксперимента. Установлен оптимальный метод и технологические параметры сушки травы полыни осенней: применение ИК-излучения, температура – 35–45 °С и время сушки – 14–17 ч. Получены сопоставимые данные по исследуемым технологическим параметрам трех последовательно произведенных серий, и подтверждена валидность технологического процесса сушки травы полыни осенней.

Заключение. Проведен сравнительный анализ методов сушки ЛРС травы полыни осенней (*Artemisia serotina* Bunge): ИК-излучения, конвективной и теневой сушки в естественных условиях. Установлено, что максимальное содержание ЭМ (как основной группы БАВ) в сырье наблюдается при использовании сушки методом ИК-излучения при температуре 35–45 °С в течение 14–17 ч. При этом остаточная влажность ЛРС составляет не более 13 %, что соответствует фармакопейным требованиям. Проведенные исследования прогнозирования оптимальных параметров сушки при помощи программы Minitab Statistical Software 21 показали сопоставимость с результатами эксперимента. На основании полученных результатов предложен оптимальный метод сушки травы полыни осенней для применения в производстве и получения ЛРС фармакопейного качества.

Ключевые слова: полынь осенняя (*Artemisia serotina* Bunge), растительная фармацевтическая субстанция, сушка растительного сырья, моделирование экспериментов, Minitab

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

© Кадырбай А., Сакипова З. Б., Криштанова Н. А., Ибрагимова Л. Н., Ибраева М. Б., Сакипов А. Е., Бекболатова Э. Н., Ридванов Ч., Сермухамедова О. В., Адилбек Е., Сейдуали Т. Е., Анартаева А. Х., Казим А. Ю., 2023

© Kadyrbay A., Sakipova Z. B., Krishtanova N. A., Ibragimova L. N., Ibrayeva M. B., Sakipov A. E., Bekbolatova E. N., Ridvanov Ch., Sermukhamedova O. V., Adilbek Y., Seiduali T. Y., Anartayeva A. K., Kazim A. U., 2023

Вклад авторов. А. Кадырбай принадлежит концепция и дизайн работы. М. Б. Ибраева, А. Е. Сакипов и О. В. Сермухамедова осуществили основные этапы исследования. Е. Адилбек, А. Ю. Казим и Т. Е. Сейдуали проводили обработку экспериментальных данных. Ч. Ридванов и Э. Н. Бекболатова проводили идентификацию растительного сырья. Все авторы участвовали в написании текста статьи и в обсуждении результатов.

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

Для цитирования: Кадырбай А., Сакипова З. Б., Криштанова Н. А., Ибрагимова Л. Н., Ибраева М. Б., Сакипов А. Е., Бекболатова Э. Н., Ридванов Ч., Сермухамедова О. В., Адилбек Е., Сейдуали Т. Е., Анартаева А. Х., Казим А. Ю. Разработка оптимальной технологии сушки лекарственного растительного сырья из полыни осенней (*Artemisia serotina* Bunge) на основе сравнительного анализа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):80–90. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1578>

Development of Optimal Technology for Drying Herbal Medicinal Raw Materials from Autumn Wormwood (*Artemisia serotina* Bunge) Based on Comparative Analysis

Arshyn Kadyrbay¹, Zuriyadda B. Sakipova¹, Nadezhda A. Krishtanova³, Liliya N. Ibragimova¹, Mariyam B. Ibrayeva¹✉, Asanali E. Sakipov¹, Elmira N. Bekbolatova², Chakho Ridvanov², Olga V. Sermukhamedova^{1,4}, Yernur Adilbek¹, Temirlan Y. Seiduali¹, Akida K. Anartayeva¹, Aidyam U. Kazim²

¹ Asfendiyarov Kazakh National Medical University. 88/4, Tole Bi str., Almaty, 050000, Republic of Kazakhstan

² LLP "Abdi Ibrahim Global Farm". Mukhametzhon Tuimebaev village, Ili district, Almaty region, 040703, Republic of Kazakhstan

³ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

⁴ LLP "Fitoleum". 25, Mametova str., Esik, 040400, Republic of Kazakhstan

✉ **Corresponding author:** Mariyam B. Ibrayeva. **E-mail:** ibraevamb2001@gmail.com

ORCID: Arshyn Kadyrbay – <https://orcid.org/0000-0002-5288-6742>; Zuriyadda B. Sakipova – <https://orcid.org/0000-0003-4477-4051>; Nadezhda A. Krishtanova – <https://orcid.org/0000-0002-4761-2077>; Liliya N. Ibragimova – <https://orcid.org/0000-0002-8381-5330>; Mariyam B. Ibrayeva – <https://orcid.org/0000-0003-1916-8084>; Asanali E. Sakipov – <https://orcid.org/0000-0003-1400-1971>; Elmira N. Bekbolatova – <https://orcid.org/0000-0003-4695-1947>; Chakho Ridvanov – <https://orcid.org/0009-0003-3689-1757>; Olga V. Sermukhamedova – <https://orcid.org/0000-0002-0179-1858>; Yernur Adilbek – <https://orcid.org/0009-0003-3386-6978>; Temirlan Y. Seiduali – <https://orcid.org/0009-0003-9991-2236>; Akida K. Anartayeva – <https://orcid.org/0009-0002-0929-8002>; Aidyam U. Kazim – <https://orcid.org/0009-0003-9795-4774>.

Received: 19.09.2023

Revised: 19.10.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Choosing the optimal method for drying medicinal plants is an important aspect of obtaining herbal materials of pharmacopoeial quality. At the site of the pharmaceutical enterprise Fitoleum LLP (Esik, Kazakhstan), a technology for obtaining herbal materials from autumn wormwood (*Artemisia serotina* Bunge) was developed, within the framework of which the optimal drying method was studied using IR radiation, convective drying and shadow drying in natural conditions. In parallel with the experimental approach, a method for simulating drying conditions was implemented. The development of technology for the obtaining of herbal materials is implemented using the "Quality by Design" concept, one of the principles of which is the modeling of experiments (Design of experiments, DoE). The advantage of modeling when studying the processes is that this technique allows you to simultaneously analyze several input parameters and their impact on quality indicators, while significantly reducing the number of experiments.

Aim. To choose the optimal method for drying autumn wormwood herb for further production of herbal medicine or herbal materials.

Materials and methods. During the experiment, the following equipment was used: a manual harvester for collecting plants, pallets or racks with a mesh bottom, infrared substrates, a convective drying oven, racks with pallets under a canopy in natural conditions, a grass cutter, vibrating sieves. Also, the study was carried out in accordance with the principles of the "Quality by Design" concept using the Minitab Statistical Software 21 program, using a statistical tool – Design of experiments (DoE).

Results and discussion. The results of studies of various drying methods have shown that the most optimal is drying with IR radiation, which allows to maintain the content of essential oils (the main group of biologically active substances) at the optimal level – about 1,7 % with a raw material moisture content of no more than 13 %. The data obtained by simulating the experiment in the Minitab program were comparable to the results of the classical experimental design. The optimal method and technological parameters for drying autumn wormwood have been established – the use of IR radiation, temperature of 35–45 °C and drying time of 14–17 hours. Comparable data on the studied technological parameters of three sequentially produced series were obtained and the validity of the technological process for drying autumn wormwood was confirmed.

Conclusion. Comparative analysis of the methods of drying medicinal plants – IR radiation, convective and shadow drying in natural conditions – of autumn wormwood (*Artemisia serotina* Bunge) was carried out. It has been established that the maximum content of essential oils (as the main group of biologically active substances) in raw materials is observed when using drying using IR radiation at a temperature of 35–45 °C for 14–17 hours. At the same time, the residual moisture content of the drug is no higher than 13 %, which corresponds to pharmacopoeial requirements. Conducted studies of predicting optimal drying parameters using the Minitab Statistical Software 21 program showed comparability with the experimental results. Based on the results obtained, an optimal method for drying autumn wormwood herb was proposed for use in production and obtaining pharmacopoeial quality medicinal products.

Keywords: autumn wormwood (*Artemisia serotina* Bunge), herbal materials, drying of plant materials, experiment modeling, Minitab

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. Arshyn Kadyrbay is responsible for the concept and design of the work. Mariyam B. Ibrayeva, Asanali E. Sakipov and Olga V. Sermukhamedova carried out the main stages of the study. Yernur Adilbek, Aidyam Yu. Kazim and Temirlan E. Seyduali processed the experimental data. Chakho Ridvanov and Elmira N. Bekbolatova carried out the identification of plant materials. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

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: Kadyrbay A., Sakipova Z. B., Krishtanova N. A., Ibragimova L. N., Ibrayeva M. B., Sakipov A. E., Bekbolatova E. N., Ridvanov Ch., Sermukhamedova O. V., Adilbek Y., Seiduali T. Y., Anartayeva A. K., Kazim A. U. Development of optimal technology for drying herbal medicinal raw materials from autumn wormwood (*Artemisia serotina* Bunge) based on comparative analysis. *Drug development & registration*. 2023;12(4):80–90. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1578>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛРС	лекарственное растительное сырье
ИК	инфракрасный
ПМВ	потеря в массе при высушивании
РФС	растительная фармацевтическая субстанция
СП	спецификация качества
ФСК	фармацевтическая система качества
ЭМ	эфирное масло
GACP (англ. Good Agricultural and Collection Practice)	руководство по надлежащей агрокультурной практике и практике заготовки исходных материалов растительного происхождения
DoE (англ. Design of experiments)	моделирование/планирование экспериментов
LOD (англ. Loss on drying)	потеря в массе при высушивании

ВВЕДЕНИЕ

Научно-практическое значение для фармацевтической индустрии представляет полынь осенняя (*Artemisia serotina* Bunge), представитель семейства *Asteraceae* [1, 2], которая имеет широкий ареал распространения в южном регионе Республики Казахстан, в местностях с большим уровнем инсоляции [3]. Эфирное масло (ЭМ), полученное из полыни осенней, в эксперименте проявляет противоопухолевую, фунгистатическую, антипротозойную активность [4–8].

В рамках реализации инициативной научно-исследовательской темы по направлению «Этнофармацевтическое исследование флоры Казахстана № 0115РК0245» в Казахском национальном медицинском университете им. С. Д. Асфендиярова проводится изучение эндемичного растения полыни осенней с целью создания растительной фармацевтической субстанции и лекарственных препаратов на ее основе.

Разработка технологии получения растительных фармацевтических субстанций (РФС) реализуется с применением концепции «Quality by Design», одним из принципов которой является моделирование экспериментов (Design of experiments, DoE). Это статистическая методика оптимизации реакций и процессов, которая предусматривает одновременное изменение и сравнение различных параметров для определения оптимальных значений показателей качества. Преимущество моделирования при изучении процессов заключается в том, что данная методика позволяет одновременно анализировать несколько входных параметров и их влияние на показатели качества, при этом значительно сокращая количество экспериментов. По результатам такого анализа можно определить оптимальные значения изучаемых параметров, при которых готовый продукт будет иметь надлежащее качество. Исходя из этого целью настоящего исследования был выбор оптимального способа сушки травы полыни осенней для дальнейшего получения растительного лекарственного препарата или РФС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор дикорастущего сырья *Artemisia serotina* Bunge проводили в соответствии с требованиями GACP и разработанными стандартными операционными процедурами фармацевтического предприятия ТОО «Фитолеум» (ФСК-СМК-СОП-№145-СО-2022) в Алматинской области, на подгорной равнине западной оконечности Заилийского Алатау (N 43 20 32.0 E 075 32 47.0) в период с середины августа до середины сентября 2022¹. Проведена видовая идентификация в РГП «Институт ботаники и фитониринга» Республики Казахстан. Надземную часть растения срезали длиной 15–25 см от верхушки, применяя

¹ Об утверждении Правил надлежащей практики выращивания, сбора, обработки и хранения исходного сырья растительного происхождения: Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 26 января 2018 года № 15. РГП на ПХВ «Институт законодательства и правовой информации Республики Казахстан» Министерства юстиции Республики Казахстан. 2012. Доступно по: <http://adilet.zan.kz/rus/docs/H18EV000015>. Ссылка активна на 14.03.2023.

ручной способ сбора, в утреннее время с 7:00 до 10:00 ч. Сушку растительного сырья проводили 3 способами: с применением инфракрасного (ИК) излучения, конвекции и в тени в естественных условиях (рисунок 1).

Технология 1. Собранное растительное сырье сушили с использованием инфракрасного (ИК) излучения (BOYN, Hangzhou Boyn Instrument Co., LTD., Китай)

в температурном диапазоне от 25 до 65 °С, при плотности теплового потока от 3 до 4 кВт/м², скорости воздуха в сушильной камере до 1,5 м/с, длине волны от 1,2 до 5 мкм.

Технология 2. Собранное растительное сырье сушили в конвекционном сушильном шкафу (SFB 500, Memmert, Германия) в температурном диапазоне от 25 до 65 °С, при скорости воздуха в сушильной камере 1,5 м/с.

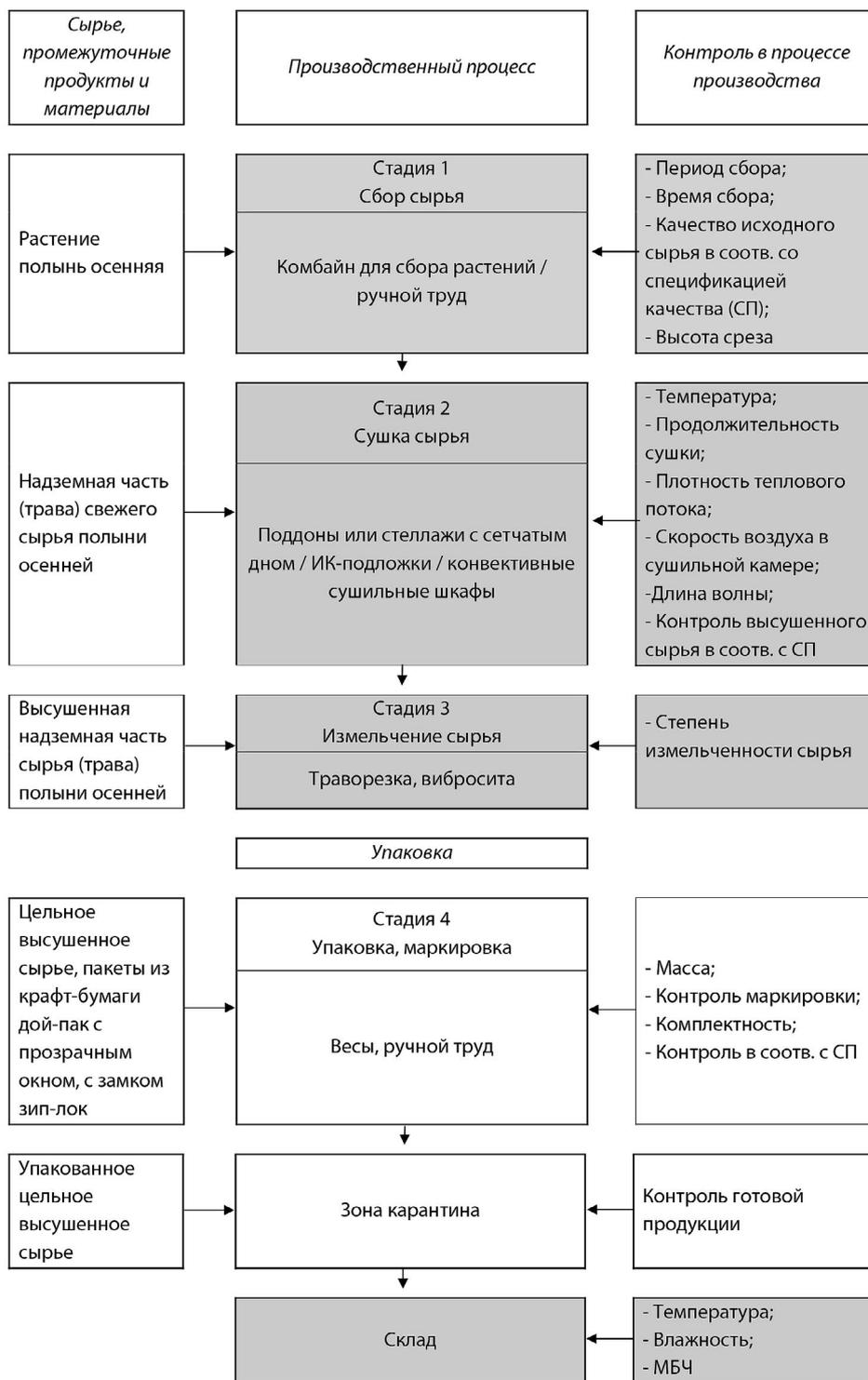


Рисунок 1. Технологическая схема заготовки и переработки травы полыни осенней

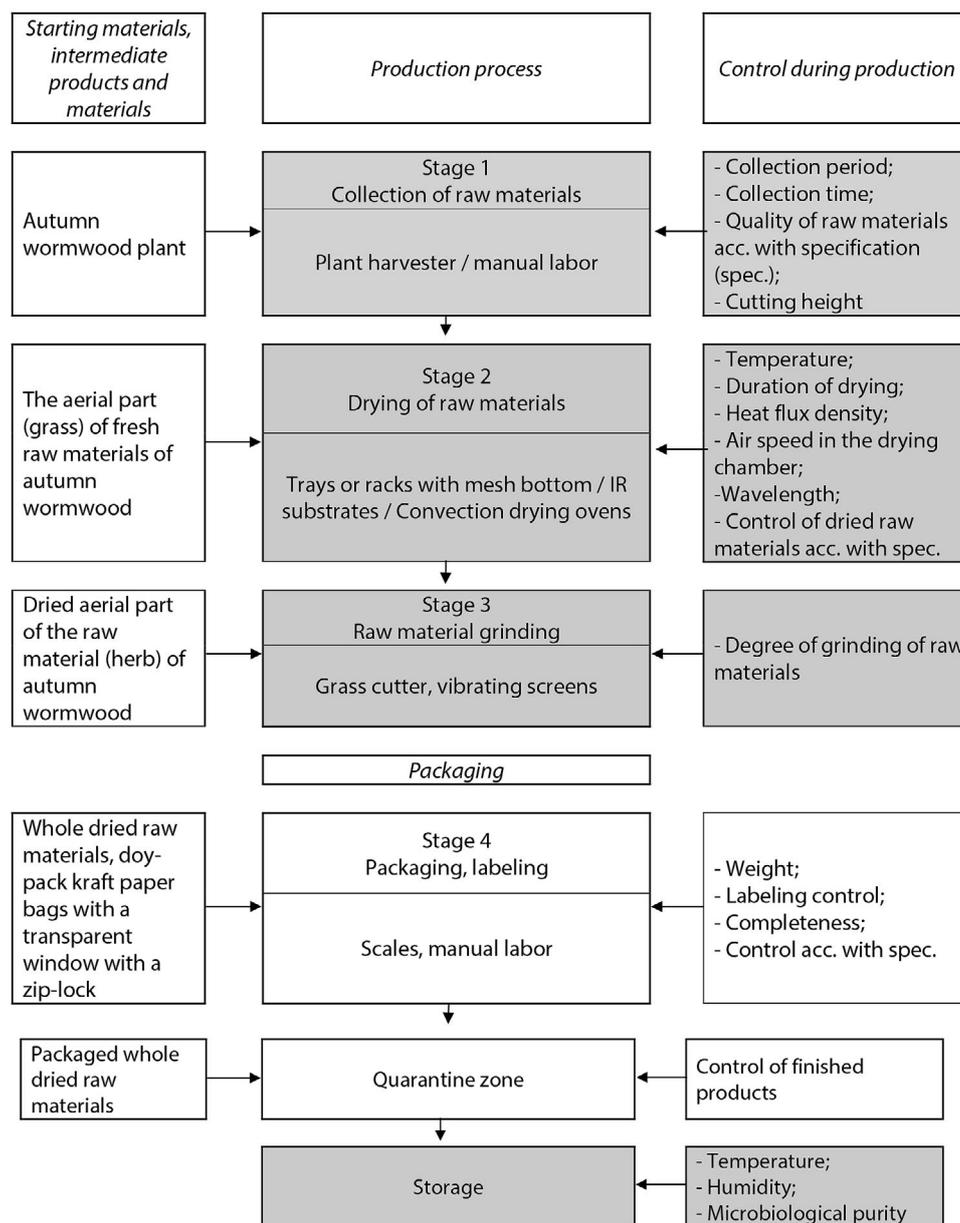


Figure 1. Technological scheme of harvesting and processing of autumn wormwood

Технология 3. Собранное растительное сырье сушили в естественных условиях в тени в температурном диапазоне от 25 до 50 °С.

Траву раскладывали на поддоны (для технологии 3 допускается использование стеллажей) с сетчатым дном в один слой и сушили до остаточного содержания влаги не более 13 %, которую контролировали гравиметрически.

На рисунке 1 представлена схема заготовки и переработки травы полыни осенней с указанием критических стадий производства, а также контролируемые параметры на различных стадиях.

Сравнение и выбор оптимальной технологии сушки проводили по результатам количественного определения содержания эфирного масла (ЭМ) в высушенном различными способами ЛРС полыни осенней. Со-

держание эфирного масла контролировали способом гидродистилляции на аппарате Клевенджера [9].

В процессе заготовки и переработки сырья было использовано следующее оборудование: ручной комбайн для сбора растений, поддоны или стеллажи с сетчатым дном, ИК-подложки, стеллажи с поддонами под навесом в естественных условиях, траворезка, виброрита.

В эксперименте использовали квалифицированное технологическое и лабораторное оборудование, применяемые фармакопейные аналитические методики прошли этап верификации.

Статистический анализ результатов осуществляли при помощи программы Minitab 21 [10, 11]. Стабильность технологического процесса оценивали с помощью контрольных карт.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБУЖДЕНИЯ

Сравнительный анализ различных методов сушки. Содержание ЭМ в ЛРС полыни осенней и продолжительность сушки при различных методах и использовании температурных режимов в диапазоне от 25 до 65 °С с интервалом в 5 °С приведены в таблицах 1, 2.

На рисунке 2 представлено графическое отображение метода сушки травы полыни осенней с применением ИК-излучения. При увеличении температуры сушки от 25 до 45 °С наблюдается сокращение времени сушки на 33,3 %, а содержание ЭМ колеблется в пределах от 1,63 до 1,69 %. Однако при увеличении температуры до 50 °С и более наблюдается

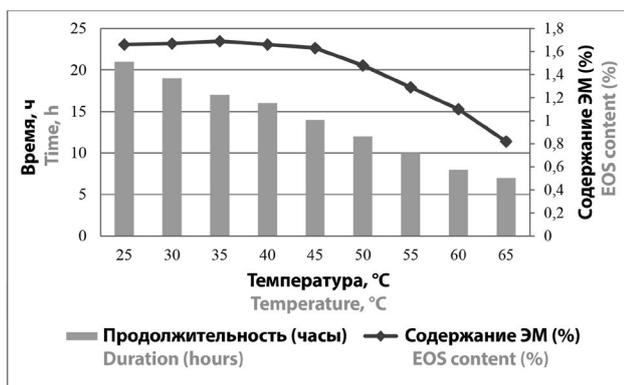


Рисунок 2. Диаграмма влияния температурного режима на количественное содержание эфирного масла и время переработки полыни осенней при инфракрасном излучении

Figure 2. Diagram of the influence of the temperature regime on the quantitative content of essential oil and the processing time of wormwood by infrared radiation

резкое снижение (приблизительно на 12 %) содержания ЭМ в исследуемом ЛРС. Таким образом, оптимальными параметрами сушки с применением ИК-излучения являются: температурный режим 35–45 °С и время сушки 14–17 ч.

Результаты исследований показали, что самый низкий выход ЭМ (0,69 %) относится к методу сушки в конвективном сушильном шкафу (рисунок 3) при следующих технологических параметрах: температура – 65 °С, время – 28 ч, в то время как высокий выход ЭМ (1,69 %) характерен для способа сушки с применением ИК-излучения при технологических параметрах: температура – 35 °С, время – 17 ч.

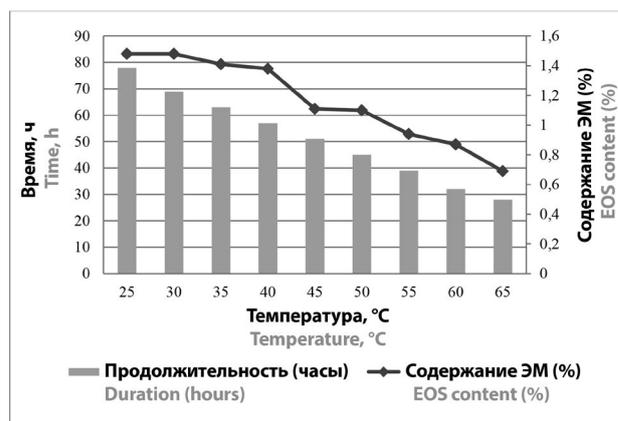


Рисунок 3. Диаграмма влияния температурного режима на количественное содержание эфирного масла и время сушки травы полыни осенней в конвективном сушильном шкафу

Figure 3. Diagram of the influence of the temperature regime on the assay of essential oil and the processing time of autumn wormwood grass in a convective drying cabinet

Таблица 1. Содержание ЭМ в ЛРС полыни осенней при различных температурных режимах и методах сушки

Table 1. Results of the essential oil content in herbal medicinal raw materials of autumn wormwood under various temperature conditions and drying methods

Метод сушки Drying method	Содержание эфирного масла при заданных значениях температуры Essential oil content at given temperatures								
	25 °C, %	30 °C, %	35 °C, %	40 °C, %	45 °C, %	50 °C, %	55 °C, %	60 °C, %	65 °C, %
ИК-сушка IR drying	1,660,02	1,67 ± 0,01	1,69 ± 0,01	1,66 ± 0,02	1,63 ± 0,01	1,48 ± 0,02	1,29 ± 0,015	1,10 ± 0,02	0,82 ± 0,01
Конвективная сушка Convective drying	1,48 ± 0,03	1,48 ± 0,102	1,41 ± 0,01	1,38 ± 0,01	1,11 ± 0,03	1,10 ± 0,02	0,94 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,69 ± 0,02

Таблица 2. Продолжительность сушки ЛРС полыни осенней при различных температурных режимах и методах сушки

Table 2. Results of drying duration of herbal medicinal raw materials of autumn wormwood under different temperature conditions and drying methods

Метод сушки Drying method	Время сушки при различных температурных режимах Drying time at different temperatures								
	25 °C, ч	30 °C, ч	35 °C, ч	40 °C, ч	45 °C, ч	50 °C, ч	55 °C, ч	60 °C, ч	65 °C, ч
ИК-сушка IR drying	21 ± 2	19 ± 1	17 ± 2	16 ± 1	14 ± 1	12 ± 2	10 ± 1	8 ± 1	7 ± 2
Конвективная сушка Convective drying	78 ± 1	69 ± 2	63 ± 2	57 ± 2	51 ± 1	45 ± 2	39 ± 1	32 ± 1	28 ± 2

Необходимо отметить, что метод сушки в тени в естественных условиях позволяет сохранить оптимальное содержание эфирного масла в сырье (1,51 %), однако время процесса сушки, которое напрямую зависит от погодных условий, составляет более 13 дней.

Таким образом, выбранный оптимальный режим сушки (применение ИК-излучения, температура – 35–45 °С и время сушки – 14–17 ч) был включен в опытно-промышленный регламент.

Моделирование экспериментов. Параллельно практическому эксперименту проводили исследование в соответствии с принципами концепции «Quality by Design» с применением программы Minitab Statistical Software 21, используя статистический инструмент DoE [12–17].

Эксперимент был разделен на 2 этапа: первый – определение оптимальных значений для параметров «температура» и «время» для получения целевого значения влажности высушенного сырья, второй этап – определение оптимальных значений этих же параметров для получения максимального содержания эфирного масла в высушенном сырье. Диапазоны варьирования технологических параметров, которые впоследствии были введены в программу Minitab для построения модельных экспериментов, соответствуют следующим значениям: температурный режим – 25–65 °С и время сушки – 7–21 ч.

При моделировании экспериментов оптимальные технологические параметры процесса сушки травы полыни осенней методом ИК-излучения определяли путем анализа их влияния на числовые значения показателей качества «Потеря в массе при высушивании» и «Содержание эфирного масла».

Построенная на первом этапе модель определила в программе Minitab 13 необходимых экспериментов с заданными параметрами «температура» и «время». Все 13 экспериментов были выполнены, а результаты зафиксированы (таблица 3). В графу ПМВ (LOD) введены данные показателя «Потеря в массе при высушивании», полученные в результате проведения экспериментов. Методика DoE, используя статистическую обработку данных, раскрыла взаимосвязь технологических параметров между собой и с показателем качества «Потеря в массе при высушивании».

После статистической обработки данных программой Minitab было получено следующее уравнение:

$$\begin{aligned} \text{LOD} = & 165,5 - 2,481 \text{ Temperature} - 10,83 * \text{Time} + \\ & 0,00968 * \text{Temperature} * \text{Temperature} + \\ & 0,1928 * \text{Time} * \text{Time} + 0,0732 * \text{Temperature} * \text{Time}, \end{aligned}$$

позволяющее определить функциональную взаимосвязь между показателем качества «Потеря в массе при высушивании» (ПМВ/LOD) и входными параметрами – температурой и временем, а также смоделировать эксперимент (рисунок 4), в котором будет определена зона Design Space, позволяющая при различном варьировании параметров в определенном диапазоне получать продукт надлежащего качества.

Таблица 3. Результаты исследования модели DoE по показателю качества «Потеря в массе при высушивании» в ЛРС полыни осенней при сушке методом ИК-излучения

Table 3. Results of the study of the DoE model in terms of quality loss on drying in herbal medicinal raw materials of autumn wormwood during processing by infrared radiation

Порядок RunOrder	Тип точки PtType	Температура, °С Temperature, °C	Время, ч Time, h	ПМВ, % LOD, %
1	0	45,0000	14,0000	5,9
2	0	45,0000	14,0000	5,8
3	-1	45,0000	4,1005	53,0
4	1	65,0000	7,0000	5,1
5	-1	73,2843	14,0000	1,8
6	0	45,0000	14,0000	6,0
7	-1	45,0000	23,8995	3,1
8	1	25,0000	21,0000	6,1
9	0	45,0000	14,0000	5,8
10	-1	16,7157	14,0000	32,0
11	1	25,0000	7,0000	51,0
12	1	65,0000	21,0000	1,2
13	0	45,0000	14,0000	5,7

Моделирование экспериментов продемонстрировало наглядную взаимосвязь между технологическими параметрами и показателем качества «Потеря в массе при высушивании», где оптимальные параметры представлены целевой зоной в полуэллиптической форме со светло-зеленым оттенком (см. рисунок 4).

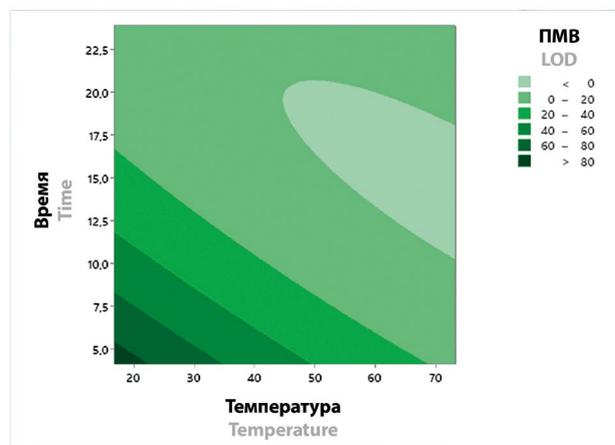


Рисунок 4. Взаимосвязь параметров «температура» и «время» с показателем качества «Потеря в массе при высушивании»

Figure 4. Relationship of temperature and time parameters with the quality indicator «loss on drying»

С применением методики моделирования экспериментов были построены 3D-модели взаимосвязи технологических параметров и показателя качества «Потеря в массе при высушивании», в которых можно рассмотреть числовые значения исследуемого показателя качества при различных условиях (рисунок 5).

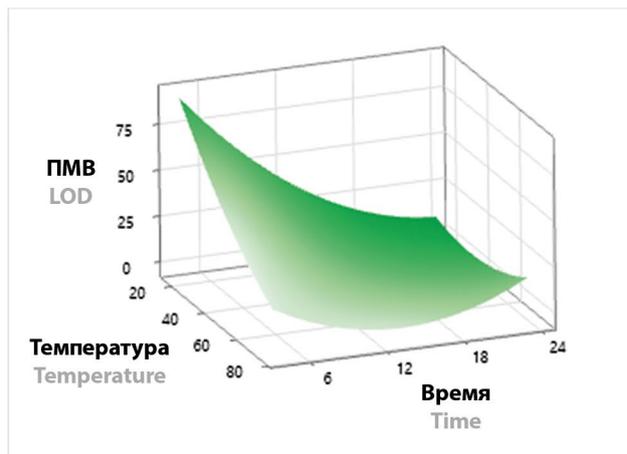
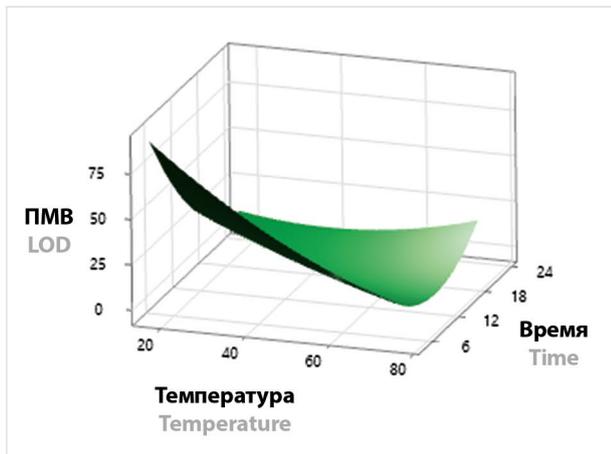


Рисунок 5. 3D-модели взаимосвязи технологических параметров и показателя качества «Потеря в массе при высушивании»
Figure 5. 3D models of the relationship between technological parameters and the quality indicator «loss on drying»

Функция Response Optimizer программы Minitab позволяет не только рассмотреть влияние параметров на значение показателя качества, но и установить взаимосвязь между двумя параметрами (рисунок б), что позволило определить оптимальные показатели: температура – 45 °С и время – 14 ч. При этом потеря в массе при высушивании составила 5,8 %, что сопоставимо с результатами эксперимента.

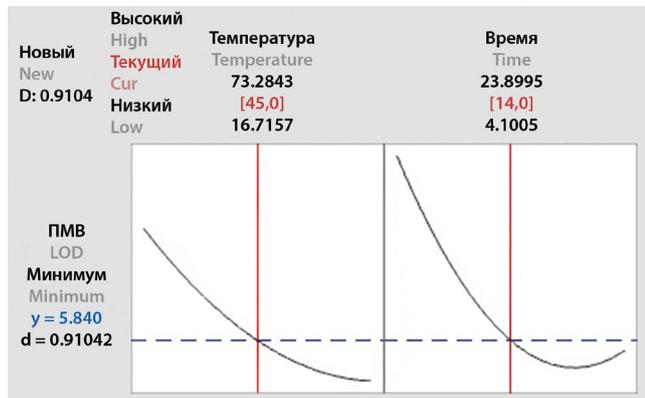


Рисунок 6. Взаимосвязь технологических параметров температуры и времени от потери в массе при высушивании
Figure 6. The relationship between technological parameters of temperature and time to loss on drying

На основании исследований на первом этапе были удалены технологические параметры, при которых значения показателя качества «Потеря в массе при высушивании» выходили за пределы регламентируемых норм (строки 3, 10 и 11, таблица 3). Полученные результаты позволили смоделировать эксперименты (таблица 4) для второго этапа с показателем качества «Содержание эфирного масла». Количество экспериментов сократилось с 13 до 11. Эксперименты 8 и 9 были исключены из дальнейшей

работы, так как они требуют установки параметра температуры за пределами диапазона, определенно-го в первом этапе.

Таблица 4. Результаты исследования модели DoE по показателю качества «Содержание эфирного масла» в ЛРС полыни осенней при сушке методом ИК-излучения

Table 4. Results of the DoE model study on the «assay of essential oil» in herbal medicinal raw materials of autumn wormwood during processing by infrared radiation

Порядок RunOrder	Тип точки PtType	Температура, °С Temperature, °C	Время, ч Time, h	Содержание ЭМ, % Assay, %
1	0	45,0000	14,0000	1,63
2	1	25,0000	21,0000	1,66
3	-1	45,0000	4,1005	0,26
4	0	45,0000	14,0000	1,62
5	1	65,0000	21,0000	0,11
6	0	45,0000	14,0000	1,61
7	0	45,0000	14,0000	1,63
8	-1	73,2843	14,0000	*
9	-1	16,7157	14,0000	*
10	1	65,0000	7,0000	0,82
11	-1	45,0000	23,8995	0,42
12	0	45,0000	14,0000	1,61
13	1	25,0000	7,0000	0,11

После статистической обработки данных программой Minitab было получено следующее уравнение:

$$\text{Assay} = -4,821 + 0,1146 \text{ Temperature} + 0,5664 \text{ Time} - 0,000763 \text{ Temperature} * \text{Temperature} - 0,013061 \text{ Time} * \text{Time} - 0,004036 \text{ Temperature} * \text{Time},$$

которое преобразовано в диаграмму Парето (рисунок 7). Диаграмма Парето позволяет оценить существ-

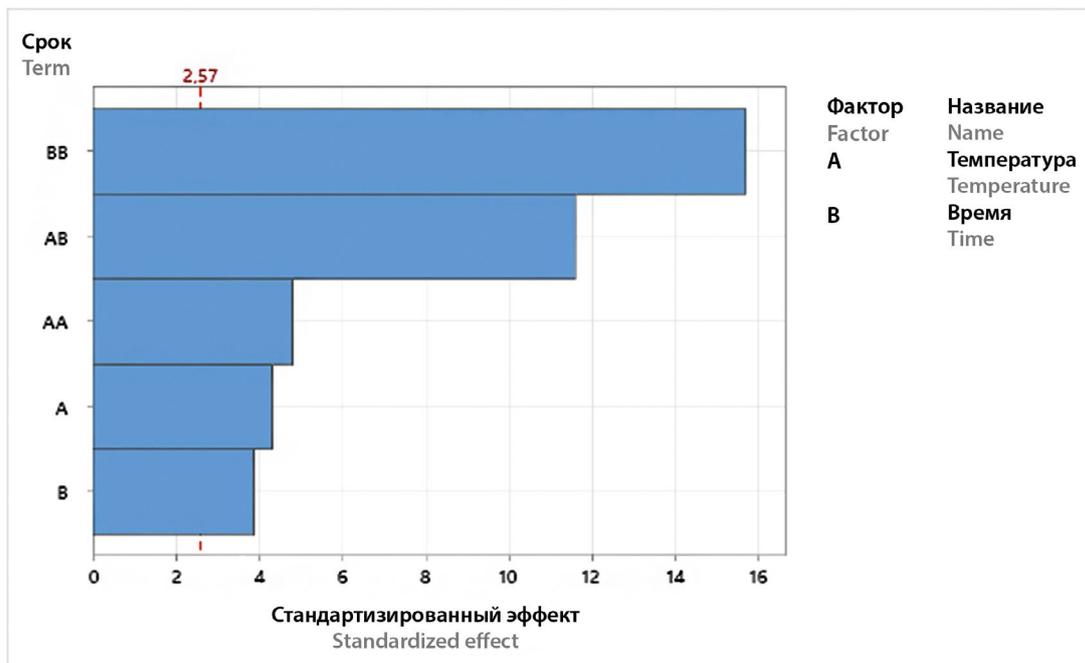


Рисунок 7. Диаграмма Парето, Response Surface Regression: взаимосвязь технологических параметров «температура» и «время» с показателем качества «Количественное содержание эфирного масла»

Figure 7. Pareto diagram, Response Surface Regression: The relationship of technological parameters temperature and time with the quality indicator «assay of essential oil»

венно значимые входные данные (как минимум 20 %), которые оказывают около 80 % эффекта на выходные данные, включая эффект интеракции. На рисунке 7 определен параметр, оказывающий наибольший существенный эффект на содержание эфирного масла в сырье (выходное данные), – время (BB).

Данный подход позволяет наблюдать взаимосвязь между технологическими параметрами «температура» и «время» и показателем качества «Содержание эфирного масла» в сырье, где оптимальные параметры представлены целевой зоной в полуовальной форме с темно-зеленым оттенком (рисунок 8).

Моделирование экспериментов продемонстрировало 3D-модели взаимосвязи технологических параметров «температура» и «время» с показателем качества «Содержание эфирного масла» посредством программы Minitab, в которых можно рассмотреть значения содержания эфирного масла в сырье при различных условиях сушки (рисунок 9).

С применением функции Response Optimizer программы Minitab рассмотрена взаимосвязь между технологическими параметрами и показателем качества «Содержание эфирного масла», а также параметров между собой (рисунок 10).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен сравнительный анализ методов сушки ЛРС травы полыни осенней (*Artemisia serotina* Bunge): ИК-излучения, конвективной сушки и теневой суш-

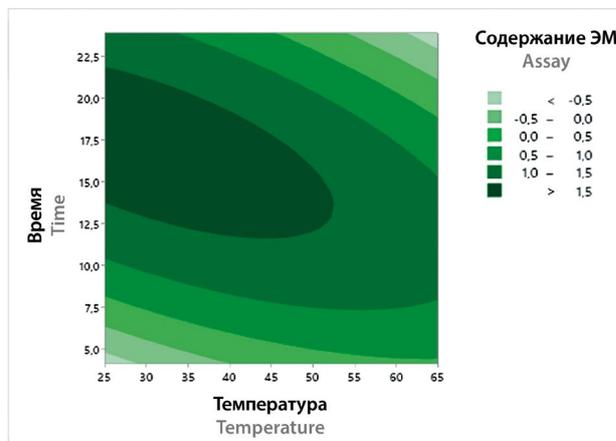


Рисунок 8. Взаимосвязь технологических параметров «температура» и «время» с показателем качества «Количественное содержание эфирного масла»

Figure 8. Relationship of technological parameters temperature and time with the quality indicator «assay of essential oil»

ки в естественных условиях. Установлено, что максимальное содержание ЭМ (как основной группы БАВ) в сырье наблюдается при использовании сушки методом ИК-излучения при температуре 35–45 °С в течение 14–17 ч. При этом остаточная влажность ЛРС составляет не более 13 %, что соответствует фармакопейным требованиям.

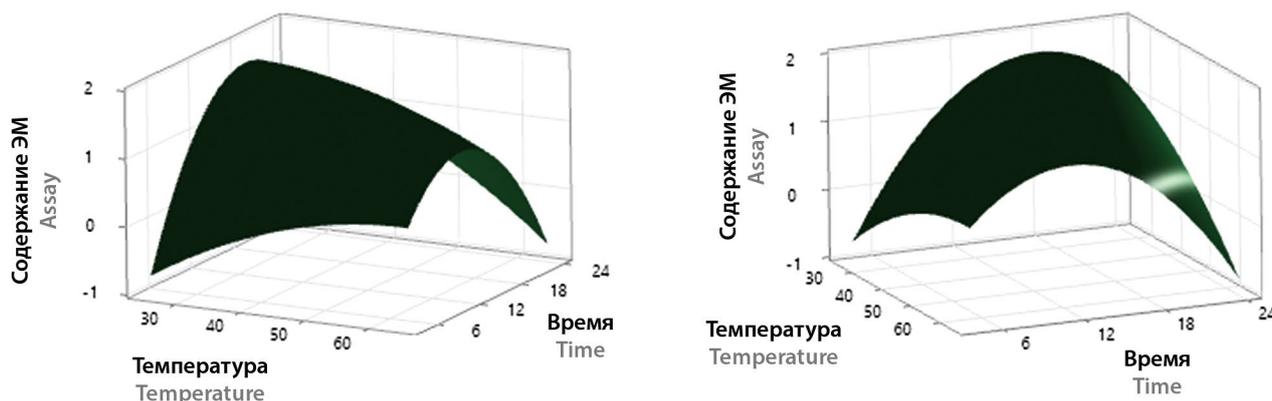


Рисунок 9. 3D-модели взаимосвязи технологических параметров «температура» и «время» с показателем качества «Количественное содержание эфирного масла»

Figure 9. 3D models of the relationship of technological parameters temperature and time with the quality indicator «assay of essential oil»

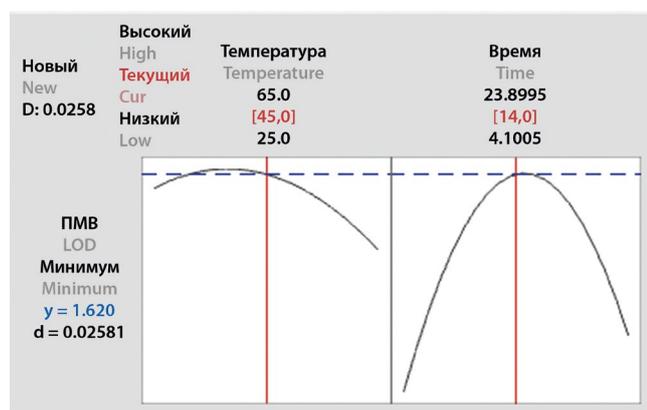


Рисунок 10. Взаимосвязь технологических параметров температуры и времени от содержания эфирного масла

Figure 10. The relationship between technological parameters of temperature and time to the essential oils assay

Проведенные исследования прогнозирования оптимальных параметров сушки при помощи программы Minitab Statistical Software 21 показали сопоставимость с результатами эксперимента. На основании полученных результатов предложен оптимальный метод сушки травы полыни осенней для применения в производстве и получения ЛРС фармакопейного качества. Результаты исследования внедрены на фармацевтическом предприятии ТОО «Фитолеум» для использования при сушке травы полыни осенней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Романтеева Ю. В., Березуцкий М. А., Курчатова М. Н. Противоопухолевая активность видов рода полынь (*Artemisia* L.): современное состояние и перспективы (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):40–51. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-40-51.
2. Kim G.-B., Lim C. E., Kim J.-S., Kim K., Lee J. H., Yu H.-J., Mun J.-H. Comparative chloroplast genome analysis of *Artemisia* (Asteraceae) in East Asia: insights into evolutionary divergence and phylogenomic implications. *BMC Genomics*. 2020;21(1):415. DOI: 10.1186/s12864-020-06812-7.
3. Хасанов Ф. О. Определитель растений Средней Азии. Ташкент: Фан; 2015.
4. Nurlybekova A., Kudaibergen A., Kazymbetova A., Amangeldi M., Baiseitova A., Ospanov M., Aisa H. A., Ye Y., Ibrahim M. A., Jenis J. Traditional Use, Phytochemical Profiles and Pharmacological Properties of *Artemisia* Genus from Central Asia. *Molecules*. 2022;27(16):5128. DOI: 10.3390/molecules27165128.
5. Rehman A., Saeed S., Ahmed A. Genetic diversity and population structure of *Seriphidium* Sub-genus of *Artemisia* from different terrains of Balochistan, Pakistan. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2021;22(5):2658–2664. DOI: 10.13057/biodiv/d220525.
6. Ivanescu B., Miron A., Corciova A. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2015;2015:247685. DOI: 10.1155/2015/247685.
7. Mukhamatkhanova R. F., Bobakulov K. M., Sham'ianov I. D., Abdullaev N. D. Terpenoids and other components of *Artemisia Serotina* and *A. Sodiaria* grown in Uzbekistan. *Chemistry of plant raw material*. 2017;2:133–136. DOI: 10.14258/JCPRM.2017021591.
8. Taherkhani M., Rustaiyan A., Nahrevanian H., Salehzadeh E. In vivo Antimalarial Activity of Iranian Flora *Artemisia oliveriana* J. Gay ex DC. Extract and its Comparison with Other Anti-malarial Drugs Against *Plasmodium berghei* in Mice Model. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 2013;3(3):173–182. DOI: 10.1080/22311866.2013.782755.
9. Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Том 1. Алматы: Издательский дом «Жибек Жолы»; 2008. 592 с.
10. Okagbue H. I., Oguntunde P. E., Obasi E. C. M., Akhmetshin E. M. Trends and usage pattern of SPSS and Minitab Software in Scientific research. *Journal of Physics: Conference Series*. 2021;1734. DOI: 10.1088/1742-6596/1734/1/012017.
11. Allen T. T. Software Overview and Methods Review: Minitab. *Introduction to Engineering Statistics and Lean Six Sigma*. 2019. P. 575–600. DOI: 10.1007/978-1-4471-7420-2_24.
12. Durakovic B. Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*. 2017;5(3):421–439. DOI: 10.21533/pen.v5i3.145.
13. Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Басевич А. В., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Марченко А. Л., Смирнова Е. М. Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):45–48. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.

14. Селезнева А. И., Смирнов В. А., Горячкин В. В., Чадова Н. Н., Поляков С. В., Шестаков В. Н., Абрамович Р. А. Интегрированная модель системы менеджмента качества лабораторных исследований лекарственных средств (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):148–165. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-148-165.
15. 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.
16. Politis S. N., Colombo P., Colombo G., Rekkas D. M. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017;43(6):889–901. DOI: 10.1080/03639045.2017.1291672.
17. Beg S., Hasnain M. S., Rahman M., Swain S. Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles, and Applications. In: *Pharmaceutical Quality by design. Principles and applications*. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2019. P. 1–17. DOI: 10.1016/B978-0-12-815799-2.00001-0.
13. Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A. V., Sorokin V. V., Kauhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design. *Drug development & registration*. 2019;8(3):45–48. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
14. Selezneva A. I., Smirnov V. A., Goryachkin V. V., Chadova N. N., Polyakov S. V., Shestakov V. N., Abramovich R. A. The Integrated Model of Quality Management System of Laboratory Studies of Medicines (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(3):148–165. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-148-165.
15. 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.
16. Politis S. N., Colombo P., Colombo G., Rekkas D. M. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017;43(6):889–901. DOI: 10.1080/03639045.2017.1291672.
17. Beg S., Hasnain M. S., Rahman M., Swain S. Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles, and Applications. In: *Pharmaceutical Quality by design. Principles and applications*. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2019. P. 1–17. DOI: 10.1016/B978-0-12-815799-2.00001-0.

REFERENCES

1. Romanteeva Yu. V., Berezutsky M. A., Kurchatova M. N. Antitumor Activity of Species of the Genus *Artemisia* L.: Current State and Prospects (Review). *Drug development & registration*. 2023;12(1):40–51. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-40-51.
2. Kim G.-B., Lim C. E., Kim J.-S., Kim K., Lee J. H., Yu H.-J., Mun J.-H. Comparative chloroplast genome analysis of *Artemisia* (Asteraceae) in East Asia: insights into evolutionary divergence and phylogenomic implications. *BMC Genomics*. 2020;21(1):415. DOI: 10.1186/s12864-020-06812-7.
3. Khasanov F. O. Determinant of plants of Central Asia. Tashkent: Fan; 2015. (In Russ.)
4. Nurlybekova A., Kudaiberger A., Kazymbetova A., Amangeldi M., Baiseitova A., Ospanov M., Aisa H. A., Ye Y., Ibrahim M. A., Jenis J. Traditional Use, Phytochemical Profiles and Pharmacological Properties of *Artemisia* Genus from Central Asia. *Molecules*. 2022;27(16):5128. DOI: 10.3390/molecules27165128.
5. Rehman A., Saeed S., Ahmed A. Genetic diversity and population structure of *Seriphidium* Sub-genus of *Artemisia* from different terrains of Balochistan, Pakistan. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2021;22(5):2658–2664. DOI: 10.13057/biodiv/d220525.
6. Ivanescu B., Miron A., Corciova A. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2015;2015:247685. DOI: 10.1155/2015/247685.
7. Mukhamatkhanova R. F., Bobakulov K. M., Sham'ianov I. D., Abdullaev N. D. Terpenoids and other components of *Artemisia Serotina* and *A. Soudiana* grown in Uzbekistan. *Chemistry of plant raw material*. 2017;2:133–136. DOI: 10.14258/JCPRM.2017021591.
8. Taherkhani M., Rustaiyan A., Nahrevanian H., Salehizadeh E. In vivo Antimalarial Activity of Iranian Flora *Artemisia oliveriana* J. Gay ex DC. Extract and its Comparison with Other Anti-malarial Drugs Against *Plasmodium berghei* in Mice Model. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 2013;3(3):173–182. DOI: 10.1080/22311866.2013.782755.
9. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. Volume 1. Almaty: Publishing House «Zhibek Zholy»; 2008. 592 p. (In Russ.)
10. Okagbue H. I., Oguntunde P. E., Obasi E. C. M., Akhmetshin E. M. Trends and usage pattern of SPSS and Minitab Software in Scientific research. *Journal of Physics: Conference Series*. 2021;1734. DOI: 10.1088/1742-6596/1734/1/012017.
11. Allen T. T. Software Overview and Methods Review: Minitab. *Introduction to Engineering Statistics and Lean Six Sigma*. 2019. P. 575–600. DOI: 10.1007/978-1-4471-7420-2_24.
12. Durakovic B. Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*. 2017;5(3):421–439. DOI: 10.21533/pen.v5i3.145.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1579>
УДК 615.012



Оригинальная статья / Research article

Изучение влияния матрицеобразующих полимеров на скорость высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток

Ю. М. Коцур✉, Е. В. Флисюк, К. О. Сидоров, И. А. Титович, И. А. Наркевич

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: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliya.kocur@spcpu.ru

ORCID: Ю. М. Коцур – <http://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 18.09.2023 Статья принята в печать: 15.11.2023 Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Технология влажного гранулирования представляет собой процесс направленного укрупнения частиц сыпучих материалов для придания удовлетворительных свойств таблеточным массам и, как следствие, достижения удовлетворительных характеристик целевых таблеток. Кроме того, в результате применения технологии влажного гранулирования при условии использования специальных вспомогательных веществ становится возможным управлять скоростью и кинетикой высвобождения активных фармацевтических субстанций из таблеток для достижения необходимого терапевтического эффекта.

Цель. Изучение влияния матрицеобразующих компонентов, входящих в состав смесей для гранулирования, на скорость высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток.

Материалы и методы. Объектами исследования являлась оригинальная субстанция 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия, а также ряд вспомогательных веществ, к числу которых относились полимеры, применяемые для лекарственных форм с пролонгированным высвобождением, опудривающий компонент – стеарилфумарат натрия, а также порообразователи – ПВП и МКЦ. Ключевые параметры таблеток и кинетика растворения были изучены в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XIV изд. и Фармакопеи ЕАЭС.

Результаты и обсуждение. Для всех таблеток удалось достичь пролонгированного высвобождения, однако более 90 % вещества через 12 часов высвобождали таблетки, содержащие этилцеллюлозу в качестве матрицеобразующего полимера. Высвобождение АФС из таблеток данного состава являлось наиболее равномерным и было приближено к кинетике нулевого порядка.

Заключение. Проведено изучение влияния матрицеобразующих компонентов, входящих в состав смесей для гранулирования, на скорость высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток. Наиболее равномерно и полно высвобождается АФС из таблеток, в которых матрицеобразующим полимером является этилцеллюлоза в количестве 27,7 %.

Ключевые слова: влажное гранулирование, скорость высвобождения, кинетика высвобождения, таблетки с пролонгированным высвобождением, 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия

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

Вклад авторов. Е. В. Флисюк и Ю. М. Коцур спланировали эксперимент. Ю. М. Коцур проводила запланированные исследования. К. О. Сидоров, И. А. Титович, И. А. Наркевич участвовали в обработке и интерпретации результатов. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании статьи.

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

Для цитирования: Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Сидоров К. О., Титович И. А., Наркевич И. А. Изучение влияния матрицеобразующих полимеров на скорость высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):91–95. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1579>

Study of the Effect of Matrix-forming Polymers on the Release Rate of Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate from Tablets

Yulia M. Kotsur✉, Elena V. Flisyuk, Kirill O. Sidorov, Irina A. Titovich, Igor A. Narkevich

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

✉ Corresponding author: Yulia M. Kotsur. E-mail: uliya.kocur@spcpu.ru

ORCID: Yulia M. Kotsur – <http://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 18.09.2023 Revised: 15.11.2023 Published: 24.11.2023

© Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Сидоров К. О., Титович И. А., Наркевич И. А., 2023

© Kotsur Yu. M., Flisyuk E. V., Sidorov K. O., Titovich I. A., Narkevich I. A., 2023

Abstract

Introduction. Wet granulation technology is a process of directed particle aggregation of powder materials to obtain required properties of tablet masses and, as a consequence, to achieve satisfactory characteristics of tablets. In this addition, as a result of wet granulation technology, if special excipients are used, it becomes possible to control the rate and kinetics of release of active pharmaceutical substances from tablets to achieve the desired therapeutic effect.

Aim. To study the effect of matrix-forming components included in the composition of mixtures for granulation on the rate of release of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate from tablets.

Materials and methods. The original substance sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate, as well as a number of excipients, which included polymers used for prolonged-release dosage forms, lubricant – sodium stearyl fumarate, as well as pore-forming agents – PVP and MCC, were the objects of the study. The key parameters of tablets and dissolution kinetics were studied in accordance with the requirements of State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition and Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union

Result and discussion. Prolonged release was achieved for all tablets, but more than 90 % of the substance was released after 12 hours in tablets containing ethylcellulose as a matrix-forming polymer. The release of APS from tablets of this formulation was the most prolonged.

Conclusion. The effect of matrix-forming components included in the composition of mixtures for granulation on the rate of release of 4,4'-(propanediamido)sodium dibenzoate from tablets has been studied. The most uniform and complete release of ASF from tablets in which the matrix-forming polymer is ethylcellulose in the amount of 27.7 %.

Keywords: wet granulation, release rate, release kinetics, tablets with prolonged release, sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate

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 V. Flisyuk and Yulia M. Kotsur planned an experiment. Yulia M. Kotsur conducted the planned studies. Kirill O. Sidorov, Irina A. Titovich, Igor A. Narkevich participated in the processing and interpretation of the results. All authors participated in data processing, discussion of the results and writing 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: Kotsur Yu. M., Flisyuk E. V., Sidorov K. O., Titovich I. A., Narkevich I. A. Study of the effect of matrix-forming polymers on the release rate of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate from tablets. *Drug development & registration*. 2023;12(4):91–95. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1579>

ВВЕДЕНИЕ

Технология влажного гранулирования представляет собой процесс направленного укрупнения частиц порошкообразных материалов с применением увлажнителей, целью которого является улучшение качества получаемых таблеточных смесей за счет повышения сыпучести, прессуемости, однородности частиц по размеру. Такие качества таблеточных смесей, в свою очередь, позволяют добиться однородности дозирования в таблетках, предотвратить расслоение таблеток и минимизировать проявление внешних дефектов, таких как сколы, трещины и пр. [1–3].

Помимо прочего, технологию влажного гранулирования применяют и при разработке таблеток с модифицированным высвобождением, например пролонгированным. Применение данной технологии позволяет включить АФС в матричный носитель, образованный полимером с необходимыми свойствами. Тип полимера, его природа и свойства, а также процентное содержание в таблетке позволяют задать требуемую скорость и кинетику высвобождения АФС

для достижения оптимального терапевтического эффекта [4–6].

Цель работы. Изучение влияния матрицеобразующих компонентов, входящих в состав смесей для гранулирования, на скорость высвобождения 4,4'-(пропандиаамидо)добензоата натрия из таблеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась оригинальная АФС, 4,4'-(пропандиаамидо)добензоат натрия, обладающая антистеатозным и гепатопротекторным действием.

В качестве материалов для замедленного высвобождения ЛВ применяли гидрофильные и инертные полимеры: ГПМЦ торговой марки VIVAPHARM® (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия); карбомер торговой марки Carbopol® 71G NF (Lubrizol Corporation, США); ЭЦ торговой марки BonuCel® (BIOGRUND GmbH, Германия).

В качестве порообразующих и дополнительных связующих компонентов использовали ПВП торговой марки Kollidon® CL (BASF, Германия) и МКЦ Microcel® 101 (Roquette, Франция).

Таблица 1. Составы таблеточных смесей

Table 1. Compositions of tablet mixtures

Компонент, % Ingredient %	Состав 1 Mixture 1	Состав 2 Mixture 2	Состав 3 Mixture 3	Состав 4 Mixture 4	Состав 5 Mixture 5	Состав 6 Mixture 6
4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия Sodium 4,4'-(propanediamido)di-benzoate	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
VivaPharm®	27,7	40,0				
BonuCel®			27,7	40,0		
Carbopol® 71					27,7	40,0
Kollidon CL	11,3	5,0	11,3	5,0	11,3	5,0
Microcel® 101	10,0	4,0	10,0	4,0	10,0	4,0
Стеарилфумарат натрия Sodium stearyl fumarate	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Итого Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

В качестве лубриканта применяли стеарилфумарат натрия PRUV® (JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Германия). На момент исследования АФС и ВВ имели неистекшие сроки годности.

Полимеры в состав смеси вводили в количестве 27,7 и 40 % от массы таблетки, что обусловлено предварительными исследованиями, а также данными литературы¹ [4, 5]. Составы таблеточных смесей в процентном содержании на одну таблетку приведены в таблице 1. Для исследования получали таблетки по следующей технологии.

Компоненты смеси каждого состава отвешивали исходя из загрузки массой 100,0 г, а затем просеивали на сите с размером отверстий 0,5 мм.

Все компоненты таблеточной смеси, кроме опудривающего, помещали в ротационный смеситель типа «пьяная бочка» DGN-II и проводили смешение при скорости вращения ротора 45 об/мин в течение 10 мин.

Операцию гранулирования проводили в миксере-грануляторе SMG3-6-1 (Chongqing Jingong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd, Китай) при скорости вращения импеллера 500–600 об/мин, скорость вращения чоппера – 1200 об/мин. Смесь компонентов увлажняли водой очищенной (около 20 мл) до получения слегка влажной, не пристающей к стенкам аппарата и мешалкам массы. Влажные гранулы высушивали в сушильном шкафу с принудительной конвекцией OF-12G (Jeio Tech Co., Ltd., Корея) до остаточной влажности (1,5 ± 0,5) %.

Полученный гранулят калибровали в коническом калибраторе ZLJ-125 с использованием сита с диаметром отверстий 1,0 см. Гранулят опудривали стеарилфумаратом натрия при скорости вращения ротора 45 об/мин в течение 5 мин.

¹ Фармакопея Евразийского экономического союза. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01426917/err_13082020_100. Ссылка активна на 20.09.2023.

Из гранулятов получали таблетки массой 0,360 г и диаметром 10 мм на однопуансонном таблеточном прессе ERWEKA EP-1 при усилии прессования (0,2–0,5) кН. Полученные таблетки контролировали по показателям: описание, однородность массы, прочность на раздавливание – в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд. и Фармакопеи ЕАЭС² [7].

Изучение кинетики высвобождения проводили на приборе для теста «Растворение» DT620 (ERWEKA GmbH, Германия) в условиях, моделирующих движение таблетки по ЖКТ: в первые два часа 0,01 М раствор соляной кислоты – для имитации прохождения через желудок, далее со 2 по 12 час – фосфатный буферный раствор pH 6,8. Объем среды растворения составлял 1000 мл при температуре (37 ± 0,5) °С. Для проведения испытания применяли прибор I «Вращающаяся корзинка» со скоростью вращения 100 об/мин. Каждый из 6 сосудов наполняли соответствующей средой растворения. 6 таблеток по одной помещали в каждый аппарат «Вращающаяся корзинка» и проводили испытание. По прошествии 2 часов производили полную замену среды растворения. Отбирали пробы по 10 мл по истечении 2, 4, 6, 8, 10 и 12 часов с восполнением среды растворения. Отобранную пробу фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Брали аликвоту 5 мл и помещали в мерную колбу на 50 мл, объем раствора доводили до метки водой очищенной. Количество вещества, перешедшего в среду растворения определяли методом УФ-спектрофотометрии при длине волны (268 ± 2) нм в кювете кварцевого стекла с толщиной поглощающего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную. В качестве раствора стандартного образца (PCO) использовали раствор субстанции 4,4'-

² Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 2. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 20.09.2023.

(пропандиамидо)дibenзоат натрия (СПХФУ, Россия) с содержанием основного вещества не менее 99,7 %.

Пригодность методики УФ-спектрофотометрии, обоснование выбранных условий, а также описание приготовления стандартного образца были приведены в результатах исследования Е. В. Флисюк и соавт [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведения контроля качества таблеток представлены в таблице 2.

Полученные таблетки обладали удовлетворительным внешним видом, соответствовали требованиям

прочности на раздавливание и истираемости, предъявляемым ГФ РФ XIV изд.

Результаты изучения кинетики растворения приведены на рисунке 1.

Для всех таблеток удалось достичь пролонгированного высвобождения, однако более 90 % вещества через 12 часов высвобождали таблетки, содержащие этилцеллюлозу в качестве матрицеобразующего полимера. Более медленное высвобождение из таблеток других составов может быть связано с образованием гелевого слоя на поверхности гидрофильных полимеров ГМПЦ и карбопола при их набухании, через который АФС медленнее диф-

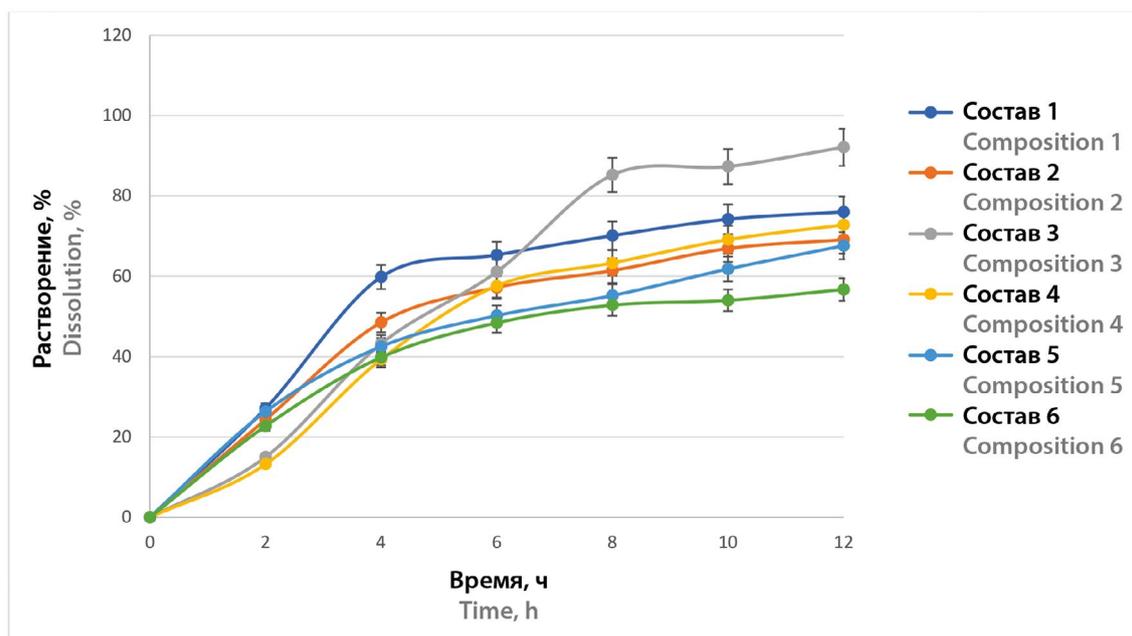


Рисунок 1. Профили растворения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток с пролонгированным высвобождением в среде объемом 1000 мл

Figure 1. Dissolution profiles of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate from prolonged release tablets in medium volume of 1000 ml

Таблица 2. Результаты контроля качества таблеток на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия

Table 2. Results of quality control of tablets based on sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate

Показатель качества Quality control parameter	Описание Appearance	Однородность массы, г Mass homogeneity, g	Прочность на раздавливание, Н Crushing strength, N	Истираемость, % Abrasion, %
Состав 1 Composition 1	Белые двояковыпуклые таблетки без сколов и трещин White, round, biconvex, no chips or cracks	0,360 ± 0,003	89 ± 5	0,13 ± 0,07
Состав 2 Composition 2		0,355 ± 0,006	92 ± 1	0,12 ± 0,05
Состав 3 Composition 3		0,365 ± 0,004	105 ± 3	0,24 ± 0,07
Состав 4 Composition 4		0,362 ± 0,003	105 ± 2	0,20 ± 0,03
Состав 5 Composition 5		0,360 ± 0,004	110 ± 5	0,11 ± 0,04
Состав 6 Composition 6		0,358 ± 0,002	98 ± 3	0,10 ± 0,03

фундируют в среду растворения, в то время как ЭЦ, обладающая инертными свойствами по отношению к воде и водным растворам, не образует дополнительного гелевого слоя, а ПВП и МКЦ образуют при растворении поры в инертном матриксе, что обеспечивает замедленную, но необходимую скорость высвобождения АФС [9, 10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено изучение влияния матрицеобразующих компонентов, входящих в состав смесей для гранулирования, на скорость высвобождения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия из таблеток. Наиболее равномерно и полно высвобождается АФС из таблеток, в которых матрицеобразующим полимером является этилцеллюлоза в количестве 27,7 %.

ЛИТЕРАТУРА

- Писарев Д. И., Новиков О. О., Жилиякова Е. Т., Бойко Н. Н., Абрамович Р. А., Потанина О. Г., Лазар С., Ахмад А. С., Нассер Р. Разработка состава и технологии гранулированной лекарственной формы на основе густого экстракта расторопши пятнистой и адеметионина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):106–112. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-106-112.
- Абросимова О. Н., Буракова М. А. Масштабирование процесса гранулирования в условиях GMP тренинг-центра и оценка возможных рисков. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):131–137. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-131-137.
- Абросимова О. Н., Пивоварова Н. С., Буракова М. А., Шибитченко Т. С. Разработка технологии и состава средства для полости рта на основе фитосубстанций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):37–45. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-37-45.
- Алходри А., Суслина С. Н. Разработка гранул цефекоксиба для получения капсул и таблеток пролонгированного высвобождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):68–73. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-68-73.
- Nandhakumar S., Sugreevudu G., Harikrishnan N. Formulation design and Evaluation of Extended-Release Tablets of Oxybutynin for Effective Management of Overactive Bladder Syndrome. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021;14(12):6558–6564. DOI: 10.52711/0974-360X.2021.01135.
- Milind J. A., Keyur S. P., Deppa R. P., Zil P. P., Jayanti V. B. Formulation and evaluation of sustained-release pellets of lornoxicam. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(4):221–227. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).2135-46.
- Ситенкова (Буховец) А. В., Ситенков А. Ю., Мустафин Р. И. Интерполимерные комплексы Eudragit® EPO/Eudragit® S100 как перспективные носители для пероральных систем контролируемой доставки. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):36–43. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-36-43.
- Коцур Ю. М., Ладутько Ю. М., Наркевич И. А., Флисюк Е. В. Прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия с применением метода SeDeM. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):54–62. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
- Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю. Разработка методики проведения теста «Растворение» для таблеток 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия с пролонгированным высвобождением. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):146–154. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154.
- Викторова А. С., Елизарова Е. С., Романова Р. С., Тимергалиева В. Р., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И. Интерполимерные комплексы на основе Carbopol® и поли(2-этил-2-оксазолино) как носители для трансбuccальной доставки метформина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):48–55. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55.

REFERENCES

- Pisarev D. I., Novikov O. O., Zhilyakova E. T., Boyko N. N., Abramovich R. A., Potanina O. G., Lazar S., Ahmad A. S., Nasser R. Development of the composition and technology of a granular dosage form based on a thick milk thistle extract and ademetonine. *Drug development & registration*. 2020;9(2):106–112. (in Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-106-112.
- Abrosimova O. N., Burakova M. A. Scaling of the granulation process in the conditions of GMP training center and assessment of possible risks. *Drug development & registration*. 2021;10(3):131–137. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-131-137.
- Abrosimova O. N., Pivovarova N. S., Burakova M. A., Shebitchenko T. S. Development of technology and composition of the medicinal product for oral cavity based on phytosubstances. *Drug development & registration*. 2021;10(4–1):37–45. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-37-45.
- Alkhodri A., Suslina S. N. Development of celecoxib granules for manufacturing of prolonged release celecoxib capsules and tablets. *Drug development & registration*. 2022;11(1):68–73. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-68-73.
- Nandhakumar S., Sugreevudu G., Harikrishnan N. Formulation design and Evaluation of Extended-Release Tablets of Oxybutynin for Effective Management of Overactive Bladder Syndrome. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021;14(12):6558–6564. DOI: 10.52711/0974-360X.2021.01135.
- Milind J. A., Keyur S. P., Deppa R. P., Zil P. P., Jayanti V. B. Formulation and evaluation of sustained-release pellets of lornoxicam. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021;13(4):221–227. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(5).2135-46.
- Bukhovets A. V., Sitenkov A. Y., Moustafine R. I. Interpolymer complexes Eudragit® EPO/Eudragit® S100 as carriers for oral controlled drug delivery systems. *Drug development & registration*. 2020;9(3):36–43. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-36-43.
- Kotsur Ju. M., Ladytko Ju. M., Narkevich I. A., Flisyuk E. V. Prediction of the composition of prolonged release tablets based on 4,4'-(propanediamido) sodium dibenzoate using the SeDeM method. *Drug development & registration*. 2021;10(4–1):54–62. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
- Flisyuk E. V., Kotsur Ju. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu. Development of the "Dissolution" test method for tablets of sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate with sustained release. *Drug development & registration*. 2021;10(4–1):146–154. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-146-154.
- Viktorova A. S., Elizarova E. S., Romanova R. S., Timergaliev V. R., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer complexes based on Carbopol® and poly(2-ethyl-2-oxazoline) as carriers for buccal delivery of metformin. *Drug development & registration*. 2021;10(1):48–55. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55.



Оригинальная статья / Research article

Роль геометрической конфигурации производного диэтиламиноэтанола в фармацевтической разработке готовой лекарственной формы на его основе

Ю. М. Коцур , К. М. Церковная, Е. В. Флисюк, И. А. Титович, К. О. Сидоров, И. А. Наркевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

 Контактное лицо: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliya.kocur@spcru.ru

ORCID: Ю. М. Коцур – <http://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; К. М. Церковная – <https://orcid.org/0000-0001-5047-0295>;
Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>;
К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 18.09.2023

Статья принята в печать: 15.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Всестороннее изучение молекулы активной фармацевтической субстанции (АФС) является одним из определяющих критериев фармацевтической разработки в соответствии с концепцией Quality by Design (QbD) и основными положениями ICH Q8. Пространственное расположение атомов в молекуле нередко оказывает значительное влияние на физико-химические и технологические свойства АФС, а следовательно, и на способ получения готовой лекарственной формы (ГЛФ) из нее.

Цель. Изучение некоторых свойств веществ, геометрических изомеров молекулы, представляющей собой производное диэтиламиноэтанола (ДЭАЭ), а также сравнение выбранных технологий получения ГЛФ.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись два вещества, пространственные изомеры молекулы, производного ДЭАЭ, обладающего нейротропным, антиастеническим и антиоксидантным действием. Изучение свойств АФС и полученных таблеток было проведено в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XIV изд., Фармакопеи Евразийского экономического союза, а также Европейской фармакопеи 9.0 изд. В качестве вспомогательных веществ использованы вещества, обладающие не истекшим на момент исследования сроком годности, а также разрешенные для медицинского применения.

Результаты и обсуждение. Геометрическая конфигурация производного ДЭАЭ оказывает влияние на свойства АФС, что влияет на этапы фармацевтической разработки, в особенности на разработку технологии и состава ГЛФ. При использовании цис-ДЭАЭ значительно упрощается технологический процесс и улучшается качество получаемого препарата, и, как следствие, может быть достигнута лучшая стабильность и увеличены сроки хранения ГЛФ.

Заключение. В ходе исследования были изучены некоторые свойства АФС цис-ДЭАЭ и проведено их сравнение с аналогичными свойствами транс-ДЭАЭ. Проведено сравнение технологий получения таблеток на основе двух указанных конфигураций молекулы производного ДЭАЭ. Было установлено, что изомеры обладают различными технологическими свойствами, а также существенно отличаются по влагосорбционной способности. Данное свойство определяет подход к получению таблеток. Технология производства таблеток на основе цис-ДЭАЭ представляется более простой, а ГЛФ на ее основе – более стабильной.

Ключевые слова: геометрическая конфигурация, изомерия, гигроскопичность, твердые дисперсные системы, влажное гранулирование, прямое прессование

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

Вклад авторов. Е. В. Флисюк и Ю. М. Коцур спланировали эксперимент. Ю. М. Коцур и К. М. Церковная проводили запланированные исследования. И. А. Титович, К. О. Сидоров, И. А. Наркевич участвовали в обработке и интерпретации результатов исследования. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании статьи.

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

Для цитирования: Коцур Ю. М., Церковная К. М., Флисюк Е. В., Титович И. А., Сидоров К. О., Наркевич И. А. Роль геометрической конфигурации производного диэтиламиноэтанола в фармацевтической разработке готовой лекарственной формы на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):96–100. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1583>

The Role of the Geometric Configuration of Diethylaminoethanol Derivative in the Pharmaceutical Development of a Dosage Form Based on It

Yulia M. Kotsur , Kseniya M. Tserkovnaya, Elena V. Flisyuk, Irina A. Titovich, Kirill O. Sidorov, Igor A. Narkevich

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

 Corresponding author: Yulia M. Kotsur. E-mail: uliya.kocur@spcru.ru

© Коцур Ю. М., Церковная К. М., Флисюк Е. В., Титович И. А., Сидоров К. О., Наркевич И. А., 2023

© Kotsur Yu. M., Tserkovnaya K. M., Flisyuk E. V., Titovich I. A., Sidorov K. O., Narkevich I. A., 2023

ORCID: Yulia M. Kotsur – <http://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Kseniya M. Tserkovnaya – <https://orcid.org/0000-0001-5047-0295>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>;
Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 18.09.2023 Revised: 15.11.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. A comprehensive study of the active pharmaceutical ingredient (API) molecule is one of the defining criteria for pharmaceutical development according to the Quality by Design (QbD) concept and the ICH Q8 framework. The spatial arrangement of atoms in the molecule often has a significant impact on the physicochemical and technological properties of API, and hence on the method of producing dosage form based on it.

Aim. To study some properties of substances, geometrical isomers of the molecule, which is a derivative of diethylaminoethanol (DEAE), as well as to compare the selected technologies for the preparation of dosage form.

Materials and methods. The objects of the study were two substances, spatial isomers of the molecule, a derivative of DEAE, possessing neuroprotective, antiasthenic and antioxidant effects. The study of properties of API and the obtained tablets was carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition, the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union, as well as the European Pharmacopoeia 9.0 edition. In this research were used substances that have not expired at the time of the study, as well as authorized for medical use.

Результаты и обсуждение. The geometrical configuration of the DEAE derivative influences the properties of the API, which has an impact on the stages of pharmaceutical development, especially on the development of the technology and formulation of dosage form. The use of cis-DEAE significantly simplifies the technological process and improves the quality of the resulting drug, and as a consequence, better stability and longer shelf life of dosage form may be achieved.

Conclusion. In the course of the study, some properties of cis-DEAE API were studied and compared with similar properties of trans-DEAE. A comparison of tablet preparation technologies based on the two mentioned configurations of the DEAE derivative molecule has been carried out. It was found that the isomers have different technological properties and also differ significantly in moisture adsorption capacity. This property determines the approach to tablet preparation. The technology of tablets based on cis-DEAE appears to be simpler, and dosage form based on it is more stable.

Keywords: geometric configuration, isomerism, hygroscopicity, solid dispersed systems, wet granulation, direct compression

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 V. Flisyuk and Yulia M. Kotsur planned an experiment. Yulia M. Kotsur and Kseniya M. Tserkovnaya conducted the planned studies. Irina A. Titovich, Kirill O. Sidorov, Igor A. Narkevich participated in the processing and interpretation of the research results. All authors participated in data processing, discussion of the results and writing 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: Kotsur Yu. M., Tserkovnaya K. M., Flisyuk E. V., Titovich I. A., Sidorov K. O., Narkevich I. A. The role of the geometric configuration of diethylaminoethanol derivative in the pharmaceutical development of a dosage form based on it. *Drug development & registration*. 2023;12(4):96–100. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1583>

ВВЕДЕНИЕ

Целью фармацевтической разработки является разработка качественного препарата и производственного процесса для последующего выпуска продукта. Фармацевтическая разработка включает в себя множество этапов, к числу которых относится преформуляционное исследование, например изучение физико-химических и технологических свойств активной фармацевтической субстанции (АФС), разработка состава готовой лекарственной формы (ГЛФ), а также технологии ее получения. Очевидно, что представленными пунктами фармацевтическая разработка не ограничена, однако наиболее часто трудности возникают именно на данных этапах. Основным прин-

ципом ICH Q8 является обеспечение качества препарата через его разработку^{1,2} [1–3].

Известно, что структура молекулы АФС оказывает непосредственное влияние на физико-химические, технологические и другие свойства вещества. Кро-

¹ EMEA, 2004. Guideline on ICH Topic Q8, Note for Guidance on Pharmaceutical Development, EMEA/CHMP/167068/2004. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-pharmaceutical-development_en.pdf. Accessed: 20.09.2023.

² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года No 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Доступно по: http://www.fptl.ru/biblioteka/eaeunion_lekarstva/EAEU_pravila-GMP.pdf. Ссылка активна на 20.09.2023.

ме того, влияние оказывает пространственное расположение атомов и конфигурация молекулы. С другой стороны, фактором риска при разработке ГЛФ может являться также полиморфная модификация вещества. В этой связи зачастую фармацевтическую разработку ГЛФ с известной молекулой начинают именно со всестороннего изучения изомерии и полиморфной модификации последней.

Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение некоторых свойств веществ, геометрических изомеров молекулы, представляющей собой производное диэтиламиноэтанола (ДЭАЭ), а также сравнение выбранных технологий получения ГЛФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись два вещества, пространственные изомеры молекулы, производного ДЭАЭ, обладающего нейропротекторным, антиастеническим и антиоксидантным действием. АФС были синтезированы на кафедре органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

АФС бис{2-[(2e)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-ди-этилэтанаминия} бутандиоат (далее *транс*-ДЭАЭ) была изучена, а проведенные исследования описаны в работах О. А. Терентьевой и соавт. [4–7].

АФС бис{2-[(2z)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-ди-этилэтанаминия} бутандиоат (далее *цис*-ДЭАЭ) ранее изучена не была. Обе субстанции представляли собой белый аморфный порошок без запаха и видимых включений.

В ходе исследования были изучены наиболее критичные физико-химические и технологические свойства АФС *цис*-ДЭАЭ, а именно: влагопоглощающая способность, насыпная плотность, насыпная плотность после уплотнения, сыпучесть.

Определение влагопоглощающей способности проводили по следующей методике: в климатическую камеру постоянных условий Memmert HP1011 помещали точную навеску АФС (около 1,0 г); устанавливали условия испытаний – относительную влажность 80 %, температуру (25 ± 2) °С; определяли прирост массы (%) через 24 часа¹.

Насыпную плотность, насыпную плотность после уплотнения, а также сыпучесть определяли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд., ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков»².

В качестве вспомогательных веществ в работе использовали лактозы моногидрат SuperTab® 24AN (DFE Pharma, Германия), крахмал картофельный (CAS

¹ European Pharmacopoeia. 9th edition. – Strasbourg: Council of Europe, 2016. Available at: <https://www.coe.int/en/web/portal/-/the-9th-edition-european-pharmacopoeia-maintaining-high-quality-standards-in-a-dynamic-global-environment>. Accessed: 20.09.2023.

² Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 2. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopoea.php>. Ссылка активна на 20.09.2023.

№ 65996-62-5, LYCKEBY AMYLEX, a.s., Чехия), кальция гидрофосфат DI-CAFOS® A150 (Chemische Fabrik Budenheim KG, Германия), магния стеарат фармацевтический (Leko Style, Россия). На момент проведения исследования вспомогательные вещества обладали неистекшим сроком годности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения свойств АФС *цис*-ДЭАЭ, а также аналогичные результаты для *транс*-ДЭАЭ представлены в таблице 1 [7].

Таблица 1. Свойства АФС

Table 1. Properties of APIs

	<i>цис</i> -ДЭАЭ <i>cis</i> -DEAE	<i>транс</i> -ДЭАЭ <i>trans</i> -DEAE
Влагопоглощающая способность, % Moisture absorption capacity, %	24,18 ± 0,62	52,57 ± 1,00
Насыпная плотность, г/мл Bulk density, g/ml	0,537	0,492
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл Tapped density, g/ml	0,721	0,632
Сыпучесть, с/100г Flowability, sec/100g	10,8	Не обладает сыпучестью Do not have flowability

При анализе данных установлено, что АФС *транс*-ДЭАЭ обладает худшими технологическими свойствами, чем *цис*-ДЭАЭ. Отсутствие сыпучести и низкая прессируемость первой обуславливают необходимость применения дополнительных технологических операций для получения качественного продукта. Так, для производства таблеток на основе *транс*-ДЭАЭ была предложена технология прямого прессования с применением веществ, позволяющих нивелировать неудовлетворительные технологические свойства. В составе таблеток применяли лактозы моногидрат, предназначенный для прямого прессования, также в качестве наполнителя был использован кальция гидрофосфат дигидрат, в качестве дезинтегранта – крахмал картофельный и стеарат магния в качестве лубриканта [4].

Кроме того, *транс*-ДЭАЭ обладала большей влагопоглощающей способностью, поэтому для аналогичного состава была предложена технология влажного гранулирования вспомогательных веществ с последующим смешиванием с АФС *транс*-ДЭАЭ и опудриванием. Такое введение АФС не позволяло полностью решить проблему гигроскопичности и стабильности, однако существенно снижало влагопоглощающую способность таблеток на основе *транс*-ДЭАЭ.

Для решения проблемы гигроскопичности была предложена технология гранулята для прессования таблеток через получение твердых дисперсных систем (ТДС). В приведенном исследовании получали

смеси *транс*-ДЭАЭ с ПЭГ6000 и лактозой с применением технологии экструзии горячего расплава, а также при перемешивании с высоким усилием сдвига. Данные технологические приемы позволили существенно снизить гигроскопичность АФС и при этом повысить сыпучесть за счет получения гранул, однородных по размеру. Совокупность данных факторов позволила получить таблетки удовлетворительно качества. Было отмечено, что данная технология может быть широко применена для гигроскопичных субстанций [5, 10].

Для сравнения свойств, в частности влагопоглощающей способности, были получены таблетки *цис*-ДЭАЭ. При этом использовали компоненты, аналогичные тем, которые были выбраны для таблеток на основе *транс*-ДЭАЭ (таблица 2).

Таблица 2. Составы таблеток

Table 2. Compositions of tablets

Компонент Component	Содержание в 1 таблетке Content in 1 tablet		Функциональное назначение вещества Functional purpose of the substance
	мг mg	%	
АФС API	60,0	13,3	Действующее вещество Active ingredient
Кальция гидрофосфат Calcium hydrophosphate	250,0	55,5	Наполнитель Excipient
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	50,5	11,2	Наполнитель Excipient
Крахмал картофельный Potato starch	85,0	18,9	Дезинтегрант, связу- ющее, наполнитель Desintegrant, binder, excipient
Магния стеарат Magnesium stearate	4,5	1,0	Лубрикант Lubricant
Итого Total	450,0	100,0	

Смешение компонентов, кроме лубриканта, проводили в смесителе типа «пьяная бочка». После получения однородной визуальной смеси добавляли лубрикант и проводили опудривание в том же смесителе. Из полученной таблеточной смеси прессовали таблетки массой 0,450 г и диаметром 10 мм на однопуансонном таблеточном прессе при усилии прессования 0,1–0,4 кН. Масса загружалась в матрицу без «провисаний», заполняла ее равномерно, что свидетельствует о хорошей сыпучести таблеточной смеси.

Полученные таблетки контролировали по показателям: истираемость, прочность на раздавливание, распадаемость – в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV изд.¹

¹ Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 2. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmasorea.php>. Ссылка активна на 20.09.2023.

Также определяли влагопоглощающую способность по приросту массы таблеток (%) через 24 часа при относительной влажности 80 и 50 % и температуре (25 ± 2) °С в климатической камере постоянных условий Memmert HP1011.

Результаты изучения и их сравнение с аналогичными таблетками на основе *транс*-ДЭАЭ представлены в таблице 3 [4].

Таблица 3. Свойства таблеток

Table 3. Properties of tablets

Параметр Parameter	таблетки <i>цис</i> -ДЭАЭ tablets of <i>cis</i> -DEAE	таблетки <i>транс</i> -ДЭАЭ tablets of <i>trans</i> -DEAE
Истираемость, % Abrasion, %	0,06	0,1
Прочность на раздавливание, кН Crushing strength, N	163,2 ± 1,8	156,9 ± 7,9
Распадаемость, мин Disintegration, min	2,4 ± 0,2	6,0 ± 0,3
Прирост массы через 24 ч, % Weight gain after 24 h, %	80 % влажность 80 % humidity	5,18
	50 % влажность 50 % humidity	0,89
		9,23
		1,73

Анализ полученных результатов показал, что использование в качестве АФС *цис*-ДЭАЭ при аналогичном качественном и количественном составе вспомогательных веществ позволяет улучшить качество получаемых таблеток, а также, что закономерно, снизить их гигроскопичность. Последний фактор также может оказывать значительное влияние на стабильность препарата. В случае использования *транс*-ДЭАЭ установленный по результатам исследования стабильности срок годности составил 2 года. При замене АФС срок годности может быть продлен до 3 лет [8–10].

Таким образом, геометрическая конфигурация производного ДЭАЭ оказывает влияние на свойства АФС, что, в свою очередь, оказывает влияние на этапы фармацевтической разработки, в особенности на разработку технологии получения и состава ГЛФ. При использовании *цис*-ДЭАЭ значительно упрощается технологический процесс и улучшается качество получаемого препарата, и, как следствие, может быть достигнута лучшая стабильность и увеличены сроки хранения ГЛФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования были изучены некоторые свойства АФС *цис*-ДЭАЭ и проведено их сравнение с аналогичными свойствами *транс*-ДЭАЭ. Проведено сравнение технологий получения таблеток на основе двух указанных конфигураций молекулы производного ДЭАЭ. Было установлено, что изомеры обладают различными технологическими свойствами, а также существенно отличаются по влагосорбционной спо-

собности. Данное свойство определяет подход к получению таблеток. Технология производства таблеток на основе *цис*-ДЭАЭ представляется более простой, а ГЛФ на ее основе – более стабильной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ возможности применения принципа QbD к процессу разработки лекарственных средств на отечественных фармацевтических предприятиях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(4):20–26.
2. Ампилогова И. Н., Карлина М. В., Макаров В. Г., Макарова М. Н. Взаимосвязь фармацевтической разработки и доклинических исследований. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):155–163. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163.
3. Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Сорокин В. В., Каухова И. Е. Разработка таблеток на основе фитосубстанции клевера лугового травы с применением методов планирования эксперимента и инструментов QbD. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):51–58. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-51-58.
4. Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Наркевич И. А. Разработка состава и технологии таблеток нового нейропротекторного средства с использованием дробного факторного эксперимента. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):18–22.
5. Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Флисюк Е. В., Генералова Ю. Э. Разработка таблеток, содержащих гигроскопичное активное вещество, с применением твердых дисперсий. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):23–28.
6. Оковитый С. В., Шустов Е. Б., Болотова В. Ц., Титович И. А. Нейропротекторное средство на основе бис[2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия] бутандиоата. Патент РФ на изобретение № 2015118789/152588365. 27.06.2016.
7. Терентьева О. А., Белоусова И. С., Ефремов И. В., Флисюк Е. В. Изучение физико-химических и технологических свойств фармацевтической субстанции на основе бис[2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия] бутандиоата. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». Санкт-Петербург; 14–15 ноября. СПб.: Изд-во СПХФУ; 2018. С. 369–372.
8. Абросимова О. Н., Буракова М. А. Масштабирование процесса гранулирования в условиях GMP тренинг-центра и оценка возможных рисков. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):131–137. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-131-137.
9. Доманина А. М., Черников М. В., Ремезова И. П., Степанова Э. Ф., Шевченко А. М., Морозов А. В. Получение таблеток динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-α]бензимидазола и разработка методик контроля их качества. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):62–67. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-62-67.
10. Джавахян М. А., Токарева М. Г., Прожогина Ю. Э., Каленикова Е. И. Разработка капсул «Седофлав», стандартизация и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):118–127. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-118-127.
4. Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A. Development of the composition and technology of new neuroprotective drug tablets using fractional factorial design. *Drug development & registration*. 2020;9(1):18–22. (In Russ.)
5. Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Flisyuk E. V., Generalova Yu. E. Tablet development for a hydroscopic drug using solid dispersion. *Drug development & registration*. 2020;9(1):23–28. (In Russ.)
6. Okovity S. V., Shustov E. B., Bolotova V. Ts., Titovich I. A. Neuroprotective agent based on bis[2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanamine] butane-dioate. Patent RUS No. 2015118789/152588365. 06/27/2016. (In Russ.)
7. Terenteva O. A., Belousova I. S., Efremov I. V., Flisyuk E. V. Study of the physicochemical and technological properties of a pharmaceutical substance based on bis[2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanamine] butanedioate. The materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation «Innovations in the health of the nation». St. Petersburg, November; 14–15. SPb.: Publishing house SPHFU; 2018. P. 369–372. (In Russ.)
8. Abrosimova O. N., Burakova M. A. Scaling of the granulation process in the conditions of GMP training center and assessment of possible risks. *Drug development & registration*. 2021;10(3):131–137. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-131-137.
9. Domanina A. M., Chernikov M. V., Remezova I. P., Stepanova E. F., Shevchenko A. M., Morozov A. V. Preparation of 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-α]benzimidazole dinitrate tablets and development of quality control methods. *Drug development & registration*. 2021;10(2):62–67. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-62-67.
10. Dzhavakhyan M. A., Tokareva M. G., Prozhogina Yu. E., Kalenikova E. I. Pharmaceutical development of «Sedoflav» capsules, standardization and validation of flavonoids assay methods. *Drug development & registration*. 2020;9(3):118–127. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-118-127.

REFERENCES

1. Rozhnova S. A., Tsyapkina A. V. Comparative analysis of the QbD approach in the pharmaceutical industry. *Drug development & registration*. 2019;8(4):20–26. (In Russ.)
2. Ampilogova I. N., Karlina M. V., Makarov V. G., Makarova M. N. The interconnection between pharmaceutical development and pre-clinical research. *Drug development & registration*. 2023;12(2):155–163. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163.
3. Golubev A. N., Nguen T. S., Sorokin V. V., Kauhova I. E. Tablets development based on clover meadow grass phytosubstance using design of the experiment method and QdD tools. *Drug development & registration*. 2020;9(3):51–58. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-51-58

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1582>
УДК 615.012



Оригинальная статья / Research article

Разработка технологии получения фитосубстанции расторопши пятнистой плодов (*Silybum marianum* L.) в качестве компонента комплексной терапии заболеваний печени

Б. А. Перес, А. П. Процюк, А. Б. Зеленцова, И. Е. Каухова, М. В. Ароян ✉, Е. К. Новикова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

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

ORCID: Б. А. Перес – <https://orcid.org/0000-0001-9917-9538>; А. П. Процюк – <https://orcid.org/0009-0005-7820-7129>;
А. Б. Зеленцова – <https://orcid.org/0009-0006-2750-098X>; И. Е. Каухова – <https://orcid.org/0000-0002-0896-6956>;
М. В. Ароян – <https://orcid.org/0000-0002-8314-8398>; Е. К. Новикова – <https://orcid.org/0000-0002-2602-0697>.

Статья поступила: 18.09.2023

Статья принята в печать: 00.10.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. В настоящее время среди населения распространена проблема заболеваний печени, в особенности неалкогольной жировой болезни печени, а также лекарственных поражений печени. В связи с этим существует необходимость поиска новых решений в разработке препаратов гепатотропной терапии. В клинической практике нередко используются одновременно несколько гепатопротективных средств в виде отдельных препаратов или комбинаций. Комбинированное применение субстанций в одной готовой лекарственной форме (ГЛФ) может обеспечивать как усиление того или иного фармакологического эффекта, так и расширение спектра гепатотропного действия. В состав комбинированных гепатопротекторов часто вводят компоненты растительного происхождения. Плоды расторопши пятнистой содержат не менее 2,4 % суммы флаволигнанов в пересчете на силибин, что обуславливает гепатопротекторный эффект лекарственных препаратов на их основе и объясняет перспективность использования данного растительного сырья в терапии заболеваний печени.

Цель. Разработка технологии получения сухого экстракта расторопши пятнистой плодов, обогащенного силибином.

Материалы и методы. Объектами исследования служили расторопши пятнистой плоды (*Silybum marianum* L.) Gaertn.) от двух производителей, заготовленные в июне 2022 года. Показатели качества готового продукта, сухого экстракта расторопши пятнистой плодов, определяли по методикам, описанным в Государственной фармакопее (ГФ) РФ XIV изд. Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с ГФ РФ XIV, том I, с. 289, ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Результаты и обсуждение. Предложен эффективный метод экстрагирования лекарственного растительного сырья (ЛРС), позволяющий получить наибольший выход биологически активных веществ (БАВ). Предложен способ очистки спиртоводного извлечения после экстракции. Разработана технология получения сухого экстракта расторопши пятнистой плодов. Проведена стандартизация полученного сухого экстракта.

Заключение. В ходе исследования разработана технология получения сухого экстракта расторопши пятнистой плодов. Определены показатели качества фитосубстанции, сухого экстракта расторопши пятнистой плодов, обогащенного силибином.

Ключевые слова: расторопша пятнистая, экстрагирование, сухой экстракт, флаволигнаны, гепатотропная терапия

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

Вклад авторов. А. П. Процюк и Б. А. Перес провели эксперименты по технологии получения сухого экстракта. А. Б. Зеленцова провела экспериментальную работу по определению показателей качества полученного продукта и статистическую обработку результатов. И. Е. Каухова, М. В. Ароян, Е. К. Новикова участвовали в планировании и обсуждении результатов исследования и интерпретации 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 СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Перес Б. А., Процюк А. П., Зеленцова А. Б., Каухова И. Е., Ароян М. В., Новикова Е. К. Разработка технологии получения фитосубстанции расторопши пятнистой плодов (*Silybum marianum* L.) в качестве компонента комплексной терапии заболеваний печени. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):101–110. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1582>

Development of Technology of Phytosubstantiation of *Silybum marianum* L. Fruits as a Component of Complex Therapy of Liver Diseases

Bajron A. Peres, Anastasiya P. Procyuk, Anna B. Zelencova, Irina E. Kauhova, Mariya V. Aroyan ✉, Ekaterina K. Novikova

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

© Перес Б. А., Процюк А. П., Зеленцова А. Б., Каухова И. Е., Ароян М. В., Новикова Е. К., 2023

© Peres B. A., Procyuk A. P., Zelencova A. B., Kauhova I. E., Aroyan M. V., Novikova E. K., 2023

ORCID: Bajron A. Peres – <https://orcid.org/0000-0001-9917-9538>; Anastasiya P. Procyuk – <https://orcid.org/0009-0005-7820-7129>;
Anna B. Zelencova – <https://orcid.org/0009-0006-2750-098X>; Irina E. Kauhova – <https://orcid.org/0000-0002-0896-6956>;
Mariya V. Aroyan – <https://orcid.org/0000-0002-8314-8398>; Ekaterina K. Novikova – <https://orcid.org/0000-0002-2602-0697>.

Received: 18.09.2023 Revised: 00.10.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Currently, the problem of liver diseases is widespread among the population, especially non-alcoholic fatty liver disease, as well as medicinal liver lesions. In this regard, there is a need to find new solutions in the development of hepatotropic therapy drugs. In clinical practice, several hepatoprotective agents are often used simultaneously in the form of separate drugs or combinations. The combined use of substances in one finished dosage form (FDF) can provide both an enhancement of a particular pharmacological effect and an expansion of the spectrum of hepatotropic action. Components of plant origin are often introduced into the composition of combined hepatoprotectors. *Silybum marianum* L. fruits contain at least 2.4 % of the amount of flavolignans in terms of silybin, which causes the hepatoprotective effect of medicines based on them and explains the prospects of using this vegetable raw material in the treatment of liver diseases.

Aim. Development of technology for obtaining a dry extract of *Silybum marianum* L. fruit, enriched with silybin.

Materials and methods. The objects of the study were *Silybum marianum* (L.) Gaertn. fruits from producer 2, harvested in June 2022. The quality indicators of the finished product, a dry extract of *Silybum marianum* (L.) fruit, were determined by the methods described in the SP XIV ed. Statistical processing of the research results was carried out in accordance with SP XIV ed., Volume I, p. 289, GM.1.1.0013.15 "Statistical processing of the results of a chemical experiment".

Results and discussion. The optimal method of extraction of medicinal plant raw materials is proposed, which allows to obtain the highest yield of biologically active substances. A method of purification of ethanol-water extraction after extraction is proposed. The technology of dry extract of *Silybum marianum* (L.) fruit has been developed. Standardization of the obtained dry extract was carried out.

Conclusion. In the course of the study, the technology of dry extract of *Silybum marianum* (L.) fruit was developed. The quality indicators of phytosubstantiation, dry extract of *Silybum marianum* (L.) fruits enriched with silybin were determined.

Keywords: *Silybum marianum* (L.), extraction, flavolignan dry extract, hepatotropic therapy

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

Contribution of the authors. Anastasiya P. Procyuk and Bajron A. Peres conducted experiments on the technology of obtaining a dry extract. Anna B. Zelencova conducted experimental work to determine the quality indicators of the resulting product and statistical processing of the results. Irina E. Kauhova, Mariya V. Aroyan, Ekaterina K. Novikova participated in the discussion of the results of the study and the interpretation of 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: Peres B. A., Procyuk A. P., Zelencova A. B., Kauhova I. E., Aroyan M. V., Novikova E. K. Development of technology of phytosubstantiation of *Silybum marianum* L. fruits as a component of complex therapy of liver diseases. *Drug development & registration*. 2023;12(4):101–110. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1582>

ВВЕДЕНИЕ

Печень является ключевым органом в метаболизме и выведении многих веществ, таких как липиды, ксенобиотики, загрязнители окружающей среды и химиотерапевтические средства. Заболевания, связанные с печенью, обычно характеризуются стеатозом, гепатитом, фиброзом и циррозом печени [1]. От 10 до 40 % людей не только в Российской Федерации, но и по всему миру страдают от заболеваний печени, а именно неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), 3–5 % страдают от неалкогольного стеатогепатита (НАСГ).

Большинство заболеваний связано с факторами образа жизни. Прогрессирование заболеваний печени приводит к таким осложнениям, как цирроз печени и рак, которые крайне негативно сказываются на качестве жизни и приводят к смерти.

В связи с этим актуальна проблема профилактики и лечения заболеваний печени, для чего используются гепатопротекторы [2, 3].

В клинической практике нередко используются одновременно несколько гепатопротективных средств в виде отдельных препаратов или комбинаций.

Комбинированное применение субстанций в одной ГЛФ может обеспечивать как усиление того или иного фармакологического эффекта, так и расширение спектра гепатотропного действия [4].

В состав комбинированных гепатопротекторов часто вводят компоненты растительного происхождения [5].

Установлено, что гепатопротекторной активностью обладают суммарные извлечения из расторопши пятнистой *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Экстракт расторопши в основном содержит флавонолигнаны, фла-

воноиды (таксифолин, кверцетин) и полифенольные молекулы, он обладает различными фармакологическими свойствами, в том числе гепатопротекторным, и используется для лечения заболеваний печени, включая алкогольную болезнь печени, неалкогольную жировую болезнь печени и лекарственную токсичность [6–8].

В плодах расторопши пятнистой содержится силимарин, который оказывает такие эффекты, как ускорение восстановления поврежденных клеток печени, снижение окисления жиров, нормализация липидного обмена, улучшение биохимических показателей, регуляция транспортировки биологических жидкостей на клеточном уровне, нейтрализация и выведение гепатотоксичных веществ [9–11]. Силибин, входящий в группу флаволигнанов, обладает также антиоксидантным, противовоспалительным и противовирусным действием [12].

Для разработки оригинального комбинированного гепатопротекторного средства, содержащего в составе экстракт расторопши пятнистой, проведена разработка технологии производства данной фитосубстанции, обогащенной силибином.

Согласно патенту RU2102999C1 «Способ получения экстракта расторопши пятнистой», экстракцию ведут 80%-м этиловым спиртом методом реперколяции сначала при комнатной температуре, затем при 60–85 °С [13].

Стоит отметить, что патент на это изобретение был опубликован в 1998 году, и, судя по анализу литературы, за последние 25 лет в России не проводилось разработок по повышению эффективности технологии получения сухого экстракта расторопши пятнистой плодов.

В связи с вышеизложенным **целью данного исследования** являлась разработка технологии экстрагирования расторопши пятнистой плодов и получения сухого экстракта расторопши, обогащенного силибином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены в период с сентября 2022 года по июнь 2023 года. Объектами исследования служили расторопши пятнистой плоды (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) от фирм-производителей № 1 и № 2, заготовленные в июне 2022 года.

Входной контроль качества растительного сырья проводили по следующим показателям: влажности (анализатор влажности «Эвлас-2М», Россия), общей золе, золе, нерастворимой в 10%-й соляной кислоте (печь муфельная лабораторная LOIP LF-7/13-G1, Россия), описанию, подлинности, содержанию экстрактивных веществ, сумме флаволигнанов в пересчете на силибин, жирному маслу. Анализ был проведен согласно требованиям ГФ РФ XIV [14].

Для получения сухого экстракта навеску лекарственного растительного сырья измельчают на электро- и корнерезке (ТУ 37-53 тип 622-1-М, Россия)

до размера частиц 1,0 мм, загружают в экстрактор, заливают экстрагентом – спиртом этиловым 80%-м в соотношении «сырье:экстрагент» (1:30). Затем настаивают в течение 30 минут, после чего доводят смесь до кипения и при умеренном кипении ведут экстракцию в течение 30 минут. По окончании процесса спиртоводная вытяжка отстаивается в течение 2 суток при температуре не выше 8 °С до осадения балластных веществ с последующей фильтрацией (фильтр обеззоленный «Белая лента» d 110 мм, ООО «Мелиор», Россия). Профильтрованная вытяжка поступает в делительную воронку (ВД-1-2000 цилиндрическая, Россия) для проведения очистки от балластных веществ методом жидкостной экстракции. В качестве тяжелой фазы выступает спиртоводная вытяжка БАВ, в качестве легкой фазы – гексан (гексан чистый для анализа (C₆H₁₄), 110-54-3). Очищенное от балластных веществ спиртоводное извлечение подвергают концентрированию с последующим высушиванием в сушильном шкафу (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия). Полученный сухой экстракт с содержанием остаточной влаги не более 5 % анализировали по следующим показателям: описанию, потере в массе при высушивании (анализатор влажности «Эвлас-2М», Россия), насыпной плотности, сыпучести (ВП-12А, ТУ 64-7-260), подлинности, количественному содержанию суммы флаволигнанов (электроспектрофотометр UV mini-1240, Shimadzu, Япония), гигроскопичности. Анализ был проведен согласно методикам, приведенным в ГФ РФ XIV [14].

Определение остаточных органических растворителей (ООР) проводили методом газовой хроматографии в соответствии с ГФ РФ XIV, том I, ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» на газовом хроматографе Clarus 680 (PerkinElmer Inc., США) с пламенно-ионизационным детектором. Для приготовления испытуемого образца около 0,5 г сухого экстракта (точная навеска) поместили во флакон для парофазного анализа, добавили 5,0 мл диметилсульфоксида (99,8 %, х. ч., ООО «Компонент-Реактив», Россия) и герметично укупили.

Приготовление стандартного раствора проводили следующим образом: 10 мкл стандартного образца гексана (гексан чистый для анализа (C₆H₁₄), 110-54-3) поместили в мерную колбу 50 мл и довели объем раствора диметилсульфоксидом (99,8 %, х. ч., ООО «Компонент-Реактив», Россия) до метки. Полученный стандартный раствор разбавили в 20 раз. Аликвоту 5 мл этого стандартного раствора поместили во флакон для парофазного анализа и герметично укупили.

Определение проводилось с использованием капиллярной колонки Elite-WAX ETR 60 м, 0,32 мм, 1 мкм, в условиях программирования температуры: 120 °С в течение 4 минут с увеличением температуры до 180 °С со скоростью 10 °С/мин, затем 5 минут при конечной температуре, температура инжектора – 120 °С, температура детектора (ионизационно-пла-

менный) – 220 °С, скорость потока газа-носителя (азот) – 2 мл/мин.

Для количественной оценки содержания гексана использовали метод внешнего стандарта.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с ГФ РФ XIV, том I, с. 289, ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения исследований были закуплены расторопши пятнистой плоды от двух фирм-производителей. В рамках входного контроля был проведен сравнительный анализ по показателям качества с целью выбора сырья расторопши пятнистой плодов с большим содержанием БАВ. Анализ проводился с использованием методик, описанных в ГФ РФ XI издания [14].

Полученные результаты определения показателей качества расторопши пятнистой плодов представлены в таблице 1.

Таким образом, анализ качества расторопши пятнистой плодов различных производителей показал

соответствие качества сырья требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания [14]. Однако сырье, полученное от производителя 2, содержало большее количество суммы флаволигнанов и было использовано в дальнейшем исследовании по разработке технологии получения экстракта расторопши пятнистой плодов.

Основным биологически активным веществом, содержащимся в расторопши пятнистой плодах, является силимарин – природная композиция БАВ, состоящая главным образом из флаволигнанов и флавоноидов. Одним из главных компонентов силимарина выступает силибин, по которому проводят стандартизацию плодов и получаемого сухого экстракта. Поэтому целью разработки технологии получения фитосубстанции является выбор метода и условий экстракции и способа очистки, при которых выход сухого экстракта, обогащенного силибином, будет максимальным.

Для выбора условий экстрагирования были проведены следующие исследования: выбор экстрагента, выбор метода экстракции, время экстракции, соотношение «сырье: экстрагент».

Таблица 1. Результаты сравнительного изучения показателей качества расторопши пятнистой плодов

Table 1. The results of a comparative study of the quality indicators of *Silybum marianum* L. fruit

Наименование показателя The name of the indicator	Экспериментальные данные Results		Требования ГФ РФ XIV издания (ФС.2.5.0035.15) Requirement SP XIV ed. (GM 2.5.0035.15)	
	Производитель «1» Manufacturer «1»	Производитель «2» Manufacturer «2»		
Описание Description	Цельное сырье. Плоды – семечки яйцевидной формы, слегка сдавленные с боков, длиной от 5 до 8 мм, шириной от 2 до 4 мм. Цвет от черного до светло-коричневого. Запах слабый Whole raw materials. The fruits are ovoid compressed from the sides, 5 to 8 mm long, 2 to 4 mm wide. The color ranges from black to light brown. The smell is weak			
Определение основных БАВ Determination of the main BAS	На хроматограммах испытуемых растворов обнаруживаются зоны адсорбции фиолетового цвета на уровне зон адсорбции РСО силибина On the chromatograms of the tested solutions, purple adsorption zones are detected at the level of the adsorption zones of RS silybin		На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции РСО силибина, допускается обнаружение других зон адсорбции On the chromatogram of the test solution, a purple adsorption zone should be detected at the level of the adsorption zone of RS silybin, the detection of other adsorption zones is allowed	
Влажность, % Humidity, %	1,01 ± 0,04	4,54 ± 0,18	Не более 12 No more 12	
Зола общая, % Ash total, %	5,50 ± 0,28	5,46 ± 0,27	Не более 6 No more 6	
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, % Ash insoluble in hydrochloric acid, %	3,65 ± 0,17	3,47 ± 0,16	Не более 4 No more 4	
Количественное определение, % Quantitative content, %	Сумма флаволигнанов в пересчете на силибин Quantitative content of flavo lignans in terms of silybin	2,42 ± 0,01	5,47 ± 0,28	Не менее 2,4 No less 2,4
	Экстрактивные вещества, извлекаемые спиртом 80%-м Extractive substances, ethanol 80 %	6,06 ± 0,36	10,79 ± 0,64	Не менее 4 No less 4
	Жирное масло Fatty oil	32,76 ± 1,64	29,17 ± 1,46	Не менее 15 No less 15

Также с целью получения очищенного сухого экстракта был рассмотрен способ очистки извлечения перед сушкой.

Согласно литературным данным, силимарин извлекается спиртом этиловым высокой концентрации [15]. В связи с этим была изучена степень извлечения суммы флаволигнанов в пересчете на силибин такими экстрагентами, как спирт этиловый 96%-й, спирт этиловый 80%-й и спирт этиловый 70%-й. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты количественного определения суммы флаволигнанов в пересчете на силибин в спиртоводных извлечениях после экстракции спиртом этиловым различной концентрации

Table 2. Results of quantitative determination of the amount of flavolignans in terms of silybin in alcohol-water extracts after extraction with ethanol of various concentrations

Концентрация спирта этилового, % Concentration of ethanol, %	96	80	70
Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин, % Quantitative content of flavolignans in terms of silybin, %	5,47 ± 0,28	6,64 ± 0,35	3,83 ± 0,19

Из представленных результатов видно, что наиболее полное извлечение биологически активных веществ достигается спиртом этиловым 80%-м.

Для сравнительного исследования были выбраны следующие методы экстрагирования с учетом особенностей состава ЛРС:

- мацерация с обратным холодильником на кипящей водяной бане;
- мацерация с обратным холодильником на кипящей водяной бане с применением двухфазной системы экстрагентов (ДСЭ);
- ультразвуковая экстракция;
- ультразвуковая экстракция с применением ДСЭ.

Так как лекарственное растительное сырье содержит около 30 % жирного масла, помимо классических методов экстракции с одним экстрагентом были исследованы способы экстракции с применением двухфазной системы экстрагентов, где в качестве неполярного вещества был выбран гексан. Описание методов представлено ниже.

1. Ультразвуковая экстракция с применением ДСЭ (спирт этиловый 80%-й – гексан). Сырье измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом и прибавляли 30 мл спирта 80%-го. Настаивали в течение 30 минут, после чего добавляли 30 мл гексана. Колбу с содержимым устанавливали в ультразвуковую ванну (ванна ультразвуковая ПСБ-1335-05, 35 кВт), нагретую до температуры 90–100 °С, и вели экстракцию в течение 10 минут. Затем извлечение охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр (фильтр обеззоленный «Белая

лента» d 110 мм, ООО «Мелиор», Россия). Во время экстракции наблюдалось эмульгирование при смешении экстрагентов, что в дальнейшем усложнило процесс фильтрации и разделения фаз.

Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин составило (4,26 ± 0,23) %.

2. Ультразвуковая экстракция. Сырье измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом и прибавляли 30 мл спирта 80%-го. Настаивали в течение 30 минут. Колбу с содержимым устанавливали в ультразвуковую ванну, нагретую до температуры 90–100 °С, и вели экстракцию в течение 15 минут. Затем содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр (фильтр обеззоленный «Белая лента» d 110 мм, ООО «Мелиор», Россия).

Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин составило (3,92 ± 0,21) %. На основании анализа результатов можно сделать вывод о том, что применение ультразвука без кипения экстрагента не увеличивает эффективность экстракции.

3. Мацерация с обратным холодильником на кипящей водяной бане с применением ДСЭ (спирт этиловый 80%-й – гексан, 1:1). Сырье измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом и прибавляли 30 мл спирта 80%-го. Настаивали в течение 30 минут, после чего добавляли 30 мл гексана. Колбу с содержимым присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр (фильтр обеззоленный «Белая лента» d 110 мм, ООО «Мелиор», Россия). Эмульгирования экстрагентов не наблюдалось.

Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин в спиртоводной фазе составило (4,78 ± 0,26) %.

4. Мацерация с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Точную навеску сырья измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 3,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом и прибавляли 150 мл спирта 80%-го. Настаивали в течение 30 минут. Колбу с содержимым присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 30 мин. Затем содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр (фильтр обеззоленный «Белая лента» d 110 мм, ООО «Мелиор», Россия).

Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин составило $(4,97 \pm 0,27)$ %.

На основании анализа вышеизложенных результатов установлено, что больший выход по БАВ достигается при мацерации с обратным холодильником на кипящей водяной бане с применением ДСЭ (спирт этиловый 80%-й – гексан, 1:1) и мацерации с обратным холодильником на кипящей водяной бане.

Расторопши пятнистой плоды содержат также около 20 % водорастворимых белков, которые могут перейти в спиртоводное извлечение при экстрагировании спиртом этиловым 80%-м. Для очистки от водорастворимых балластных веществ полученное извлечение необходимо отстаивать при пониженной температуре (не более 8 °С) около 2 суток и после их осаждения профильтровать через бумажный фильтр.

Плоды расторопши содержат жирное масло в значительных количествах, поэтому для очистки получаемых извлечений стало необходимым добавить стадию очистки гексаном методом жидкостной экстракции в соотношении 1:1 (спиртоводное извлечение:гексан). Очищенное извлечение подвергали высушиванию.

Полученные сухие экстракты взвешивали и определяли содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин. Результаты представлены в таблице 3.

Таким образом, из всех исследованных методов экстракции расторопши пятнистой плодов самым эффективным с точки зрения выхода по сухому экстракту и его качеству является мацерация с обратным холодильником на кипящей водяной бане с последующей очисткой сначала отстаиванием при пониженной температуре, а далее гексаном методом жидкостной экстракции.

На основании анализа литературных данных для сравнения были выбраны следующие соотношения «сырье:экстрагент»: 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 и 1:50. Экстракцию и количественное определение суммы флаволигнанов в пересчете на силибин в спиртовод-

ных извлечениях проводили согласно методу, описанному ранее. Результаты представлены в виде диаграммы на рисунке 1.



Рисунок 1. Содержание БАВ в извлечении в зависимости от модуля экстракции

Figure 1. BAS content in extraction depending on the extraction module

Основываясь на результатах, можно сделать вывод о том, что при модуле экстракции 1:30, 1:40 и 1:50 увеличение выхода БАВ статистически незначимо, поэтому для дальнейших исследований выбран модуль экстракции 1:30.

Также была исследована зависимость степени извлечения БАВ от времени экстрагирования. Результаты представлены на рисунке 2.

На основании анализа содержания БАВ в извлечении в зависимости от времени экстракции можно

Таблица 3. Результаты определения массы сухого экстракта и количественного определения суммы флаволигнанов в пересчете на силибин

Table 3. Results of determination of dry extract weight and quantitative determination of the amount of flavolignans in terms of silybin

Метод экстракции Extraction method	Мацерация с обратным холодильником на кипящей водяной бане с применением ДСЭ (спирт этиловый 80%-й – гексан) Maceration with a reverse refrigerator in a boiling water bath using two-phase solvent system (ethanol 80 % – hexane)	Мацерация с обратным холодильником на кипящей водяной бане с последующей очисткой гексаном методом жидкостной экстракции Maceration with a reverse refrigerator in a boiling water bath followed by hexane purification by liquid extraction
Масса полученного сухого экстракта, г The mass of the resulting dry extract, g	$0,17 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$
Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин, % The content of the sum of flavolignans in terms of silybin, %	$67,17 \pm 3,63$	$71,24 \pm 3,85$

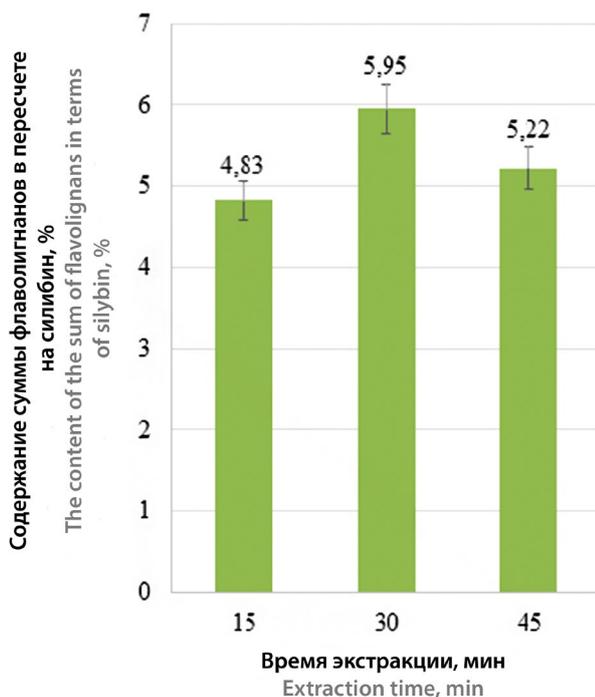


Рисунок 2. Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибин в зависимости от длительности экстракции

Figure 2. The content of the sum of flavolignans in terms of silybin, depending on the duration of extraction

сделать вывод, что в течение 30 минут содержание суммы флаволигнанов в извлечении в пересчете на силибин и абсолютно сухое сырье достигает 5,95 %, а затем уменьшается.

По вышеизложенной методике был получен сухой экстракт плодов расторопши пятнистой и определены показатели качества согласно ГФ РФ XIV [14]. Результаты испытаний приведены в таблицах 4 и 5.

При оценке содержания остаточных органических растворителей изучали содержание гексана, как растворителя 2 класса токсичности, используемого в технологии получения сухого экстракта. Содержание гексана в независимых трех пробах сухого экстракта составило $(1,3 \pm 0,1)$ ppm.

Хроматограммы стандартного и испытуемого растворов представлены на рисунках 3, 4. Содержание гексана не превышает предельно заявленного (не более 290 ppm), что говорит о соблюдении технологии очистки сухого экстракта.

Результаты исследования гигроскопичности сухого экстракта расторопши пятнистой плодов представлен в таблице 6. Для определения гигроскопичности сухого экстракта расторопши пятнистой использовали раствор магния хлорида (относительная влажность 40 %), раствор натрия хлорида (относительная влажность 70 %), воду (относительная влажность 100 %).

Таким образом, увеличение массы в среднем находится в пределах от 2 до 15 %, что говорит о гигроскопичности сухого экстракта расторопши пятнистой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для разработки оригинального комбинированного гепатопротекторного средства, содержащего в составе экстракт расторопши пятнистой, проведена разработка технологии получения данной фитосубстанции, обогащенной силибином.

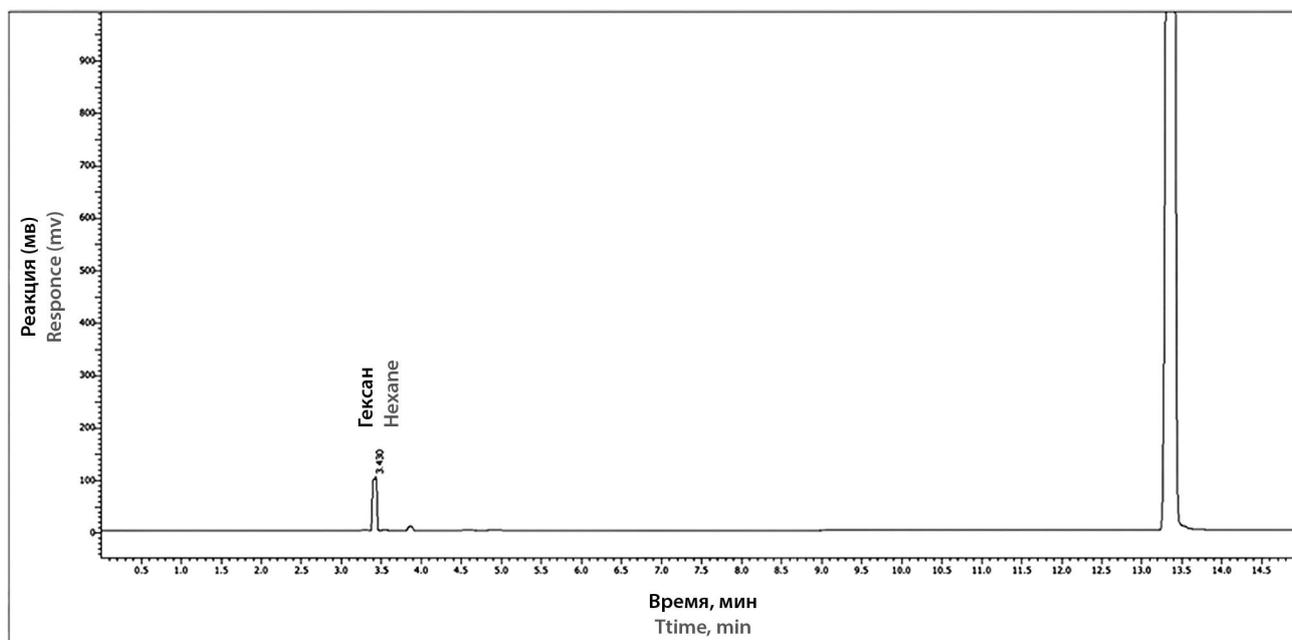


Рисунок 3. Хроматограмма стандартного раствора гексана при изучении содержания ООР

Figure 3. Chromatogram of a standard hexane solution when studying the content of ROS

Таблица 4. Показатели качества сухого экстракта расторопши пятнистой плодов
Table 4. Quality indicators of dry extract *Silybum marianum* L. of fruits

Наименование показателя The name of the indicator	Метод определения Method of determination	Норма Norm	Экспериментальные данные Results
Описание Description	ГФ РФ XIV. Визуальный SP. Visually	Аморфный порошок от серовато-желтого до светло-коричневого цвета без характерного запаха Amorphous powder from grayish-yellow to light brown in color without a characteristic odor.	
Потеря в массе при высушивании, % Weight loss on drying, %	ГФ РФ ОФС. 1.4.1.0021.15 SP GM 1.4.1.0021.15	Не более 5,0 No more 5,0	1,00 ± 0,04
Подлинность Identification	ГФ РФ XIV (ФС.2.5.0035.15) ТСХ SP XIV ed. (GM 2.5.0035.15) TLC	На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаружиться зона адсорбции с интенсивной флуоресценцией фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции РСО силимарина The chromatogram of the test solution should show an adsorption zone with intense violet fluorescence at the level of the adsorption zone of RS silymarin	На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются зоны адсорбции с интенсивной флуоресценцией фиолетового цвета на уровне зон адсорбции РСО силимарина The chromatogram of the test solution shows adsorption zones with intense violet fluorescence at the level of adsorption zones of RS silymarin
	ГФ РФ XIV (ФС.2.5.0035.15). Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях SP XIV ed. (GM 2.5.0035.15). Spectrophotometry in the UV and visible regions	УФ-спектр раствора в области длин волн от 250 до 330 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны (288 ± 3) нм. The UV spectrum of the solution in the wavelength range from 250 to 330 nm should have a maximum absorption at a wavelength of (288 ± 3) nm.	УФ-спектр раствора в области длин волн от 250 до 330 нм имеет максимум поглощения при длине волны 289 нм. The UV spectrum of the solution in the wavelength range from 250 to 330 nm has an absorption maximum at a wavelength of 289 nm.
	ГФ РФ XIV (ФС.2.5.0035.15) SP XIV ed. (GM 2.5.0035.15)	В растворе должно появляться синевато-красное окрашивание A bluish-red staining should appear in the solution	В растворе наблюдалось синевато-красное окрашивание Bluish-red staining was observed in the solution
Количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на силибин, % The content of the sum of flavonoids in terms of silybin, %	ГФ РФ XIV (ФС.2.5.0035.15). Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях SP XIV ed. (GM 2.5.0035.15). Spectrophotometry in the UV and visible regions	Не менее 65 No less 65	71,24 ± 3,85
Остаточные органические растворители, ppm Residual organic solvents, ppm	ГФ РФ XIV (ФС ОФС.1.1.0008.15) SP XIV ed. (GM ОФС.1.1.0008.15)	290	1,3

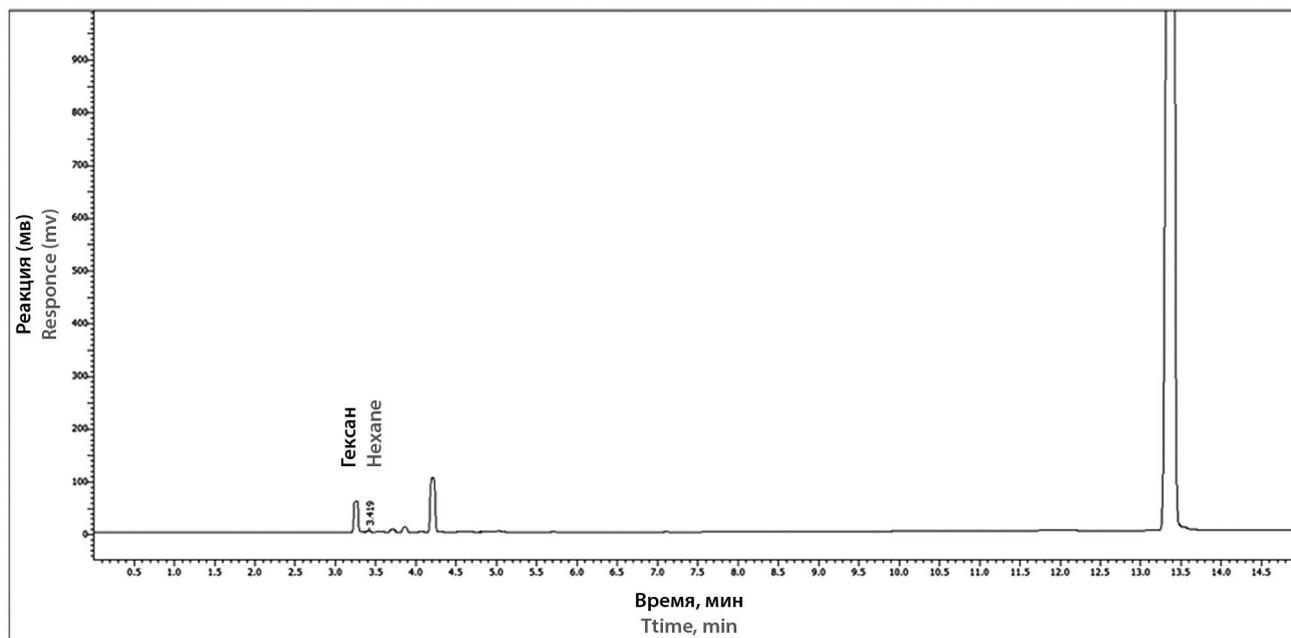


Рисунок 4. Хроматограмма исследуемого образца сухого экстракта расторопши пятнистой при изучении содержания ООР

Figure 4. Chromatogram of the test sample of dry extract of *Silybum marianum* L. fruits when studying the content of ROS

Таблица 5. Технологические свойства сухого экстракта расторопши пятнистой плодов

Table 5. Technological properties of dry extract of *Silybum marianum* L. fruits

Наименование показателя The name of the indicator	Метод определения Method of determination	Экспериментальные данные Results
Насыпная плотность, г/мл Bulk weight, g/ml	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0016.15 GM 1.4.2.0016.15	50,00 ± 2,97
Степень сыпучести, с Looseness, s	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0016.15 GM 1.4.2.0016.15	Сыпучесть отсутствует There is no flowability

Таблица 6. Изучение гигроскопичности сухого экстракта расторопши пятнистой

Table 6. Study of hygroscopicity of dry *Silybum marianum* L. extract

Увеличение массы сухого экстракта, % Increase in the mass of the dry extract, %	Относительная влажность среды, % Relative humidity of the medium, %
0,30 ± 0,02	40
1,38 ± 0,07	70
6,49 ± 0,37	100

Рассмотрены различные методы экстрагирования ЛРС, из которых выбран метод, позволяющий получить наибольший выход как по БАВ, так и по су-

хому экстракту, – мацерация с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Предложен способ очистки спиртоводного извлечения после стадии экстракции. Разработана технология сухого экстракта расторопши пятнистой плодов. Проведена стандартизация полученного сухого экстракта по показателям качества: описанию, потере в массе при высушивании, подлинности, количественному определению суммы флаволигнанов в пересчете на силибин, насыпной плотности, степени сыпучести, остаточным органическим растворителям и гигроскопичности.

ЛИТЕРАТУРА

- Wang X., Zhang Z., Wu S.C. Health Benefits of *Silybum marianum*: Phytochemistry, Pharmacology, and Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;68(42):11644–11664. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c04791.
- Ковансков В. Е., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Плиско Г. А., Копачёва Е. А., Сидоров К. О. Апробация модели жировой дистрофии печени, индуцированной оротовой кислотой. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):240–245. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-240-245.
- Бунят А. В., Спасенкова О. М., Карев В. Е., Караваева А. В., Ивкин Д. Ю., Куликов А. Н., Оковитый С. В., Кириллова Н. В. Модификация модели неалкогольной жировой болезни печени у крыс при сочетании гиперкалорийной диеты и гиподинамии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021; 10(4–1):155–165. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-155-165.
- Оковитый С. В., Райхельсон К. Л., Приходько В. А. Комбинированная гепатопротекторная фармакотерапия заболеваний печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2022;203(7):5–20. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-203-7-5-20.
- Каухова И. Е., Басевич А. В., Абросимова О. Н., Вайнштейн В. А. Лекарственные средства растительного происхождения. Технология, составы, стандартизация: монография. Спб.: Издательство Кнорус; 2019. 396 с.

- Křen V., Valentová K. Silybin and its congeners: from traditional medicine to molecular effects. *Natural Product Reports*. 2022;39(6):1264–1281. DOI: 10.1039/d2np00013j.
- Gillessen A. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Annals of Internal Medicine*. 2020; 37(1):1279–1301. DOI: 10.1007/s12325-020-01251-y.
- Aghemo A., Alekseeva O. P., Angelico F., Bakulin I. G., Bakulina N. V., Bordin D., Bueverov A. O., Drapkina O. M., Gillessen A., Kagarmanova E. M., Korochanskaya N. V., Kucheryavii U. A., Lazebnik L. B., Livzan M. A., Maev I. V., Martynov A. I., Osipenko M. F., Sas E. I., Starodubova A., Uspensky Y. P., Vinnitskaya E. V., Yakovenko E. P., Yakovlev A. A. Role of silymarin as antioxidant in clinical management of chronic liver diseases: a narrative review. *Annals of Internal Medicine*. 2022;54(1):1548–1560. DOI:10.1080/07853890.2022.2069854.
- Zhang C. Y., Liu S., Yang M. Antioxidant and anti-inflammatory agents in chronic liver diseases: Molecular mechanisms and therapy. *World Journal of Hepatology*. 2023;15(2):180–200. DOI: 10.4254/wjh.v15.i2.180.
- Gohari Mahmoudabad A., Gheybi F., Mehrabi M., Masoudi A., Mobasher Z., Vahedi H., Gharravi A. M., Bitaraf F. S., Rezayat Sorkhabadi S. M. Synthesis, characterization and hepatoprotective effect of silymarin phytosome nanoparticles on ethanol-induced hepatotoxicity in rats. *Bioimpacts*. 2023;13(4):301-311. DOI: 10.34172/bi.2023.24128.
- Torre A. Silymarin in the management of liver enzyme activity in steatohepatitis: a case report. *Drugs in Context*. 2023;12:1–5. DOI: 10.7573/dic.2023-1-5.
- Islam A., Mishra A., Siddiqui M. A., Siddiquie S. Recapitulation of Evidence of Phytochemical, Pharmacokinetic and Biomedical Application of Silybin. *Drug research (Stuttgart)*. 2021;71(9):489–503. DOI: 10.1055/a-1528-2721.
- Куркин В. А., Лебедев А. А., Авдеева Е. В., Запесочная Г. Г., Первушкин С. В., Симерзина Л. В., Булатова М. В. Способ получения экстракта расторопши пятнистой. Патент РФ на изобретение № RU 2102999. 27.01.1998. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2102999C1/ru>. Ссылка активна на 03.06.2023.
- Государственная фармакопея XIV издания. М.: Министерства здравоохранения Российской Федерации; 2018.
- Saleh I. A., Vinatoru M., Mason T. J., Abdel-Azim N. S., Aboutab E. A., Hammouda F. M. Ultrasonic-Assisted Extraction and Conventional Extraction of Silymarin from *Silybum marianum* seeds. *Research Journal of Pharmaceutical*. 2015;6(2):709–717.
- Gillessen A. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Annals of Internal Medicine*. 2020; 37(1):1279–1301. DOI: 10.1007/s12325-020-01251-y.
- Aghemo A., Alekseeva O. P., Angelico F., Bakulin I. G., Bakulina N. V., Bordin D., Bueverov A. O., Drapkina O. M., Gillessen A., Kagarmanova E. M., Korochanskaya N. V., Kucheryavii U. A., Lazebnik L. B., Livzan M. A., Maev I. V., Martynov A. I., Osipenko M. F., Sas E. I., Starodubova A., Uspensky Y. P., Vinnitskaya E. V., Yakovenko E. P., Yakovlev A. A. Role of silymarin as antioxidant in clinical management of chronic liver diseases: a narrative review. *Annals of Internal Medicine*. 2022;54(1):1548–1560. DOI:10.1080/07853890.2022.2069854.
- Zhang C. Y., Liu S., Yang M. Antioxidant and anti-inflammatory agents in chronic liver diseases: Molecular mechanisms and therapy. *World Journal of Hepatology*. 2023;15(2):180–200. DOI: 10.4254/wjh.v15.i2.180.
- Gohari Mahmoudabad A., Gheybi F., Mehrabi M., Masoudi A., Mobasher Z., Vahedi H., Gharravi A. M., Bitaraf F. S., Rezayat Sorkhabadi S. M. Synthesis, characterization and hepatoprotective effect of silymarin phytosome nanoparticles on ethanol-induced hepatotoxicity in rats. *Bioimpacts*. 2023;13(4):301-311. DOI: 10.34172/bi.2023.24128.
- Torre A. Silymarin in the management of liver enzyme activity in steatohepatitis: a case report. *Drugs in Context*. 2023;12:1–5. DOI: 10.7573/dic.2023-1-5.
- Islam A., Mishra A., Siddiqui M. A., Siddiquie S. Recapitulation of Evidence of Phytochemical, Pharmacokinetic and Biomedical Application of Silybin. *Drug research (Stuttgart)*. 2021;71(9):489–503. DOI: 10.1055/a-1528-2721.
- Kurkin V. A., Lebedev A. A., Avdeeva E. V., Zapesochnaya G. G., Pervushkin S. V., Simerzina L. V., Bulatova M. V. A method for obtaining *Silybum marianum* L. extract. Patent RUS № 2102999. 27.01.1998. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2102999C1/ru>. Accessed: 03.06.2023. (In Russ.)
- State Pharmacopoeia XIV edition. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. (In Russ.)
- Saleh I. A., Vinatoru M., Mason T. J., Abdel-Azim N. S., Aboutab E. A., Hammouda F. M. Ultrasonic-Assisted Extraction and Conventional Extraction of Silymarin from *Silybum marianum* seeds. *Research Journal of Pharmaceutical*. 2015;6(2):709–717.

REFERENCES

- Wang X., Zhang Z., Wu S. C. Health Benefits of *Silybum marianum*: Phytochemistry, Pharmacology, and Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;68(42):11644–11664. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c04791.
- Kovanskov V. V., Ivkin D. Yu., Semivelichenko E. D., Plisko G. A., Kopacheva E. A., Sidorov K. O. Approval of a model of fat liver disease induced by orotic acid. *Drug development & registration*. 2022;11(4): 240–245. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-240-245.
- Bunjat A. V., Spasenkova O. M., Karev V. E., Karavaeva A. V., Ivkin D. Yu., Kulikov A. N., Okovityi S. V., Kirillova N. V. Modification of a model of non-alcoholic fat liver disease in rats with a combination of a hypercaloric diet and hypodynamia. *Drug development & registration*. 2021;10(4-1):155–165. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-155-165.
- Okovityj S. V., Rajhel'son K. L., Prihod'ko V. A. Combined hepatoprotective pharmacotherapy of liver diseases. *Experimental & clinical gastroenterology*. 2022;203(7):5–20. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-203-7-5-20. (In Russ.)
- Kaukhova I. E., Basevich A. V., Abrosimova O. N., Vainshtain V. A. Herbal medicines. Technology, compositions, standardization: monography. Saint-Petersburg: Knorus publishing; 2019. 396 p. (In Russ.)
- Křen V., Valentová K. Silybin and its congeners: from traditional medicine to molecular effects. *Natural Product Reports*. 2022;39(6):1264–1281. DOI: 10.1039/d2np00013j.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1576>
УДК 54.061:615.038



Оригинальная статья / Research article

Скрининг противомикробной и антиоксидантной активности шляпочных грибов, произрастающих в Ленинградской области

А. К. Уэйли¹, А. О. Уэйли¹✉, В. В. Новикова², В. О. Васильев², А. В. Клемпер¹,
Р. И. Лукашов³, Н. И. Мандрик³, Н. С. Гурина³, Г. П. Яковлев¹, В. Г. Лужанин²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России). 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

³ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ). 220116, Республика Беларусь, г. Минск, пр-т Дзержинского, д. 83, лабораторный корпус № 15

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

ORCID: А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; А. О. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>;
В. В. Новикова – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; В. О. Васильев – <https://orcid.org/0009-0008-3342-0630>;
А. В. Клемпер – <https://orcid.org/0000-0003-2995-7570>; Р. И. Лукашов – <https://orcid.org/0000-0001-9547-5372>;
Н. И. Мандрик – <https://orcid.org/0009-0004-5239-5902>; Н. С. Гурина – <https://orcid.org/0009-0009-9150-5728>;
Г. П. Яковлев – <https://orcid.org/0009-0009-4570-2739>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Статья поступила: 18.09.2023

Статья принята в печать: 31.10.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Возникновение новых штаммов микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) в отношении применяемых противомикробных лекарственных препаратов, является одной из актуальных проблем современной медицины. Для предотвращения наращивания смертей, связанных с МЛУ, процесс поиска новых антибиотиков и их внедрение в медицинскую практику должны идти непрерывно. Инфекционные заболевания также сопровождаются повреждением клеток и развитием свободнорадикальных процессов окисления, соответственно, поиск новых антиоксидантов – важная задача. С учетом мощного биосинтетического потенциала базидиомицетов данная группа грибов имеет все перспективы стать новым источником биологически активных веществ в целом, а также антибиотиков и антиоксидантов в частности. Шляпочные грибы, представленные преимущественно базидиомицетами, насчитывают около 14 000 видов и являются доступным источником сырья для поиска перспективных антимикробных соединений и антиоксидантов.

Цель. Изучение антиоксидантной и противомикробной активности суммарных экстрактов, полученных из шляпочных грибов, в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* и оценка пригодности шляпочных грибов для использования в качестве природного источника веществ с противомикробной и антиоксидантной активностью.

Материалы и методы. Противогрибковую и антибактериальную активность экстрактов определяли микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных планшетах в двух повторах. Изучение данного вида биологической активности осуществляли в отношении референтных (типовых) штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653. Для исследований антиоксидантной активности с помощью DPPH использовали спиртовые извлечения из плодовых тел грибов, полученные методом мацерации 96%-м этанолом при соотношении сырья и экстрагента 1 к 8 в течение суток, водный раствор аскорбиновой кислоты (витамина С) и этанольный раствор тролокса.

Результаты и обсуждение. В отношении представителя грамположительной флоры *S. aureus* исследуемые экстракты шляпочных грибов проявили низкую активность, в среднем порядка 2500 или 5000 мкг/мл. В отношении представителя грамотрицательной флоры *E. coli* 8 % исследуемых экстрактов шляпочных грибов проявили среднюю активность порядка 1250 мкг/мл. Наибольшее количество экстрактов шляпочных грибов – 19 % от всех исследуемых видов проявили активность в отношении дрожжевого микромицета *C. albicans*. Наиболее высокая активность против *C. albicans* наблюдалась у экстрактов грибов *Cantharellula umbonata* с МИК 625 мкг/мл, *Cortinarius olivaceofuscus* с МИК 625 мкг/мл и *Hypomyces chrysospermus* с МИК 312 мкг/мл. В ходе скрининга антиоксидантной активности исследуемые извлечения разделили на три группы: с высокой (более 50 % ППР), средней (от 15 до 50 % ППР) и низкой (менее 15 %) антиоксидантной активностью. Было показано, что сумма фенольных соединений значимо коррелирует с уровнем антиоксидантной активности во всех трех группах, но в группах со средней и низкой антиоксидантной активностью присутствуют также другие, нефенольные группы веществ, вносящие значимый вклад в общую антиоксидантную активность.

Заключение. Шляпочные грибы представляют собой перспективный источник биологически активных веществ с противогрибковой и антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: шляпочные грибы, ВЭЖХ-скрининг, антимикробная активность, антиоксидантная активность

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

Вклад авторов. А. К. Уэйли, А. О. Уэйли выполнили экспериментальную часть по получению экстрактов шляпочных грибов и их ВЭЖХ-анализ. В. В. Новикова, В. О. Васильев провели скрининг противомикробной активности полученных экстрактов. А. В. Клемпер заготовил шляпочные грибы и определил их видовую принадлежность. Р. И. Лукашов, Н. И. Мандрик, Н. С. Гурина провели скрининг антиоксидантной активности полученных экстрактов. Г. П. Яковлев, В. Г. Лужанин осуществили концептуальную проработку и руководство экспериментом. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

© Уэйли А. К., Уэйли А. О., Новикова В. В., Васильев В. О., Клемпер А. В., Лукашов Р. И., Мандрик Н. И., Гурина Н. С., Яковлев Г. П., Лужанин В. Г., 2023

© Whaley A. K., Whaley A. O., Novikova V. V., Vasiliev V. O., Klemper A. V., Lukashov R. I., Mandrik N. I., Gurina N. S., Yakovlev G. P., Luzhanin V. G., 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., Уэйли А. О., Новикова В. В., Васильев В. О., Клемпер А. В., Лукашов Р. И., Мандрик Н. И., Гурина Н. С., Яковлев Г. П., Лужанин В. Г. Скрининг противомикробной и антиоксидантной активности шляпочных грибов, произрастающих в Ленинградской области. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(4):111–125. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1576>

Antimicrobial and Antioxidant Activity Screening of Mushrooms Growing in the Leningrad Region

Andrei K. Whaley¹, Anastasiia O. Whaley¹✉, Valentina V. Novikova², Vitaly O. Vasiliev², Alexey V. Klemper¹, Raman I. Lukashov³, Natalia I. Mandrik³, Natalia S. Gurina³, Gennadi P. Yakovlev¹, Vladimir G. Luzhanin²

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2, Poleyaya str., Perm, 614990, Russia

³ Belarusian State Medical University. Laboratory building No. 15 83, Dzerzhinsky avenue, Minsk, 220116, Republic of Belarus

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

ORCID: Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Anastasiia O. Whaley – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Valentina V. Novikova – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; Vitaly O. Vasiliev – <https://orcid.org/0009-0008-3342-0630>; Alexey V. Klemper – <https://orcid.org/0000-0003-2995-7570>; Raman I. Lukashov – <https://orcid.org/0000-0001-9547-5372>; Natalia I. Mandrik – <https://orcid.org/0009-0004-5239-5902>; Natalia S. Gurina – <https://orcid.org/0009-0009-9150-5728>; Gennadi P. Yakovlev – <https://orcid.org/0009-0009-4570-2739>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>.

Received: 18.09.2023

Revised: 31.10.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. The emergence of new strains of microorganisms that are multidrug resistant (MDR) in relation to the antimicrobial drugs used is one of the pressing problems of modern medicine. To prevent an increase in MDR-related deaths, the search for new antibiotics and their introduction into medical practice must be continuously ongoing. Infectious diseases are also accompanied by cell damage and the development of free radical oxidation processes, therefore the search for new antioxidants is also an important task. Considering the powerful biosynthetic potential of basidiomycetes, this group of fungi has every prospect of becoming a new source of biologically active substances in general, as well as antibiotics and antioxidants in particular. Cap mushrooms, represented mainly by basidiomycetes, number about 14,000 species and are an accessible source of raw materials for the search for promising antimicrobial compounds and antioxidants.

Aim. Study of the antioxidant and antimicrobial activity of total extracts obtained from cap mushrooms against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and assessment of the suitability of cap mushrooms as a natural source of substances with antimicrobial and antioxidant activity.

Materials and methods. The antifungal and antibacterial activity of the extracts was determined by the micromethod of two-fold serial dilutions in a liquid nutrient medium in 96-well plates in duplicate. The study of this type of biological activity was carried out against reference (type) strains *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653. To study antioxidant activity using DPPH, we used alcoholic extracts from the fruiting bodies of mushrooms obtained by maceration with 96 % ethanol at a ratio of raw materials to extractant of 1 to 8 for 24 hours, an aqueous solution of ascorbic acid (vitamin C) and an ethanol solution of Trolox.

Result and discussion. In relation to *S. aureus*, a representative of gram-positive flora, the studied extracts of cap mushrooms showed low activity, on average about 2500 or 5000 µg/ml. In relation to *E. coli*, a representative of gram-negative flora, 8 % of the studied cap mushroom extracts showed an average activity of about 1250 µg/ml. The largest number of cap mushroom extracts – 19% of all studied species – showed activity against the yeast micromycete *C. albicans*. The highest activity against *C. albicans* was observed in extracts of the mushrooms *Cantharellula umbonata* with an MIC of 625 µg/ml, *Cortinarius olivaceofuscus* with an MIC of 625 µg/ml, and *Hypomyces chrysospermus* with an MIC of 312 µg/ml. During screening of antioxidant activity, the studied extracts were divided into three groups: with high (more than 50 % PPR), medium (from 15 to 50 % PPR) and low (less than 15 %) antioxidant activity. It was shown that the sum of phenolic compounds significantly correlates with the level of antioxidant activity in all three groups, but in the groups with medium and low antioxidant activity there are also other non-phenolic groups of compounds that make a significant contribution to the total antioxidant activity.

Conclusion. Cap mushrooms are a promising source of biologically active substances with antifungal and antioxidant activity.

Keywords: cap mushrooms, HPLC screening, antimicrobial activity, antioxidant activity

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

Contribution of the authors. Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Whaley performed the experimental part of obtaining cap mushroom extracts and their HPLC analysis. Valentina V. Novikova, Vitaly O. Vasiliev screened the antimicrobial activity of the obtained extracts. Alexey V. Klemper collected the mushrooms and determined their species. Raman I. Lukashov, Natalia I. Mandrik, Natalia S. Gurina screened the antioxidant activity of the obtained extracts. Gennadi P. Yakovlev, Vladimir G. Luzhanin aided conceptual development and supervision of the experiment. All authors participated in the discussion of the results.

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

For citation: Whaley A. K., Whaley A. O., Novikova V. V., Vasiliev V. O., Klemper A. V., Lukashov R. I., Mandrik N. I., Gurina N. S., Yakovlev G. P., Luzhanin V. G. Antimicrobial and antioxidant activity screening of mushrooms growing in the Leningrad region. *Drug development & registration.* 2023;12(4):111–125. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1576>

ВВЕДЕНИЕ

Возникновение новых штаммов микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) в отношении применяемых противомикробных лекарственных препаратов, является одной из актуальных проблем современной медицины¹. Потребление антибиотиков в мире ежегодно растет, что приводит к формированию антибиотикорезистентности, которая усугубляется из-за отсутствия новых противомикробных препаратов на фармацевтическом рынке и кардинальных изменений в подходе к лечению инфекционных заболеваний [1]. В настоящий момент одним из основных подходов к борьбе с МЛУ является рациональное применение противомикробных лекарственных препаратов, но данные меры способны лишь замедлить естественный эволюционный процесс возникновения новых штаммов микроорганизмов с МЛУ [2]. Единственным фундаментальным решением проблемы борьбы с МЛУ является поиск и разработка новых эффективных антибиотиков, что по своей сути представляет собой «гонку вооружений» человечества против патогенных микроорганизмов [3–5]. Для предотвращения наращивания смертей, связанных с МЛУ, процесс поиска новых антибиотиков и их внедрение в медицинскую практику должны идти непрерывно. Следует также отметить, что инфекционные заболевания сопровождаются повреждением клеток и развитием свободнорадикальных процессов окисления, чему можно препятствовать, используя антиоксиданты.

Грибы представляют собой обширную группу живых организмов. В соответствии с современными оценками, на Земле существует от 200 до 350 тысяч, а по некоторым данным – до 1,5 миллионов видов грибов, из которых на сегодняшний день описаны около 150 тысяч [6]. Грибы встречаются повсеместно и способны заселять разнообразные экологические ниши, что во многом обусловлено их способностью использовать в качестве пищевых источников любые органические субстраты [7]. Наличие мощного биосинтетического аппарата, позволяющего грибам продуцировать огромное разнообразие вторичных метаболитов для конкуренции и защиты от других грибов и бактерий, делает их перспективными объектами для поиска новых антибиотиков и антиоксидантов [8]. Вторичные метаболиты растений также представляют определенный интерес для поиска новых веществ с противомикробной активностью, особенно учитывая их низкую токсичность. Одна из основных групп вторичных метаболитов, выделяемых из растений, представлена полифенолами [9–17], которые по результатам наших предыдущих исследований показали умеренную антимикробную активность [18–21].

¹ Centers for Disease Control and Prevention Biggest Threats and Data. Antibiotic/Antimicrobial Resistance CDC. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>. Accessed: 13.09.2023.

Плесневые грибы, из которых наиболее известная и многочисленная группа представлена аскомицетами, насчитывающими более 30 000 видов, хорошо известны науке и медицине как богатые источники значимых токсинов и антибиотиков, благодаря чему они широко изучаются с целью поиска новых биологически активных соединений [22]. Не менее обширная группа грибов – базидиомицеты, состоящая из более чем 40 000 видов, намного хуже изучена в качестве источника антибиотиков и антиоксидантов. С учетом мощного биосинтетического потенциала базидиомицетов данная группа грибов имеет все перспективы стать новым источником биологически активных веществ в целом, а также антибиотиков и антиоксидантов в частности. Шляпочные грибы, представленные преимущественно базидиомицетами, насчитывают около 14 000 видов и являются доступным источником сырья для поиска перспективных антимикробных и антиоксидантных соединений [23].

Также большим преимуществом шляпочных грибов как источника активных биомолекул является их широкое распространение на территории Российской Федерации, а также возможность заготовки плодовых тел некоторых грибов в значительных количествах. Таким образом, целью настоящего исследования является изучение антиоксидантной и противомикробной активности суммарных экстрактов, полученных из шляпочных грибов, в отношении представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжевых микромицетов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все 83 вида шляпочных грибов (таблица 1) были собраны в питомнике лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (поселок Стекланный, Ленинградская область) в августе и начале сентября 2022 года. Определение видовой принадлежности проводилось исходя из морфологических и экологических характеристик каждого вида. Исследуемые извлечения из шляпочных грибов получены методом мацерации с использованием 96%-го этанола как экстрагента при комнатной температуре без перемешивания при соотношении сырья и экстрагента 1 к 8 в течение суток. Полученные экстракты в дальнейшем анализировались методом ВЭЖХ-УФ.

ВЭЖХ-УФ-хроматограммы регистрировали на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20AD (Япония), оснащенном автосамплером Shimadzu Prominence SIL-20A (Япония), термостатом колонок CTO-20AC, колонкой Supelcosil LC-18, 25 см × 4,6 мм, 5 мкм (США), и диодно-матричным детектором Shimadzu Prominence SPD-M20A (Япония). Система подвижной фазы состоит из элюента А – воды ультрачистой с добавлением 0,1%-й трифторуксусной кислоты (ТФУ) (v/v) (PanReac AppliChem, Германия) и элюента Б – ацетонитрила HPLC Far UV/Gradient Grade (J.T. Baker, США) с добавлением 0,1%-й ТФУ.

Таблица 1. Минимальная ингибирующая концентрация экстрактов шляпочных грибов в отношении *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans*

Table 1. Minimum inhibitory concentration of cap mushroom extracts against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*

№	Вид гриба Fungi species		<i>S. aureus</i> 6538P ATCC	<i>E. coli</i> 25922 ATCC	<i>C. albicans</i> 885-653 NCTC
1	<i>Macrolepiota procera</i> (Scop.) Sinnger	Зонтик пестрый Parasol mushroom	2500/2500	2500/2500	5000/5000
2	<i>Calocera viscosa</i> (Pers.) Fr.	Калоцера клейкая Yellow stagshorn	2500/2500	2500/5000	1250/1250
3	<i>Russula consobrina</i> (Fr.) Fr.	Сыроежка родственная Russula consobrina	5000/5000	1250/2500	2500/1250
4	<i>Rickenella fibula</i> (Bull.) Raithehl	Риккелла оранжевая Orange mosscap	5000/5000	2500/2500	1250/625
5	<i>Rhizopogon roseolus</i> (Corda.) Th. Fr.	Ризопогон розоватый Rhizopogon roseolus	5000/5000	2500/2500	2500/2500
6	<i>Psathyrella candolleana</i> (Fr.) Maire	Псатирелла Кандолля Pale brittlestem	>5000	>5000	>5000
7	<i>Arrhenia sphagnicola</i> (Berk.) Redhead, Lutzoni, Moncalvo & Vilgalys	Аррения сфагновая Sphagnum navel	2500/2500	5000/5000	2500/2500
8	<i>Mycena inclinata</i> (Fr.) Quél.	Мицена наклоненная Clustered bonnet	5000/5000	2500/2500	2500/2500
9	<i>Cortinarius caperatus</i> (Pers.) Fr.	Колпак кольчатый Gypsy mushroom	5000/5000	1250/1250	1250/1250
10	<i>Russula vesca</i> (Fr.)	Сыроежка съедобная Bare-toothed Russula	2500/2500	2500/2500	2500/2500
11	<i>Lepiota grangei</i> (Eyre.) Kühner	Лепиота гранжская Green Dapperling	5000/5000	2500/2500	2500/2500
12	<i>Bolbitius tibubans</i> (Bull.) Fries.	Большитиус золотистый Yellow Fieldcap	2500/2500	2500/2500	2500/2500
13	<i>Clavulina coralloides</i> (L.) J. Schröt.	Клавулина коралловидная Crested Coral	5000/5000	2500/2500	2500/2500
14	<i>Lactarius rufus</i> (Scop.) Fr.	Горькушка Rufous milkcap	5000/5000	2500/2500	1250/1250
15	<i>Cortinarius camphoratus</i> (Fr.) Fr.	Паутинник камфорный Goatcheese webcap	2500/1250	2500/2500	2500/2500
16	<i>Hydnellum aurantiacum</i> (Batsch) P. Karst.	Гиднеллум оранжевый Orange Hydnellum	1250/1250	1250/1250	1250/1250
17	<i>Xerocomus subtomentosus</i> (L.) Quél.	Моховик зеленый Suede bolete	5000/5000	2500/2500	2500/2500
18	<i>Imleria badia</i> (Fr.) Vizzini	Польский гриб Bay bolete	5000/5000	2500/2500	2500/2500
19	<i>Leccinum versipelle</i> (Fr. & Hök) Snell	Подосиновик желто-бурый Orange birch bolete	2500/2500	2500/2500	>5000
20	<i>Collybia fusipes</i> (Bull.) Gray	Коллибия веретеноногая Spindleshank mushroom	5000/5000	5000/5000	2500/2500
21	<i>Entoloma vernum</i> S. Lundell	Энтолома весенняя Pinkgill mushroom	2500/2500	1250/1250	1250/1250
22	<i>Tricholomopsis decora</i> (Fr.) Singer	Рядовка украшенная Prunes and custard mushroom	5000/5000	5000/5000	2500/2500
23	<i>Entoloma cetratum</i> (Fr.) M.M. Moser	Энтолома щитоносная Honey Pinkgill	1250/2500	2500/2500	2500/2500
24	<i>Daedalea quercina</i> (L.) Pers.	Дубовая губка Oak mazegill	2500/2500	2500/2500	2500/2500
25	<i>Schizophyllum commune</i> (Fries)	Щелелистник обыкновенный Split-gill mushroom	5000/5000	2500/2500	2500/2500
26	<i>Phellinus igniarius</i> (L.) Quél.	Трутовик ложный Willow Bracket	2500/2500	5000/2500	2500/2500
27	<i>Calocybe gambosa</i> (Fr.) Donk.	Клоцибе майская St. George's mushroom	5000/5000	5000/5000	2500/2500
28	<i>Hypholoma elongatum</i> (Pers.) Ricken	Ложноопенок длинноногий Sphagnum brownie	5000/5000	2500/2500	2500/2500
29	<i>Agaricus arvensis</i> Schaeff.	Шампиньон полевой Horse Mushroom	2500/5000	2500/2500	2500/2500
30	<i>Cortinarius armillatus</i> (Fr.) Fr.	Паутинник браслетчатый Red-banded cortinarius	5000/5000	2500/5000	5000/5000

Продолжение таблицы 1

№	Вид гриба Fungi species		<i>S. aureus</i> 6538P ATCC	<i>E. coli</i> 25922 ATCC	<i>C. albicans</i> 885-653 NCTC
31	<i>Cortinarius limonius</i> (Fr.) Fr.	Паутинник львино-желтый Sunset webcap	2500/2500	5000/5000	2500/2500
32	<i>Xerocomus chrysenteron</i> (Bull.) Šutara	Моховик трещиноватый Red cracking bolete	5000/5000	1250/2500	2500/2500
33	<i>Gymnopus peronatus</i> (Bolton) Gray	Коллибия обернутая Wood woollyfoot	5000/5000	5000/5000	2500/2500
34	<i>Galerina calyptrata</i> P.D. Orton	Галерина колпачковая Tiny bog Galerina	5000/5000	2500/2500	2500/2500
35	<i>Rickenella swartzii</i> (Fr.) Kuiper	Рикенелла Сварца Collared mosscap	2500/2500	5000/5000	2500/2500
36	<i>Marasmius wettsteinii</i> Quéł.	Негниючник нежнейший Marasmius wettsteinii	5000/5000	5000/5000	2500/2500
37	<i>Trichaptum fuscoviolaceum</i> (Ehrenb.) Ryvarden	Трихептум буро-фиолетовый Violet-toothed polypore	2500/2500	1250/1250	2500/2500
38	<i>Postia stiptica</i> (Pers.) Julich	Постия вяжущая Bitter Bracket fungus	1250/1250	2500/2500	1250/1250
39	<i>Clitopilus prunulus</i> (Scop. ex Fr. P. Kumm.)	Клитопилус сливовый The sweetbread mushroom	5000/5000	2500/2500	2500/2500
40	<i>Clitocybe gibba</i> (Pers.) P. Kumm.	Говорушка ворончатая Common Funnel	5000/5000	2500/2500	2500/2500
41	<i>Hypomyces chrysospermus</i> Tul. & C.Tul.*	Гипомицес золотистоспоровый The bolete eater	2500/2500	2500/2500	312/312
42	<i>Postia rennyi</i> (Berk. & Broome) Rajchenb.	Постия Ренни Postia Rennyi	2500/2500	5000/5000	1250/1250
43	<i>Pleurotus ostreatus</i> P. Kumm.	Вешенка обыкновенная Oyster mushroom	5000/5000	2500/2500	2500/2500
44	<i>Trametes trogii</i> Berk.	Траметес Трога Trametes trogii	2500/2500	5000/5000	1250/1250
45	<i>Cordyceps militaris</i> (L.) Fr.	Кордицепс военный Scarlet Caterpillarclub	5000/5000	5000/5000	5000/5000
46	<i>Postia caesia</i> (Schrad.) P. Karst.	Постия синеовато-серая Conifer Blueing Bracket fungus	2500/2500	1250/1250	2500/2500
47	<i>Chalciporus piperatus</i> (Bull.) Bataille	Перечный гриб Peppery bolete	5000/5000	2500/2500	2500/2500
48	<i>Russula emetica</i> (Schaeff.) Pers.	Сыроежка жгучеядкая Emetic russula	5000/5000	2500/1250	2500/2500
49	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr.	Свинушка тонкая Brown Roll-Rim	2500/2500	2500/5000	2500/2500
50	<i>Antrodiella pallescens</i> (Pilát) Niemelä & Miettinen	Антродиелла бледноватая Antrodiella pallescens	2500/2500	625/1250	>5000
51	<i>Hypocrea gelatinosa</i> (Tode) Fr.	Гипокрея желатинозная Hypocrea gelatinosa	2500/2500	2500/2500	2500/2500
52	<i>Sebacina epigaea</i> (Berk. & Broome) Bourdot & Galzin	Себацина наземная Sebacina epigaea	2500/2500	2500/2500	2500/2500
53	<i>Amanita muscaria</i> (L.) Hook.	Мухомор красный Fly amanita	5000/5000	2500/2500	2500/2500
54	<i>Cortinarius triumphans</i> Fr.	Паутинник триумфальный Birch Webcap mushroom	2500/2500	2500/2500	2500/2500
55	<i>Thelephora terrestris</i> Ehrh.	Телефора наземная Common Fiber Vase	5000/5000	2500/2500	2500/2500
56	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	Трутовик плоский Wood-decay fungus	5000/5000	5000/5000	2500/2500
57	<i>Xerocomellus porosporus</i> (Imler ex Watling) Šutara	Боровик проспоровый The Sepia Bolet	>5000	>5000	>5000
58	<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.) Gray	Грифола курчавая Hen-of-the-woods	5000/5000	5000/5000	2500/1250
59	<i>Ramaria stricta</i> (Pers.) Quéł.	Рамария жесткая Strict-branch coral	5000/5000	2500/2500	1250/1250
60	<i>Cortinarius purpureus</i> (Bull.) Bidaud, Moënné- Locc. & Reumaux	Паутинник пурпурный Imperial webcap	5000/5000	2500/2500	1250/1250

№	Вид гриба Fungi species	<i>S. aureus</i> 6538P ATCC	<i>E. coli</i> 25922 ATCC	<i>C. albicans</i> 885-653 NCTC
61	<i>Tubaria confragosa</i> (Fries) Harmaja Тубария бургристая Ringed twiglet	5000/5000	2500/2500	1250/1250
62	<i>Hericium coralloides</i> Scop.) Pers. Ежовик коралловидный Coral tooth fungus	5000/5000	>5000	2500/2500
63	<i>Tapinella panuoides</i> (Batsch) E.-J. Gilbert Тапинелла панусовидная Oyster Rollrim mushroom	2500/2500	2500/2500	5000/5000
64	<i>Rhodocollybia prolixa</i> (Fr.) Antonín & Noordel Коллибия изогнутая Toothed toughshank	5000/5000	2500/2500	2500/2500
65	<i>Ampulloclitocybe clavipes</i> (Pers.) Redhead Говорушка булавоногая Club-footed clitocybe	2500/2500	2500/2500	2500/2500
66	<i>Mycena epipterygia</i> (Scop.) Gray Мицена слизистая Yellow-stemmed mycena	2500/2500	2500/2500	2500/2500
67	<i>Melanoleuca brevipes</i> (Bull.) Pat. Меланолеука коротконожковая Stunted cavalier	>5000	>5000	5000/5000
68	<i>Cortinarius semisanguineus</i> (Fr.) Gillet Паутинник краснопластинковый Surprise webcap	2500/2500	2500/2500	2500/1250
69	<i>Chroogomphus rutilus</i> (Schaeff.) O.K. Mill. Мокруха пурпуровая The copper spike	5000/5000	5000/5000	2500/2500
70	<i>Handkea utrifomis</i> (Bull.) Pers. Головач мешковатый Handkea utrifomis	2500/2500	5000/5000	2500/2500
71	<i>Cantharellula umbonata</i> (J.F. Gmel.) Singer Лисичка горбатая The Humpback	5000/5000	5000/5000	625/625
72	<i>Suillus bovinus</i> (L.) Kuntze Козляк Jersey cow mushroom	5000/5000	2500/2500	2500/2500
73	<i>Panaeolus foenisecii</i> (Pers.) R. Maire Навозник сенный Mower's mushroom	5000/5000	2500/2500	2500/2500
74	<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm. Опенок осенний Honey fungus	5000/5000	2500/2500	2500/2500
75	<i>Cortinarius collinitus</i> (Pers.) Fr. Паутинник голубоствольный Belted slimy cortinarius	2500/2500	2500/2500	2500/2500
76	<i>Cortinarius variecolor</i> (Pers.) Fr. Паутинник разноцветный Cortinarius variecolor	2500/2500	2500/2500	2500/2500
77	<i>Gomphidius roseus</i> (Fr.) Oudem. Мокруха розовая Rosy spike-cap	2500/2500	2500/2500	2500/2500
78	<i>Albatrellus subrubescens</i> (Murrill) Pouz. Альбатреллус краснеющий Albatrellus subrubescens mushroom	2500/2500	5000/5000	>5000
79	<i>Albatrellus ovinus</i> (Schaeff. ex Fr.) Kotl. & Pouzar Трутовик овечий Sheep Polypore	2500/2500	2500/2500	2500/2500
80	<i>Phellodon tomentosus</i> (L.) Banker Феллодон войлочный Wooly tooth	5000/5000	2500/2500	2500/2500
81	<i>Hydnellum ferrugineum</i> (Fr.) P. Karst. Гиднеллум ржавчинный The mealy tooth	2500/1250	2500/1250	2500/1250
82	<i>Cortinarius olivaceofuscus</i> Kühner Паутинник оливково-бурый Cortinarius olivaceofuscus	5000/5000	2500/5000	625/625
83	<i>Gymnopilus picreus</i> (Pers.) P. Karst. Гимнопил горький Gymnopilus picreus	2500/2500	1250/1250	1250/625

Примечание. * *Hypomyces chrysospermus* – сумчатый гриб, паразитирующий на плодовых телах болетовых грибов.

Note. * *Hypomyces chrysospermus* is a sac fungus that parasitizes the fruiting bodies of boletus fungi.

Профиль элюции: 0,01–5,0 минут 5 % Б (изократический режим), 5,0–45,75 минут 5–100 % Б (линейный градиент), 45,75–50,0 минут 100 % Б (изократический режим), 50,0–60,0 минут 100–5 % Б (линейный градиент), 60,0–65,0 минут 5 % Б (изократический режим, приведение колонки в равновесие).

Ввод анализируемого образца осуществляли в объеме 10 мкл, температура колонки во время анализа составляла 40 °С, используемая скорость потока – 1 мл/мин. Запись УФ-спектра осуществляли в диапазоне от 190 нм до 800 нм при аналитической длине волны 254 и 280 нм.

Для проведения противомикробного скрининга экстракты грибов выпаривали досуха, измеряли массу сухого остатка и растворяли в необходимом объеме ДМСО. Противогрибковую и антибактериальную активность экстрактов определяли микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных планшетах¹ в двух повторах. Изучение данного вида биологической активности осуществляли в отношении референтных (типовых) штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653. Для приготовления микробной взвеси использовали суточные культуры микроорганизмов, выращенные на питательном агаре (бактерии) и агаре Сабуро (грибы). Концентрация микробных клеток в опыте составила $(2-5) \times 10^5$ КОЕ/мл [24]. Посевы инкубировали в термостате при температуре (35 ± 1) °C [25]. Оценку роста проводили визуально через 22–24 часа инкубирования. В качестве положительного контроля использовали питательную среду с внесенной исследуемой культурой. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. За значение МИК (минимальной ингибирующей концентрации) принимали наименьшую концентрацию соединения, при которой отсутствует определяемый визуально рост тест-организма.

Для исследований антиоксидантной активности использовали спиртовые извлечения из плодовых тел грибов, полученные методом мацерации 96%-м этанолом при соотношении сырья и экстрагента 1 к 8 в течение суток, водный раствор аскорбиновой кислоты (витамина С) и этанольный раствор тролокса.

В качестве препаратов сравнения использовали известный природный антиоксидант – аскорбиновую кислоту и синтетический аналог витамина Е – тролокс (Sigma-Aldrich, США). Для них изучали зависимость антиоксидантного эффекта от концентрации (рисунки 1 и 2 соответственно).

Методика оценки антиоксидантной активности. Испытуемый раствор. К 0,300 мл спиртового извлечения прибавляли 6,00 мл раствора 0,05 г/л 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) в 96%-м этаноле. Измерение оптической плотности проводили через 30 мин при длине волны 517 нм.

Также измеряли оптическую плотность раствора без антиоксидантов, приготовленного путем прибавления к 0,300 мл 96%-го этанола 6,00 мл раствора 0,05 г/л DPPH в 96-м этаноле.

Компенсационный раствор – 96%-й этанол.

¹ Centers for Disease Control and Prevention Biggest Threats and Data. Antibiotic/Antimicrobial Resistance CDC. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>. Accessed: 13.09.2023.

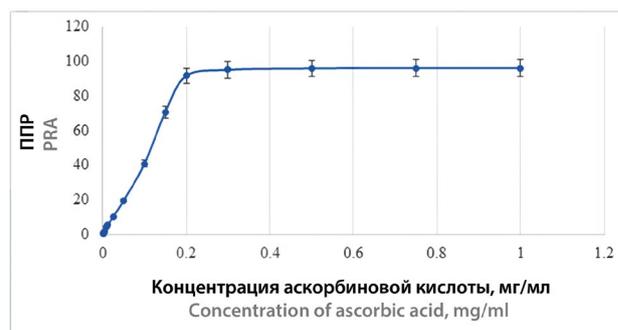


Рисунок 1. Зависимость ППР от концентрации аскорбиновой кислоты

Figure 1. Dependence of PRA on the concentration of ascorbic acid



Рисунок 2. Зависимость ППР от концентрации тролокса

Figure 2. Dependence of PRA on Trolox concentration

Процент поглощения радикалов (ППР) вычисляли по формуле:

$$\text{ППР} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \cdot 100,$$

где A_0 – оптическая плотность раствора DPPH без антиоксидантов; A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора.

Количественное определение суммы фенольных соединений проводили по следующей методике: 0,500 мл спиртового извлечения помещали в мерную колбу на 50 мл, прибавляли 0,750 мл реактива Фолина – Чокальтеу и 23,8 мл раствора 100 г/л натрия карбоната, доводили до объема 50,0 мл водой очищенной. Оптическую плотность измеряли через 30 мин при длине волны 760 нм.

Компенсационный раствор. В качестве компенсационного раствора использовали раствор, состоящий из 0,750 мл реактива Фолина – Чокальтеу и 24,3 мл раствора 100 г/л натрия карбоната, доведенного до объема 50,0 мл водой очищенной.

Концентрацию фенольных соединений определяли в пересчете на галловую кислоту методом градуировочного графика (рисунок 3).

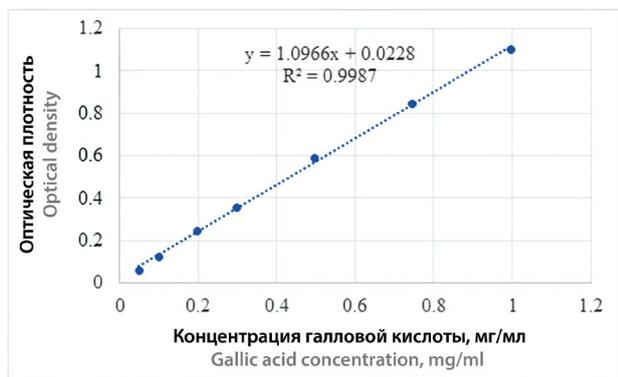


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности от концентрации галловой кислоты

Figure 3. Dependence of optical density on gallic acid concentration

Статистическую обработку результатов исследований проводили при помощи пакета «Анализ данных» компьютерной программы Microsoft Office Excel 2016. Каждое исследование выполняли в трех повторностях ($n = 3$; $P = 95\%$). Результат представляли в виде среднего значения и полуширины его доверительного интервала. Для оценки значимости различий между изучаемыми параметрами использовали t -критерий Стьюдента. Значения статистически значимо различались при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты скрининга противомикробной активности представлены в таблице 1.

В отношении представителя грамположительной флоры *S. aureus* исследуемые экстракты шляпочных грибов проявили низкую активность, в среднем

порядка 2500 или 5000 мкг/мл. Экстракты *Hydnellum aurantiacum* и *Postia stiptica* были единственными, для которых значения МИК были ниже среднего и составляли порядка 1250 мкг/мл. ВЭЖХ-анализ данных экстрактов показал значительное качественное и количественное разнообразие вторичных метаболитов у *Hydnellum aurantiacum* (рисунок 4), в то время как на ВЭЖХ-хроматограмме (рисунок 5) у *Postia stiptica* наблюдалось только качественное разнообразие вторичных метаболитов при их достаточно малом количественном содержании. Из данных наблюдений можно сделать следующие выводы:

1. *Hydnellum aurantiacum* содержит значительное количество вторичных метаболитов, проявляющих общее неселективное действие в отношении *S. aureus*.
2. *Postia stiptica* содержит в незначительном количестве метаболиты, которые обладают сравнительно выраженным действием в отношении *S. aureus*.

В отношении грамотрицательной бактерии *E. coli* наибольшую активность, помимо ранее упомянутого *Hydnellum aurantiacum*, с МИК 1250 мкг/мл проявили экстракты *Rozites caperata*, *Entoloma vernum*, *Trichaptum fuscoviolaceum*, *Gymnopilus picreus*, *Postia caesia* и *Antrodiella pallescens*. Анализ большинства ВЭЖХ-хроматограмм экстрактов в данной группе шляпочных грибов, за исключением *Gymnopilus picreus* (рисунок 6), показал заметное отсутствие содержания вторичных метаболитов в каком-либо значимом качественном и количественном отношении. На хроматограммах экстрактов *Entoloma vernum* (рисунок 7) и *Antrodiella pallescens* (рисунок 8) в осязательных количествах наблюдался только пик эргостерола. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что установленная активность по отношению к *E. coli*, вероятнее всего, в большинстве случаев обусловлена присутствием соединений алифатической природы, которые диодно-матричный детектор хроматографа не способен обнаруживать.

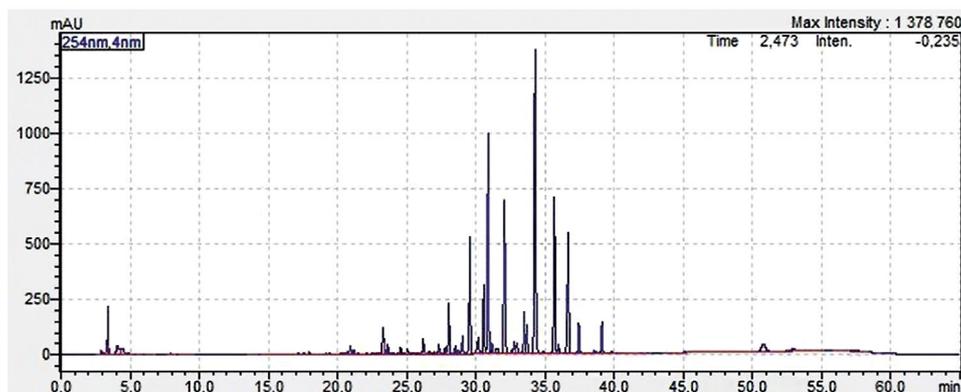


Рисунок 4. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта *Hydnellum aurantiacum*

Figure 4. HPLC chromatogram of *Hydnellum aurantiacum* extract



Рисунок 5. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта *Postia stiptica*

Figure 5. HPLC chromatogram of *Postia stiptica* extract



Рисунок 6. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта *Gymnopilus picreus*

Figure 6. HPLC chromatogram of *Gymnopilus picreus* extract



Рисунок 7. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта *Entoloma vernum*

Figure 7. HPLC chromatogram of *Entoloma vernum* extract

Наибольшее количество экстрактов шляпочных грибов проявили активность в отношении дрожжевого микромицета *S. albicans*. Значения МИК порядка 1250 мкг/мл и ниже, помимо ранее упомянутых *Hydnum aurantiacum*, *Postia stiptica*, *Rozites caperata*,

Gymnopilus picreus и *Entoloma vernum*, проявили экстракты *Calocera viscosa*, *Rickenella fibula*, *Lactarius rufus*, *Hypomyces chrysospermus*, *Postia rennyi*, *Trametes trogii*, *Ramaria stricta*, *Cortinarius purpureus*, *Tubaria confragosa*, *Cantharellula umbonata* и *Cortinarius oli-*



Рисунок 8. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта *Antrodiella pallescens*

Figure 8. HPLC chromatogram of *Antrodiella pallescens* extract

vaseofuscus. Наиболее высокая активность против *C. albicans* наблюдалась у экстрактов грибов *Cantharellula umbonata* (рисунок 9) с МИК 625 мкг/мл, *Cortinarius olivafuscus* (рисунок 10) с МИК 625 мкг/мл и *Hypomyces chrysospermus* с МИК 312 мкг/мл (рисунок 11). В целом неудивительно, что наибольшее

количество экстрактов шляпочных грибов показали активность преимущественно в отношении наиболее родственного микромицета *C. albicans* из царства грибов, а не бактерий *S. aureus* и *E. coli*. Самая выраженная активность против *C. albicans* наблюдалась у *Hypomyces chrysospermus* – единствен-



Рисунок 9. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта *Cantharellula umbonata*

Figure 9. HPLC chromatogram of *Cantharellula umbonata* extract

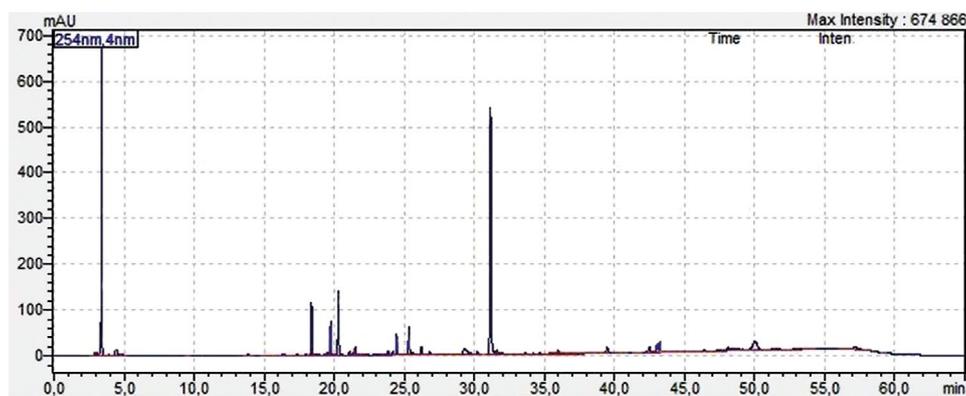


Рисунок 10. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта *Cortinarius olivafuscus*

Figure 10. HPLC chromatogram of *Cortinarius olivaceofuscus* extract

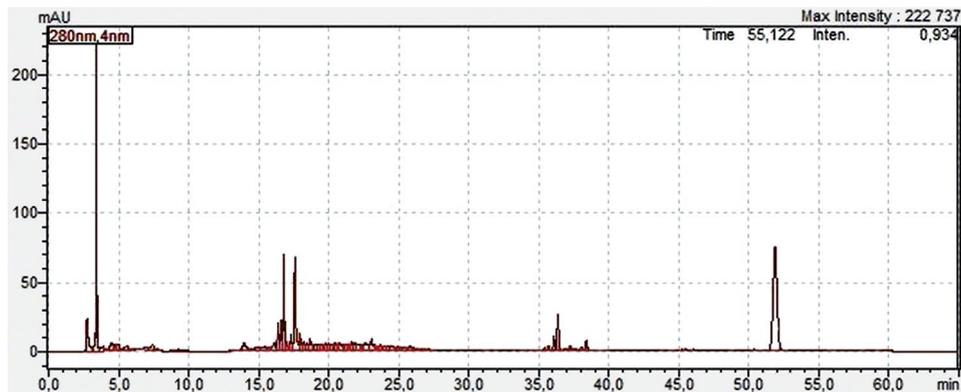


Рисунок 11. ВЭЖХ-хроматограмма экстракта *Hypomyces chrysospermus*

Figure 11. HPLC chromatogram of *Hypomyces chrysospermus* extract

ного аскомицета в данном исследовании, паразитирующего на плодовых телах болетовых грибов. *Hypomyces chrysospermus* известен своим содержанием пептайболов – линейных пептидных антибиотиков, содержащих от 7 до 20 аминокислотных остатков, показавших выборочную активность в отношении некоторых дрожжей, мицелиальных грибов и бактерий [26].

В ходе скрининга антиоксидантной активности исследуемые извлечения разделили на три группы: с высокой (более 50 % ППР), средней (от 15 до 50 % ППР) и низкой (менее 15 %) антиоксидантной активностью. Также определяли сумму фенольных соединений при отнесении к определенному уровню антиоксидантной активности с целью выявления взаимосвязи между этими параметрами.

Выявлено, что высокой антиоксидантной активностью (более 50 % ППР) обладают извлечения из плодовых тел *Paxillus involutus* ($65,6 \pm 1,16\%$, что соответствует $0,14$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,2$ мг/мл тролокса), *Agaricus arvensis* ($56,9 \pm 2,22\%$, что соответствует $0,13$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,17$ мг/мл тролокса), *Xerocomus subtomentosus* ($52,9 \pm 2,03\%$, что соответствует $0,12$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,16$ мг/мл тролокса), *Hydnellum aurantiacum* ($73,2 \pm 0,72\%$, что соответствует $0,16$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,23$ мг/мл тролокса), *Ganoderma applanatum* ($76,0 \pm 0,85\%$, что соответствует $0,16$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,24$ мг/мл тролокса), *Cortinarius limonium* ($64,8 \pm 2,82\%$, что соответствует $0,14$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,2$ мг/мл тролокса), *Hydnellum ferrugineum* ($76,9 \pm 0,49\%$, что соответствует $0,16$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,24$ мг/мл тролокса), *Phellinus igniarius* ($58,9 \pm 1,43\%$, что соответствует $0,13$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,18$ мг/мл тролокса) и *Xerocomus porosporus* ($76,0 \pm 0,34\%$, что соответствует $0,13$ мг/мл аскорбиновой кислоты и $0,18$ мг/мл тролокса) (рисунок 12).

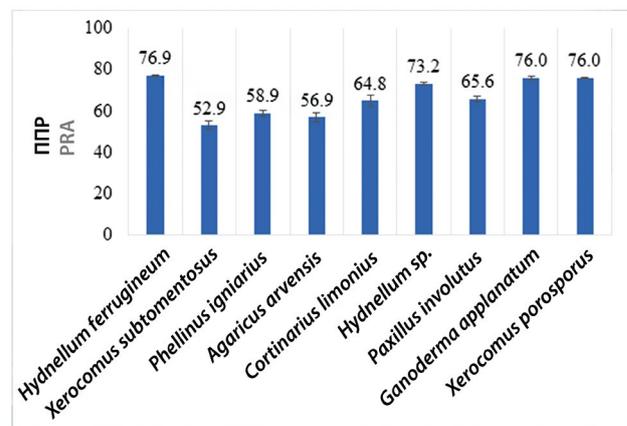


Рисунок 12. ППР извлечениями из плодовых тел с высоким уровнем антиоксидантной активности

Figure 12. PRA of extracts from fruiting bodies with high levels of antioxidant activity

Высокий уровень антиоксидантной активности может быть связан с высоким содержанием фенольных соединений в изученных плодовых телах грибов *Paxillus involutus* ($727,9 \pm 8,06$ мкг/мл), *Agaricus arvensis* ($163,2 \pm 6,28$ мкг/мл), *Xerocomus subtomentosus* ($160,3 \pm 3,74$ мкг/мл), *Hydnellum sp.* ($463,4 \pm 26,6$ мкг/мл), *Ganoderma applanatum* ($860,5 \pm 4,68$ мкг/мл), *Cortinarius limonium* ($213,4 \pm 6,04$ мкг/мл), *Hydnellum ferrugineum* ($416,2 \pm 7,39$ мкг/мл), *Phellinus igniarius* ($159,6 \pm 6,30$ мкг/мл) и *Xerocomus porosporus* ($251,6 \pm 14,2$ мкг/мл) (рисунок 13).

При этом выявлено, что ППР извлечениями из плодовых тел с высоким уровнем антиоксидантной активности значимо связан с содержанием фенольных соединений ($p = 0,0025$; $F_{\text{крит.}} = 4,49$; $F = 12,8$), однако только ими не обусловлен ($r = 0,5730$).

Средний уровень антиоксидантной активности (от 15 до 50 %) характерен для извлечений из *Xerocomus chrysenteron* ($46,3 \pm 2,00\%$), *Agaricus sp.* ($22,0 \pm$

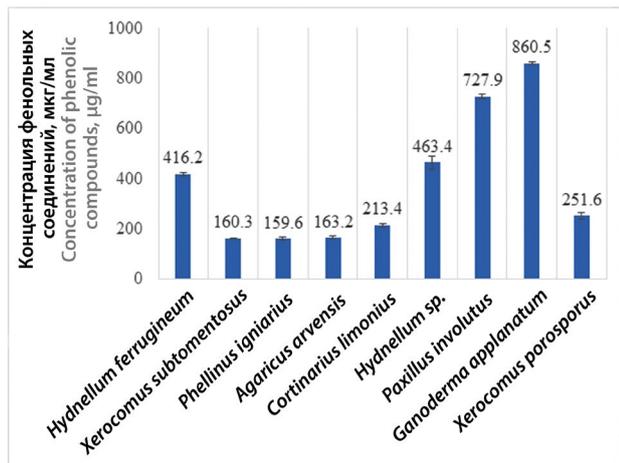


Рисунок 13. Концентрация фенольных соединений в извлечениях из плодовых тел с высоким уровнем антиоксидантной активности

Figure 13. Concentration of phenolic compounds in extracts from fruiting bodies with high levels of antioxidant activity

0,32 %), *Daedalea quercina* ($20,8 \pm 0,83$ %), *Xerocomus badius* ($32,8 \pm 2,74$ %), *Thelephora terrestris* ($15,3 \pm 1,66$ %), *Suillus luteus* ($33,1 \pm 1,23$ %), *Collybia peronata* ($46,4 \pm 1,00$ %), *Cortinarius* sp. ($46,0 \pm 0,77$ %), *Agaricus* sp. ($33,7 \pm 2,15$ %), *Hypomyces* на *Xerocomus* ($19,9 \pm 0,96$ %) (рисунок 14).

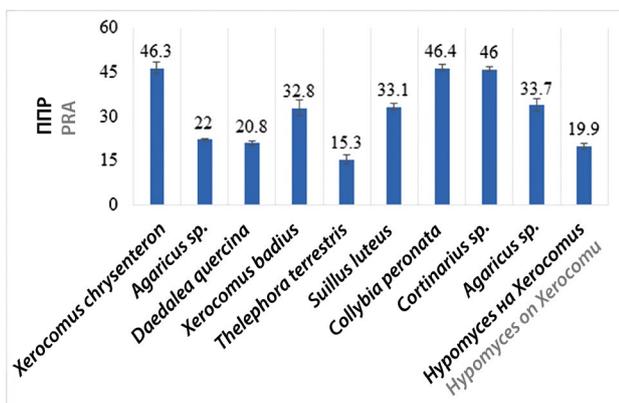


Рисунок 14. ППР извлечениями из плодовых тел со средним уровнем антиоксидантной активности

Figure 14. PRA of extracts from fruiting bodies with an average level of antioxidant activity

Извлечения со средним уровнем антиоксидантной активности содержали в целом меньше фенольных соединений: *Xerocomus chrysenteron* ($210,4 \pm 2,51$ мкг/мл), *Agaricus* sp. ($102,9 \pm 2,96$ мкг/мл), *Daedalea quercina* ($118,4 \pm 5,04$ мкг/мл), *Xerocomus badius* ($74,2 \pm 5,56$ мкг/мл), *Thelephora terrestris* ($17,1 \pm 3,14$ мкг/мл), *Suillus luteus* ($59,5 \pm 3,34$ мкг/мл), *Collybia peronata* ($216,7 \pm 2,97$ мкг/мл), *Cortinarius* sp.

($205,2 \pm 3,96$ мкг/мл), *Agaricus* sp. ($196,9 \pm 10,4$ мкг/мл), *Hypomyces* на *Xerocomus* ($206,7 \pm 2,65$ мкг/мл) (рисунок 15).

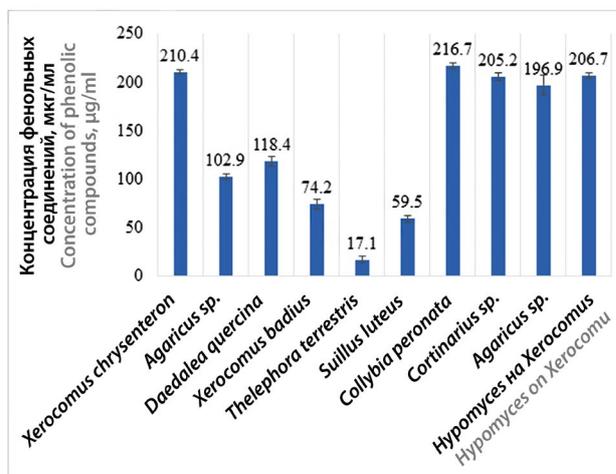


Рисунок 15. Концентрация фенольных соединений в извлечениях из плодовых тел со средним уровнем антиоксидантной активности

Figure 15. Concentration of phenolic compounds in extracts from fruiting bodies with an average level of antioxidant activity

При этом выявлено, что ППР извлечениями из плодовых тел со средним уровнем антиоксидантной активности значимо связан с содержанием фенольных соединений ($p = 0,00025$; $F_{крит.} = 4,41$; $F = 20,7$), однако только ими не обусловлен ($r = 0,56062$).

Установлен ряд извлечений с низкой антиоксидантной активностью (менее 15 %): *Amanita muscaria* ($4,71 \pm 1,84$ %), *Lactarius* sp. ($13,1 \pm 0,91$ %), *Cortinarius armillatus* ($0,44 \pm 0,91$ %), *Cortinarius triumphans* ($6,77 \pm 1,74$ %), *Cortinarius camphoratus* ($-1,45 \pm 0,63$ %), *Leccinum versipelle* ($7,41 \pm 0,63$ %), *Collybia fusipes* ($6,22 \pm 1,08$ %), *Postia rennyi* ($14,7 \pm 0,24$ %), *Postia caesia* ($13,4 \pm 0,94$ %), *Pleurotus ostreatus* ($9,40 \pm 1,00$ %), *Clitocybe gibba* ($9,17 \pm 1,13$ %), *Sebacina epigaea* ($13,9 \pm 0,76$ %), *Entoloma cetratum* ($4,37 \pm 0,85$ %), *Clitopilus prunulus* ($4,77 \pm 1,69$ %), *Entoloma vernum* ($8,95 \pm 3,15$ %), *Tricholomopsis decora* ($5,14 \pm 0,84$ %) (рисунок 16).

Для этих извлечений характерно сниженное содержание фенольных соединений: *Amanita muscaria* ($55,7 \pm 3,52$ мкг/мл), *Lactarius* sp. ($88,5 \pm 2,96$ мкг/мл), *Cortinarius armillatus* ($39,2 \pm 1,93$ мкг/мл), *Cortinarius triumphans* ($126,0 \pm 4,10$ мкг/мл), *Cortinarius camphoratus* ($69,0 \pm 2,97$ мкг/мл), *Leccinum versipelle* ($120,6 \pm 9,05$ мкг/мл), *Collybia fusipes* ($18,1 \pm 6,78$ мкг/мл), *Postia rennyi* ($35,1 \pm 1,12$ мкг/мл), *Postia caesia* ($72,1 \pm 1,82$ мкг/мл), *Pleurotus ostreatus* ($55,7 \pm 6,17$ мкг/мл), *Clitocybe gibba* ($55,6 \pm 0,82$ мкг/мл), *Sebacina epigaea* ($20,7 \pm 1,93$ мкг/мл), *Entoloma cetratum* ($28,6 \pm 6,03$ мкг/мл), *Clitopilus prunulus* ($78,6 \pm 4,08$ мкг/мл), *Entoloma vernum* ($31,7 \pm 2,08$ мкг/мл), *Tricholomopsis decora* ($6,75 \pm 1,38$ мкг/мл) (рисунок 17). Концентрация фенольных соединений для данных экстрактов

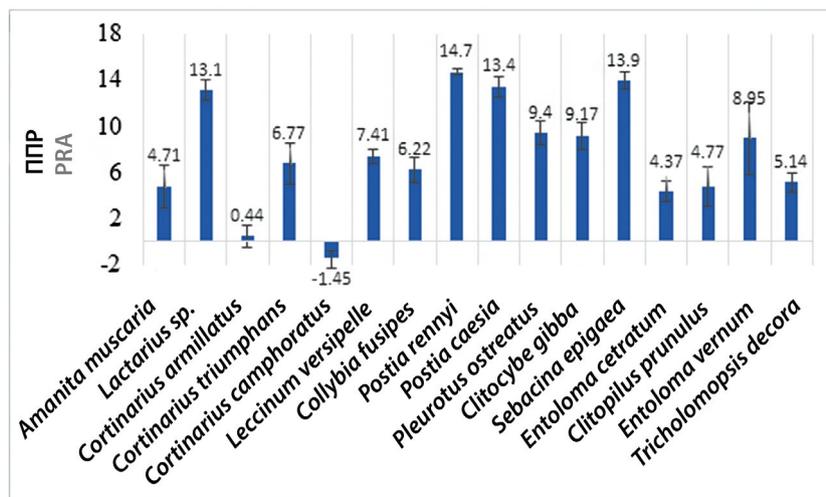


Рисунок 16. ППР извлечениями из плодовых тел с низким уровнем антиоксидантной активности
Figure 16. PRA with extracts from fruiting bodies with low levels of antioxidant activity

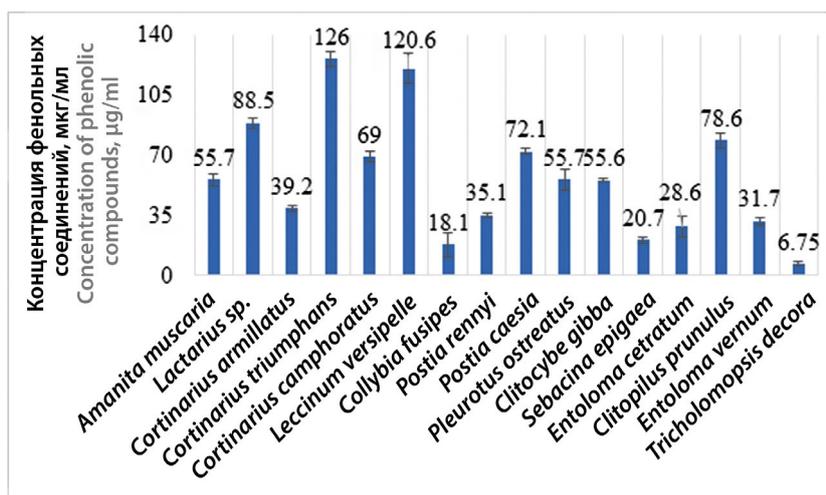


Рисунок 17. Концентрация фенольных соединений в извлечениях из плодовых тел с низким уровнем антиоксидантной активности
Figure 17. Concentration of phenolic compounds in extracts from fruiting bodies with low levels of antioxidant activity

имела высокую степень разброса значений вокруг среднего.

При этом выявлено, что ППР извлечениями из плодовых тел с низким уровнем антиоксидантной активности значимо связан с содержанием фенольных соединений ($p = 4,9 \cdot 10^{-6}$; $F_{крит.} = 4,17$; $F = 30,8$), однако их содержанием не обусловлен ($r = -0,0005$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование антимикробной активности экстрактов, полученных из 83 видов шляпочных грибов, произрастающих в Ленинградской области. В отношении представителя грамположительной флоры *S. aureus*, за исключением двух видов, зна-

чения МИК варьировались от 2500 до 5000 мкг/мл. По отношению к представителю грамотрицательной флоры *E. coli* наблюдалась активность на уровне 1250 мкг/мл для восьми видов. Против дрожжевого микроорганизма *C. albicans* наблюдалась наибольшая активность для семнадцати видов – от 1250 до 312 мкг/мл. Также были выявлены грибные извлечения с высоким, средним и низким уровнем антиоксидантной активности. Показано, что антиоксидантная активность извлечений из плодовых тел грибов связана с содержанием фенольных соединений, однако обусловлена не только их содержанием, а, предположительно, другими группами биологически активных веществ. Исходя из полученных данных, можно

сделать вывод, что шляпочные грибы представляют собой перспективный источник биологически активных веществ с противогрибковой и антиоксидантной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Van Boeckel T. P., Gandra S., Ashok A., Caudron Q., Grenfell B. T., Levin S. A., Laxminarayan R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(8):742–750.
2. Remesh A., Gayathri A., Singh R., Retnavally K. G. The Knowledge, Attitude and the Perception of Prescribers on the Rational Use of Antibiotics and the Need for an Antibiotic Policy – A Cross Sectional Survey in a Tertiary Care Hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013;7(4):675–679.
3. Baran A., Kwiatkowska A., Potocki L. Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5777.
4. Terreni M., Taccani M., Pregolato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules*. 2021;26(9):2671.
5. Ахмедов О. Р., Шомуротов Ш. А., Тураев А. С., Сидоренко А. В. Зависимость антимикробных эффектов гуанидинсодержащих производных пектина от некоторых структурных характеристик. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):38–45.
6. Hyde K. D. The numbers of fungi. *Fungal Diversity*. 2022;114:1.
7. Debeljak P., Baltar F. Fungal Diversity and Community Composition across Ecosystems. *Journal of Fungi*. 2023;9:510.
8. Avalos J., Limón M. C. Fungal Secondary Metabolism. *Encyclopedia*. 2022;2:1–13.
9. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A new bibenzyl and 9,10-dihydrophenanthrene derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry letters*. 2021;42:15–17.
10. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksch P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021:1–6.
11. 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.
12. Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Серебряков Е. Б., Смирнов С. Н., Прокш П., Ионоу Н. С., Поройков В. В., Лужанин В. Г. Фитохимический анализ вторичных метаболитов полифенольной природы в листьях морозники обыкновенной (*Rubus chamaemorus* L.). *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(3):22–27.
13. Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков С. Н., 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.
14. Крипак Е. М., Понкратова А. О., Уэйли А. К., Жохова Е. В. Фитохимическое изучение травы вербейника обыкновенного (*Lysimachia vulgaris* L.): выделение и установление структуры вторичных метаболитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):170–176.
15. Стругар Й., Орлова А. А., Понкратова А. О., Уэйли А. К., Пovyдыш М. Н. Выделение индивидуальных соединений из травы сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) и установление их структуры спектроскопическими методами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):177–184.
16. Богоутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбарян С. П., Пovyдыш М. Н. Выделение формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозиды из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):14–19.

17. Лёзина А. В., Уэйли А. К., Уэйли А. О., Тернинко И. И. Индивидуальные соединения корневищ и корней родиолы четырехлепестной (*Rhodiola quadrifida*): выделение и установление структуры. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):185–193.
18. Whaley A. K., Ebrahim W., El-Neketi M., Ancheeva E. New acetylated flavone C-glycosides from *Iris lactea*. *Tetrahedron Letters*. 2017;58(22):2171–2173.
19. Гуленков А. С., Мизина П. Г., Бахрушина Е. О., Бардаков А. И., Нюдочкин А. В. Фармацевтико-технологическое исследование адсорбированного жидкого растительного экстракта антимикробного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):94–101.
20. Бомбела Т. В., Кроткова О. А., Галишевская Е. Е., Анисимова А. Г., Ягонцева Т. А., Агафонцева А. В., Новикова В. В., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Лужанин В. Г. Компонентный состав и противомикробная активность фракций из надземной части льнянки обыкновенной (*Linaria vulgaris* Mill.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):48–56
21. Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Новикова В. В., Безверхняя Е. А. Противомикробная активность соединений полифенольной природы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):65–72.
22. Demain A., Martens E. Production of valuable compounds by molds and yeasts. *The Journal of Antibiotics*. 2017;70:347–360.
23. Alves M. J., Ferreira I. C., Dias J., Teixeira V., Martins A., Pintado M. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*. 2012;78(16):1707–1718.
24. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
25. Новикова В. В., Якимова Е. В., Горбушина А. Д. Исследование новых продуктов органического синтеза на противогрибковую активность в отношении дрожжевых грибов: обоснование выбора условий испытаний. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2022;3:105–112.
26. Dornberger K., Ihn W., Ritzau M., Gräfe U., Schlegel B., Fleck W. F., Metzger J. W. Chrysospermins, new peptaibol antibiotics from *Apicreca chrysosperma* Ap101. *The Japanese Journal of Antibiotics*. 1995;48(9):977–989.

REFERENCES

1. Van Boeckel T. P., Gandra S., Ashok A., Caudron Q., Grenfell B. T., Levin S. A., Laxminarayan R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(8):742–750.
2. Remesh A., Gayathri A., Singh R., Retnavally K. G. The Knowledge, Attitude and the Perception of Prescribers on the Rational Use of Antibiotics and the Need for an Antibiotic Policy – A Cross Sectional Survey in a Tertiary Care Hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013;7(4):675–679.
3. Baran A., Kwiatkowska A., Potocki L. Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5777.
4. Terreni M., Taccani M., Pregolato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules*. 2021;26(9):2671.
5. Akhmedov O. R., Shomurotov S. A., Turaev A. S., Sidarenka A. V. Dependence of Antimicrobial Effects of Guanidine-containing Pectin Derivatives from Some Structural Characteristics. *Drug development & registration*. 2022;11(2):38–45. (In Russ.)
6. Hyde K. D. The numbers of fungi. *Fungal Diversity*. 2022;114:1.
7. Debeljak P., Baltar F. Fungal Diversity and Community Composition across Ecosystems. *Journal of Fungi*. 2023;9:510.
8. Avalos J., Limón M. C. Fungal Secondary Metabolism. *Encyclopedia*. 2022;2:1–13.
9. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A new bibenzyl and 9,10-dihydrophenanthrene derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry letters*. 2021;42:15–17.
10. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Proksch P., Luzhanin V. G. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. *Natural Products Research*. 2021:1–6.

11. 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 aerial part of the field steelhead (*Ononis arvensis* L.) and goldenrod (*Solidago canadensis* L.). *Drug development & registration*. 2021;10(1):83-89. (In Russ.)
12. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Smirnov S. N., Proksh P., Ionov N. S., Poroikov V. V., Luzhanin V. G. Phytochemical analysis of secondary metabolites of polyphenolic nature in the leaves of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Chemical-Pharmaceutical Journal*. 2021;55(3):22-27. (In Russ.)
13. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov S. N., Luzhanin V. G. Isolation and determination of the structure of three dimeric type A proanthocyanidins from the aerial part of *Empetrum nigrum* L. *Drug development & registration*. 2021;10(2):80-86. (In Russ.)
14. Kripak E. M., Ponkratova A. O., Whaley A. K., Zhokhova E. V. Phytochemical Analysis of *Lysimachia vulgaris* L. Aerial Part: Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites. *Drug development & registration*. 2022;11(4):170-176. (In Russ.)
15. Strugar Y., Orlova A. A., Ponkratova A. A., Whaley A. K., Povydysh M. N. Isolation of Individual Compounds from the Aerial Part of *Comarum palustre* L. and Their Structure Elucidation Using Spectroscopic Methods. *Drug development & registration*. 2022;11(4):177-184. (In Russ.)
16. Bogoutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharov M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullaeva D. K., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydysh M. N. Isolation of formononetin-7-O- β -D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and the assessment of its effect on induced platelet activation. *Drug development & registration*. 2021;10(4):14-19. (In Russ.)
17. Lezina A. V., Whaley A. K., Whaley A. O., Terninko I. I. Individual Compounds of *Rhodoila quadrifida* Rhizomes and Roots: Isolating and Establishing Structure. *Drug development & registration*. 2022;11(4):185-193. (In Russ.)
18. Whaley A. K., Ebrahim W., El-Neketi M., Ancheeva E. New acetylated flavone C-glycosides from *Iris lactea*. *Tetrahedron Letters*. 2017;58(22):2171-2173.
19. Gulenkov A. S., Mizina P. G., Bakhrushina E. O., Bardakov A. I., Nyudochkin A. V. Pharmaceutical-technological Study of Adsorbed Liquid Plant Extract of Antimicrobial Activity. *Drug development & registration*. 2022;11(2):94-101. (In Russ.)
20. Bombela T. V., Krotkova O. A., Galishevskaya E. E., Anisimova A. G., Yagontseva T. A., Agafontseva A. V., Novikova V. V., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Luzhanin V. G. Component Composition and Antimicrobial Activity of Fractions from the Aerial Part of Common Toadflax (*Linaria vulgaris* Mill.). *Drug development & registration*. 2022;11(4):48-56. (In Russ.)
21. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Novikova V. V., Bezverkhnaya E. A. Antimicrobial activity of compounds of polyphenolic nature. *Drug development & registration*. 2022;11(2):65-72. (In Russ.)
22. Demain A., Martens E. Production of valuable compounds by molds and yeasts. *The Journal of Antibiotics*. 2017;70:347-360.
23. Alves M. J., Ferreira I. C., Dias J., Teixeira V., Martins A., Pintado M. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*. 2012;78(16):1707-1718.
24. Mironov A. N. Guidelines for conducting preclinical drug trials. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
25. Novikova V. V., Yakimova E. V., Gorbushina A. D. Study of new organic synthesis products for antifungal activity against yeast fungi: rationale for choice of test conditions. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2022;3:105-112. (In Russ.)
26. Dornberger K., Ihn W., Ritzau M., Gräfe U., Schlegel B., Fleck W. F., Metzger J. W. Chrysoespermins, new peptaibol antibiotics from *Apiocrea chrysoesperma* Ap101. *The Japanese Journal of Antibiotics*. 1995;48(9):977-989.



Оригинальная статья / Research article

Разработка состава и технологии получения аморфной твердой дисперсной системы эбастина методом экструзии горячего расплава для увеличения скорости растворения

К. А. Гусев¹✉, А. Р. Алиев¹, Ю. Э. Генералова¹, Н. А. Аксенова^{2, 3},
Г. В. Речкалов¹, Д. Н. Маймистов¹, Г. М. Алексеева¹, Е. В. Флисюк¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

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 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семёнова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН). 119991, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

✉ Контактное лицо: Гусев Константин А. E-mail: konstantin.gusev@pharminnotech.com

ORCID: К. А. Гусев – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>; А. Р. Алиев – <https://orcid.org/0000-0003-0010-0119>;
Ю. Э. Генералова – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; Н. А. Аксенова – <https://orcid.org/0000-0003-0527-8899>;
Г. В. Речкалов – <https://orcid.org/0009-0004-0608-1611>; Д. Н. Маймистов – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>;
Г. М. Алексеева – <https://orcid.org/0009-0008-6343-0450>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 26.09.2023

Статья принята в печать: 07.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. «Эбастин», антигистаминный препарат второго поколения, выпускается в форме орально диспергируемых таблеток и таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Субстанция эбастина характеризуется высокой биодоступностью, но низкой растворимостью в воде и средах желудочно-кишечного тракта. Для решения проблемы низкой растворимости эбастина предложена технология создания твердых дисперсий на основе полимерных носителей методом экструзии горячего расплава.

Цель. Разработка состава и технологии получения экструдата для создания аморфной твердой дисперсной системы эбастина с целью ускорения процесса высвобождения и повышения биодоступности.

Материалы и методы. Эбастин микронизированный (АО «Активный Компонент», Россия); эбастин кристаллический (Arevipharma GmbH, Германия); VIVAPHARM® PVP/VA 64 (JRS Pharma GmbH & Co. KG, Германия). Экструдаты получали на двухшнековом лабораторном экструдере с сонаправленным вращением шнеков HAAKE™ miniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия). Образцы исследовали методами дифференциальной сканирующей калориметрии, синхронного термического анализа, порошковой рентгеновской дифракции и ИК-фурье-спектроскопии. Количественное содержание действующего вещества определяли методом спектрофотометрии, а содержание родственных примесей в аморфной твердой дисперсии эбастина определяли методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. Разработана технология получения аморфной твердой дисперсии эбастина методом экструзии горячего расплава, значительно улучшены фармакокинетические свойства активного вещества, оптимизирован процесс получения твердой дисперсии, содержащей 20 % эбастина, с целью уменьшения содержания количества примесей в экструдате.

Заключение. Максимальная концентрация эбастина для аморфной твердой дисперсии надлежащего качества на основе PVP/VA64 составила 20 %. Получение твердой дисперсии методом экструзии горячего расплава с содержанием эбастина в PVP/VA64 выше 30 % невозможно, так как расплав не стеклется.

Ключевые слова: орально диспергируемые таблетки, эбастин, экструзия горячего расплава, аморфная твердая дисперсия, растворимость

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

Вклад авторов. К. А. Гусев и Д. Н. Маймистов разработали план эксперимента. А. Р. Алиев, К. А. Гусев и Г. В. Речкалов реализовали получение экструдатов методом экструзии горячего расплава. Ю. Э. Генералова определяла содержание образующихся примесей в экструдате. Н. А. Аксенова проводила синхронный термический анализ. Г. М. Алексеева и А. Р. Алиев проводили ИК-спектроскопию. К. А. Гусев и Е. В. Флисюк обрабатывали полученные данные. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Авторы благодарят АО «Активный Компонент» за предоставление образцов субстанции эбастина. Для выполнения работы были использованы образцы производства JRS Pharma / Реттенмайер Рус.

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

Для цитирования: Гусев К. А., Алиев А. Р., Генералова Ю. Э., Аксенова Н. А., Речкалов Г. В., Маймистов Д. Н., Алексеева Г. М., Флисюк Е. В. Разработка состава и технологии получения аморфной твердой дисперсной системы эбастина методом экструзии горячего расплава для увеличения скорости растворения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):126–135. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1577>

Composition and Technology Development for Obtaining Amorphous Solid Dispersion of Ebastine by Hot Melt Extrusion to Increase Dissolution Rate

Konstantin A. Gusev¹✉, Andrey R. Aliev¹, Yuliya E. Generalova¹, Nadezhda A. Aksenova^{2,3}, Georgij V. Rechkalov¹, Denis N. Maimistov¹, Galina M. Alekseeva¹, Elena V. Flisyuk¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, 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 N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, RAS, 4, Kosygina str., Moscow, 19991, Russia

✉ **Corresponding author:** Konstantin A. Gusev. E-mail: konstantin.gusev@pharminnotech.com

ORCID: Konstantin A. Gusev – <https://orcid.org/0000-0003-1922-3282>; Andrey R. Aliev – <https://orcid.org/0000-0003-0010-0119>; Yuliya E. Generalova – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; Nadezhda A. Aksenova – <https://orcid.org/0000-0003-0527-8899>; Georgij V. Rechkalov – <https://orcid.org/0009-0004-0608-1611>; Denis N. Maimistov – <https://orcid.org/0000-0001-8070-1699>; Galina M. Alekseeva – <https://orcid.org/0009-0008-6343-0450>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 26.09.2023

Revised: 07.11.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Ebastine is a second-generation antihistamine drug available in the form of orally disintegrating tablets and film-coated tablets. Ebastine substance exhibits high bioavailability, but low solubility in water and gastrointestinal tract media. The technology of solid dispersions based on polymer carriers by hot melt extrusion is proposed to solve the problem of ebastine low solubility.

Aim. Composition development of extrudate and its production technology to create an amorphous solid dispersion of ebastine in order to increase the recovery rate and bioavailability.

Materials and methods. Ebastin micronized (JSC "Active Component", Russia); ebastin crystalline (Arevipharma GmbH, Germany); VIVAPHARM® PVP/VA 64 (JRS Pharma GmbH & Co. KG, Germany). Extrudates were obtained on a HAAKE™ miniCTW co-rotating twin-screw laboratory extruder (Thermo Fisher Scientific, Germany). Extrudates were studied by differential scanning calorimetry, synchronous thermal analysis, powder X-ray diffraction and FTIR-spectroscopy. The quantitative content of the active ingredient was determined by spectrophotometry. The content of related impurities in the amorphous solid dispersion of ebastine was determined by HPLC.

Results and discussion. The technology of amorphous solid dispersion of ebastine by hot melt extrusion was developed. The pharmacokinetic properties of ebastine were significantly improved. The process of obtaining solid dispersion with 20 % of ebastine was optimized in order to reduce the content of impurities in the extrudate.

Conclusion. The maximum concentration of ebastine for proper quality amorphous solid dispersion based on PVP/VA64 amounted to 20 %. Obtaining a solid dispersion by hot melt extrusion with ebastine content in PVP/VA64 higher than 30 % is impossible because the melt does not possess the glass transition property.

Keywords: orally disintegrating tablet, ebastine, hot melt extrusion, extrudate, amorphous solid dispersion, solubility

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

Contribution of the authors. Konstantin A. Gusev and Denis N. Maimistov designed the experiment plan. Andrey R. Aliev, Konstantin A. Gusev and Georgij V. Rechkalov produced extrudates by hot melt extrusion. Yuliya E. Generalova quantified resulting impurities in the extrudate. Nadezhda A. Aksenova carried out simultaneous thermal analysis. Galina M. Alekseeva и Andrey R. Aliev carried out FTIR-spectroscopy. Konstantin A. Gusev and Elena V. Flisyuk processed the data obtained. All authors participated in the discussion of results and wrote the manuscript.

Acknowledgment. The authors are grateful to Active Component JSC for providing the ebastine substance. For scientific work were used samples by JRS Pharma / Rettenmaier Russia.

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: Gusev K. A., Aliev A. R., Generalova Yu. E., Aksenova N. A., Rechkalov G. V., Maimistov D. N., Alekseeva G. M., Flisyuk E. V. Composition and technology development for obtaining amorphous solid dispersion of ebastine by hot melt extrusion to increase dissolution rate. *Drug development & registration*. 2023;12(4):126–135. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1577>

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, аллергическими реакциями страдает более трети населения Земли, заболеваемость растет с каждым годом. В России, по данным опроса компании Rambler&Co в 2021 году, более 60 % опрошенных граждан сталкиваются с симптомами аллер-

гии ежегодно. Антигистаминные препараты часто назначаются для устранения симптомов аллергического ринита и в качестве дополнительной терапии при астме.

Первой линией терапии аллергических заболеваний в настоящее время остаются антигистаминные препараты (АГП), которые значительно облегчают симптомы аллергии. Одной из перспективных

форм для приема АГП являются орально диспергируемые таблетки, которые обеспечивают удобство приема и быстрое наступление фармакологического эффекта.

«Эбастин», антигистаминный препарат второго поколения, выпускается в форме орально диспергируемых таблеток и таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Субстанция эбастина характеризуется высокой биодоступностью, но низкой растворимостью в воде и средах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Для повышения биодоступности действующего вещества в орально диспергируемых таблетках используется технология лиофилизации. А для получения необходимого профиля высвобождения таблеток, покрытых пленочной оболочкой, применяют микронизированную субстанцию.

Технология производства лиофилизированных таблеток характеризуется высокой стоимостью процесса и уникальностью оборудования. Однако для повышения растворимости и биодоступности действующего вещества могут быть использованы и другие, более оптимальные методы.

Существует несколько подходов, улучшающих абсорбцию вещества в ЖКТ за счет повышения растворимости и/или скорости растворения. Методы повышения растворимости делятся на химические (соли [1], сокристаллы [2] и пролекарства [3]) и физические (комплексообразование [4], создание самоэмульгирующихся композиций, липосомальные технологии [5], микронизация [6], преобразование в аморфную форму и создание твердых дисперсных систем (ТДС) на основе полимерных носителей [7]). Химические модификации имеют весьма ограниченное применение ввиду особенностей активной молекулы. В то же время физические методы являются более универсальными и широко используются в технологии готовых лекарственных средств (ГЛС).

Уменьшение размера частиц – одна из самых распространенных технологий повышения растворимости лекарств, поскольку растворимость действующего вещества (ДВ) неразрывно связана с удельной поверхностью частиц. Данный метод широко используется в фармацевтической технологии для повышения биодоступности плохо растворимых активных фармацевтических субстанций (АФС) [6], что позволяет снизить терапевтическую дозу лекарственного вещества (ЛВ) и уменьшить количество побочных эффектов. Однако уменьшение размера частиц оказывает сравнительно небольшое влияние на растворимость ДВ, поскольку повышает не предельную растворимость АФС, а скорость его растворения за счет увеличения площади, доступной для сольватации. Например, в исследовании Xi Nan сообщается, что микронизация ибупрофена не привела к увеличению скорости растворения [8].

При измельчении ДВ приобретает неудовлетворительные технологические свойства. Отсутствие сыпучести, агломерация, повышение реакционной и

адсорбционных способностей являются следствием увеличения свободной поверхностной энергии частиц в процессе измельчения. При этом система становится термодинамически неустойчивой: частицы взаимодействуют с кислородом воздуха, другими компонентами порошкообразной смеси и окружающей среды (газами, мелкими частицами или микроорганизмами), с материалом мельниц, а также адсорбируют влагу, что приводит к уменьшению устойчивости при хранении. Другой существенный недостаток технологии – это накопление в процессе измельчения частицами и элементами оборудования электростатических зарядов, что вызывает пыление ДВ и прилипание к поверхности оборудования, за счет чего увеличиваются технологические потери. Все эти факторы приводят к усложнению процесса и большому количеству потерь на каждой стадии производства готовой лекарственной формы на основе микронизированной субстанции.

В качестве альтернативного промышленного метода повышения растворимости и биодоступности ДВ предложено создание твердых дисперсных систем (ТДС) на основе полимерных носителей методом экструзии горячего расплава. Создание ТДС позволяет в большей степени повысить растворимость по сравнению с методом микронизации. Так, в исследовании Nam Ah Kim сообщается, что для ТДС будеина характерно повышение растворимости более чем в 20 раз относительно микронизированной субстанции [9].

Экструзия горячего расплава – это непрерывный или периодический процесс, который включает плавление, смешение, гомогенизацию и продавливание материала через матрицу при нагревании [7]. В результате расплавления, последующего интенсивного перемешивания, продавливания и остывания образуется ТДС на основе полимера, содержащего действующее вещество. В такой системе ДВ внедрены в носитель, который состоит из одного или нескольких фармацевтически приемлемых полимеров, пластификаторов и вспомогательных веществ.

Полимеры, используемые при экструзии горячего расплава в фармации, могут быть водорастворимыми или водонерастворимыми либо могут обеспечивать растворимость ТДС в определенных средах. К нерастворимым в воде носителям относятся такие полимеры, как этилцеллюлоза и различные воски: в такой системе высвобождение ДВ происходит за счет диффузии. Водорастворимые полимеры включают гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ), полиэтиленоксиды, полиэтиленгликоли, поливинилпирролидон и его сополимеры, а также их композиции, в которых ДВ высвобождается за счет диффузии или эрозии в процессе растворения полимерной матрицы [10, 11]. Из литературы известны основные параметры для фармацевтически пригодных полимеров-носителей – термические свойства и особенности процесса экструзии.

Физические и химические свойства полимера-носителя определяют основные свойства ТДС: позволяют модифицировать высвобождение ДВ из конечной лекарственной формы, определяют растворимость АФС в лекарственной форме и стабильность при хранении. Ранее авторы провели исследования по созданию твердых дисперсий [7] и экструдатов [12] с заданными технологическими свойствами. На основании литературных данных и опыта разработки технологии в качестве полимера-носителя для субстанции эбастина был выбран сополимер поливинилпирролидона и винилацетата (соотношение 60:40). Этот полимер-носитель позволяет значительно повысить растворимость ДВ и обладает невысокой температурой экструзии.

В исследовании использовали фармацевтические субстанции эбастина, полученные от двух производителей: кристаллический эбастин и микронизированный. Оба образца практически нерастворимы в воде и малорастворимы в 0,01 н соляной кислоте. Дополнительно микронизированная АФС эбастина обладает неудовлетворительными технологическими свойствами, такими как низкая сыпучесть, пыление и накопление статического заряда.

Целью работы является разработка состава экструдата и технологии его получения для создания аморфной твердой дисперсной системы эбастина для ускорения процесса высвобождения и повышения биодоступности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Эбастин микронизированный (АО «Активный Компонент», Россия); эбастин кристаллический (Arevipharma GmbH, Германия); VIVAPHARM® PVP/VA 64 (далее – PVP/VA) (JRS Pharma GmbH & Co. KG, Германия).

Оборудование. Двухшнековый лабораторный экструдер НААКЕ™ miniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия) с сонаправленными коническими шнеками; коническая мельница-калибратор ZLJ-125 (Shanghai Unique Machinery Technology Co., Ltd., Китай); многофункциональная лабораторная установка Unique Machinery DGN-II (Shanghai Unique Machinery Technology Co., Ltd., Китай); дифференциальный сканирующий калориметр DSC 3+ (Mettler-Toledo GmbH, Швейцария); синхронный термический анализатор STA 6000 (PerkinElmer, США); ИК-фурье-спектрометр ФСМ 1201 (АО «СПБ Инструментс», Россия); автоматический порошковый дифрактометр Ultima IV-285 (Rigaku Corporation, Япония); спектрофотометр СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия); жидкостный хроматограф высокого давления Flexar (PerkinElmer, США); тестер растворения DT 626/1000 NH (ERWEKA GmbH, Германия).

Синхронный термический анализ проводили на синхронном термическом анализаторе STA 6000. Нагрев тигля осуществляли со скоростью 10 К/мин в диапазоне температур от 20 до 400 °С, в среде инерт-

ного газа – азота. Анализ проводили в керамическом тигле объемом 250 мкл.

Дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) проводили на дифференциальном сканирующем калориметре DSC 3+. Метод состоял из трех последовательных сегментов: нагрева, охлаждения, нагрева в диапазоне от 0 до 150 °С. Изменение температуры производилось с интенсивностью 10 К/мин в среде азота с расходом 50 мл/мин. Использовались тигли алюминиевые стандартные на 40 мкл с перфорацией. Калибровку по температуре и энтальпии проводили по чистым металлам – индию (ME-119442) и цинку (ME-119441) в соответствии с инструкциями производителя. Данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Mettler STARe, версия V16.20c.

Спектр поглощения образцов измеряли на ИК-фурье-спектрометре ФСМ 1201 в диапазоне длин волн от 500 до 4000 см⁻¹. Пробоподготовку проводили по стандартной методике, исследуемое вещество запрессовывали в таблетку с КВг для ИК-спектрии. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Python 3.9, для визуализации использована библиотека matplotlib версии 3.7.0.

Исследование образцов методом **порошковой рентгеновской дифракции** проводилось с использованием автоматического порошкового дифрактометра Ultima IV-285, излучение рентгеновской трубки – Cu_{Kα1+2}, длины волн – λ_{CuKα1} = 1.54059 Å и λ_{CuKα2} = 1.54443 Å, режим работы трубки – 40 кВ / 30 мА, позиционно-чувствительный детектор, геометрия на отражение, схема фокусировки Брегга – Brentano, скорость вращения образца – 20 оборотов в минуту, интервал углов дифракции – 2θ = 3–60°, шаг сканирования – 0,02°, скорость сканирования – 2 °/мин, атмосфера – воздух. Образцы готовили сухим пресованием исследуемой смеси в низкофоновую кювету из монокристаллического кремния (глубина 0,5 мм, диаметр исследуемой площади 20 мм).

Методика получения экструдатов. Смешение эбастина и PVP/VA64 осуществляли в аппарате типа «пьяная бочка» в течение 20 минут при скорости вращения 45 об/мин. Экструзию горячего расплава проводили в двухшнековом лабораторном экструдере НААКЕ™ MiniCTW с сонаправленными коническими шнеками. Экструдер собирали, устанавливали матрицу с диаметром отверстия 1 мм и задавали температуру нагрева материального цилиндра. Загружали смесь равными порциями, равномерность загрузки контролировалась по крутящему моменту на шнеках. Фиксировался рабочий крутящий момент, при котором через матрицу стабильно экструдировался обработанный состав. Экструдат вытягивался вручную, для упрощения последующего измельчения диаметр выдерживался в диапазоне от 1,0 до 1,4 мм.

Полученный экструдат измельчали на конической мельнице-калибраторе ZLJ-125 через сито с круглыми ячейками диаметром 1,0 мм, со скоростью враще-

ния роторного ножа 500–600 об/мин (нож с круглым профилем). Измельченный экструдат просеивали через сито 710 мкм и фракцию менее 710 мкм собирали в фольгированный ZIP-пакет для защиты от света и влаги в процессе хранения.

Количественное определение эбастина проводили методом УФ-спектрофотометрии. Готовили раствор эбастина в 96%-м спирте этиловом с номинальной концентрацией 1 мг/мл и полученный раствор фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. 1,0 мл фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивали.

Измеряли оптическую плотность испытуемого раствора ТДС и раствора стандартного образца эбастина на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 258 нм. В качестве раствора сравнения использовали 0,01М раствор хлористоводородной кислоты.

Тест кинетики растворения проводился на тестере растворения ERWEKA DT 626/1000 НН со скоростью вращения лопастной мешалки 50 об/мин в среде 0,01 М раствора хлороводородной кислоты. Объем среды растворения составил 1000 мл, температура среды (37 ± 0,5) °С. Пробы 10 мл отбирали и фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм через равные промежутки времени – 15, 30, 45 минут, с последующим восполнением среды. Для количественного определения использовался метод УФ-спектрофотометрии с внешним стандартом.

Примеси определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ проводили на хроматографе жидкостном высокого давления Flexar, снабженном насосом с формированием градиента на стороне низкого давления, автодозатором, термостатом колонки и УФ-детектором. Для проведения испытаний готовили раствор с номинальной концентрацией действующего вещества 2 мг/мл (растворитель – ацетонитрил и вода в соотношении 8:2).

Приготовление буферного раствора рН 6,0: в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 950 мл воды для хроматографии, 1,4 мл триэтиламина и 0,3 мл фосфорной кислоты, добавляют фосфорную кислоту (при необходимости) до рН 6,0 ± 0,1, доводят объем раствора водой для хроматографии до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через нейлоновый фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм.

Подвижная фаза А. Смешивают 300 мл буферного раствора и 100 мл ацетонитрила, перемешивают и дегазируют.

Подвижная фаза Б. Смешивают 500 мл метанола и 100 мл ацетонитрила, перемешивают и дегазируют.

Время записи хроматограммы должно не менее чем в 1,5 раза превышать время удерживания эбастина.

Хроматографические условия представлены в таблице 1.

Таблица 1. Хроматографические условия

Table 1. Chromatography conditions

Колонка Column	Kromasil 300-5C8, 250 мм × 4,6 мм, 5 мкм Kromasil 300-5C8, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm
Элюент Eluent	ПФ А: ПФ Б (55:45) MP A: MP B (55:45)
Скорость потока Flow rate	1,5 мл/мин 1,5 ml/min
Температура колонки Column temperature	40 °С
Детектор Detector	УФ, 210 нм UV, 210 nm
Объем пробы Sample volume	20 мкл 20 μl

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения применимости процесса экструзии горячего расплава для получения твердой дисперсии эбастина исследовали термические свойства микронизированной и немикронизированной субстанций. Согласно полученным результатам ДСК температуры плавления образцов составили 86,1 и 87,5 °С соответственно. Согласно результатам синхронного термического анализа разрушение субстанции эбастина начинается при температуре свыше 200 °С. Таким образом установили первоначальный рабочий диапазон процесса экструзии для субстанции эбастина от 80 до 150 °С в зависимости от итогового состава твердой дисперсии.

В качестве исходного сырья ввиду оптимальных технологических свойств для процесса экструзии и получения ТДС выбран немикронизированный эбастин.

Термические свойства полученного образца PVP/VA64 исследованы методом синхронного термического анализа. Результаты показали, что образец PVP/VA64 марки VIVAPHARM® PVP/VA 64 содержит 1,5 % воды по массе, при этом не характеризуется явными эффектами плавления. Характерный эндотермический эффект в диапазоне от 40 до 100 °С соответствует потере массы при испарении воды (рисунок 3). Как ранее было изучено, рабочий температурный диапазон экструзии для PVP/VA64 находится в диапазоне от 120 до 200 °С.

Для уточнения минимальной рабочей температуры экструзии PVP/VA64 экструдировали чистый полимер в диапазоне температур от 110 до 180 °С с шагом в 10 °С. Минимальная рабочая температура экструзии чистого VIVAPHARM® PVP/VA 64 составила 140 °С.

Учитывая, что ДВ имеет температуру плавления значительно ниже, чем у полимера-носителя, оно может выполнять роль пластификатора и потенциально позволит снизить рабочую температуру экструзии до 120 °С при 20%-м содержании эбастина в смеси.

Для определения оптимального температурного диапазона экструзии при одинаковой скорости вращения шнеков (20 об/мин) состав, содержащий 20 % эбастина и 80 % полимера-носителя по массе, экструдировали при температурах 120, 130 и 140 °С. В процессе экструзии оценивали крутящий момент на шнеках, время пребывания материала в экструдере и внешний вид экструдата. Фотографии полученных экструдатов представлены на рисунке 1. В полученных образцах оценивали количественное содержание эбастина и сумму примесей. Сводные данные представлены в таблице 2.

Полученные при температуре 120 °С экструдаты являются мутными. При повышении температуры процесса получаемые продукты становятся прозрачными и затем приобретают желтоватый оттенок. Аналогично при повышении температуры увеличивается количество примесей эбастина в экструдате (таблица 2).

На основании полученных данных проведена оптимизация параметров процесса экструзии с целью снижения термического воздействия на продукт. При температурах 120 и 130 °С получены экструдаты при скоростях вращения шнеков 50 об/мин и 100 об/мин,

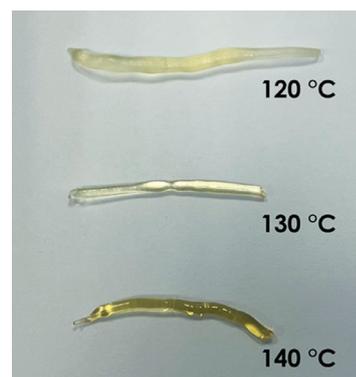


Рисунок 1. Фотография экструдатов эбастина и PVP/VA64, полученных при различных температурах

Figure 1. Photograph of ebastine and PVP/VA64 extrudates prepared at various temperatures

благодаря чему сокращено время пребывания эбастина в экструдере.

Параметры экструдата оценены аналогично предыдущему эксперименту, результаты представлены в таблице 3.

Согласно результатам, представленным в таблице 3, для образцов № 4–7 удалось снизить сумму примесей до нормативных показателей в готовой ле-

Таблица 2. Результаты процесса экструзии ТДС эбастина

Table 2. Results of extrusion ebastine SDS

№	Содержание эбастина, % Ebastine content, %	Содержание PVP/VA64, % PVPVA64 content, %	$T_{\text{экструзии}}^{\circ\text{C}}$ $T_{\text{extrusion}}^{\circ\text{C}}$	Скорость вращения шнеков, об/мин Screw rotation speed, rpm	Время пребывания в экструдере, с Residence time in extruder, sec	Крутящий момент, Н/м Torque, N/m	Сумма примесей, % Amount of impurities, %
Чистая субстанция эбастина (Arevipharma GmbH, Германия) Pure ebastine (Arevipharma GmbH, Germany)							0,058 ± 0,005
1	20	80	120	20	195	0,09	0,41 ± 0,01
2			130			0,06	0,58 ± 0,01
3			140			0,06	0,76 ± 0,02

Таблица 3. Результаты процесса экструзии ТДС эбастина после оптимизации

Table 3. Results of extrusion ebastine SDS after optimization

№	Содержание эбастина, % Ebastine content, %	Содержание PVP/VA64, % PVPVA64 content, %	$T_{\text{экструзии}}^{\circ\text{C}}$ $T_{\text{extrusion}}^{\circ\text{C}}$	Скорость вращения шнеков, об/мин Screw rotation speed, rpm	Время пребывания в экструдере, с Residence time in extruder, sec	Крутящий момент, Н/м Torque, N/m	Сумма примесей, % Amount of impurities, %
Чистая субстанция эбастина (Arevipharma GmbH, Германия) Pure ebastine (Arevipharma GmbH, Germany)							0,058 ± 0,005
4	20	80	120	50	100	0,15	0,19 ± 0,02
5			130			0,12	0,16 ± 0,02
6			120	100	80	0,3	0,13 ± 0,01
7			130			0,3	0,14 ± 0,01

картвенной форме (не более 0,2%). Кроме того, при уменьшении времени пребывания смеси компонентов в экструдере наблюдалась динамика снижения примесей. Визуально все образцы экструдата № 4–7 являются бесцветными и прозрачными.

В рамках проведенной работы исследована возможность увеличения концентрации эбастина в ТДС для последующего создания готовой лекарственной формы. При параметрах экструзии (см. таблица 3) получены экструдаты, содержащие 30% эбастина по массе. Дополнительно проведена серия экспериментов по получению экструдатов, содержащих 50% эбастина. Экструдаты с содержанием эбастина 50% не стекловались, образовывали вязкую, смолоподобную массу.

Состав, содержащий 30% эбастина, показал значительное увеличение количества примесей вплоть до 0,8% при 120 °C и 100 об/мин. Таким образом, максимальная концентрация эбастина в бинарной твердой дисперсии на основе PVP/VA64 составила 20% по массе.

Для контроля качества экструдатов проведено количественное определение эбастина. Содержание эбастина в полученных образцах ТДС соответствовало заявленному с учетом погрешности метода.

Твердая дисперсия эбастина (20%) охарактеризована синхронным термическим анализом. ДСК-кривые ТДС эбастина (20%), PVP/VA64 и чистого кристаллического вещества представлены на рисунке 2. На кривой ДСК твердой дисперсии эбастина не наблю-

дается отдельного пика, соответствующего плавлению чистой субстанции, что может свидетельствовать об образовании аморфной твердой дисперсии АФС в результате обработки методом экструзии горячего расплава.

ТДС эбастина (20%) проанализирована с помощью ИК-фурье-спектроскопии. ИК-спектры в диапазоне от 2000 до 450 см⁻¹ чистого эбастина, PVP/VA64 и ТДС эбастина представлены на рисунке 3. Основные характеристические пики эбастина присутствуют на спектре твердой дисперсии, при этом отсутствие новых пиков указывает на отсутствие химических реакций с участием обоих компонентов. Уширение и незначительное смещение полос в ИК-спектре ТДС по сравнению с ИК-спектрами исходных веществ может указывать как на переход ДВ из кристаллического состояния в аморфное, так и на взаимодействие полимерного носителя с эбестином (формирование гидрофобных и водородных связей).

Образцы чистого кристаллического эбастина, PVP/VA64, механической смеси PVP/VA64 и эбастина (20%) и твердой дисперсии (20%) оценены на степень кристалличности методом порошковой рентгеновской дифракции. Согласно полученным результатам (рисунок 4) эбастин представляет собой кристаллическую фазу, PVP/VA64 – аморфную, механическая смесь эбастина и PVP/VA64 – смесь кристаллической и аморфной фаз, при этом твердая дисперсия является аморфной фазой.

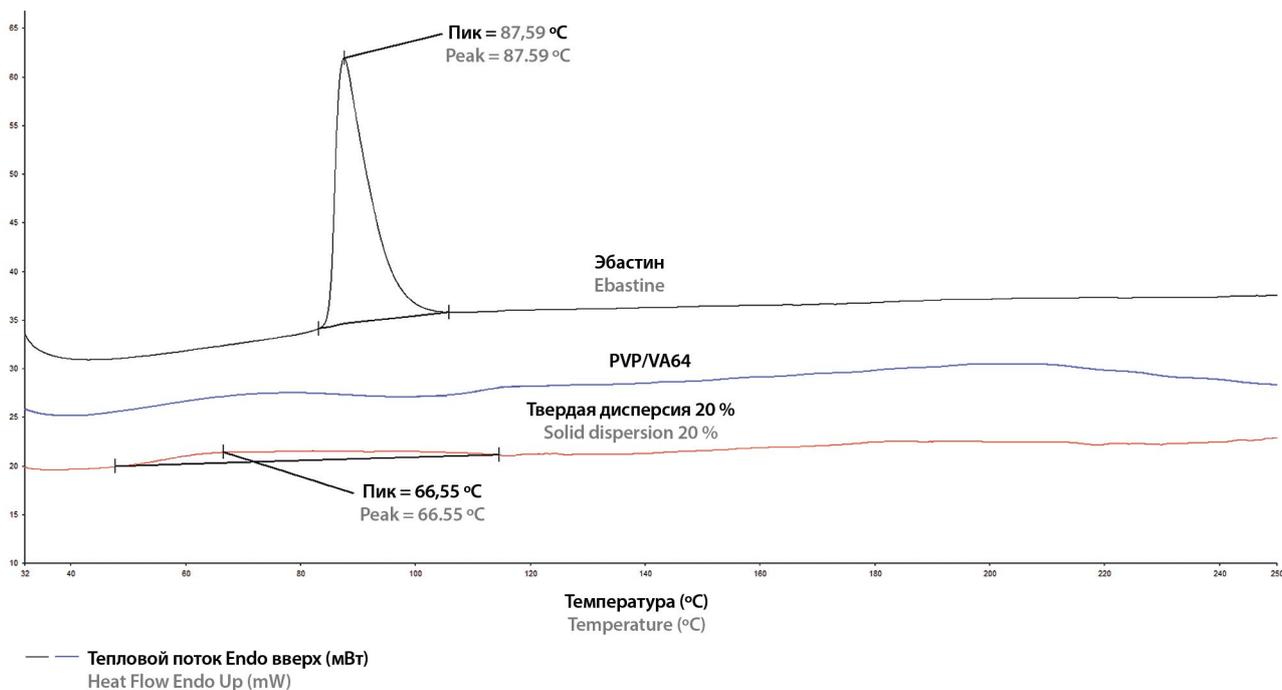


Рисунок 2. Результат ДСК эбастина, PVP/VA64 и ТДС (20%)

Figure 2. Results of DSC ebastine, PVP/VA64 and SDS (20%)

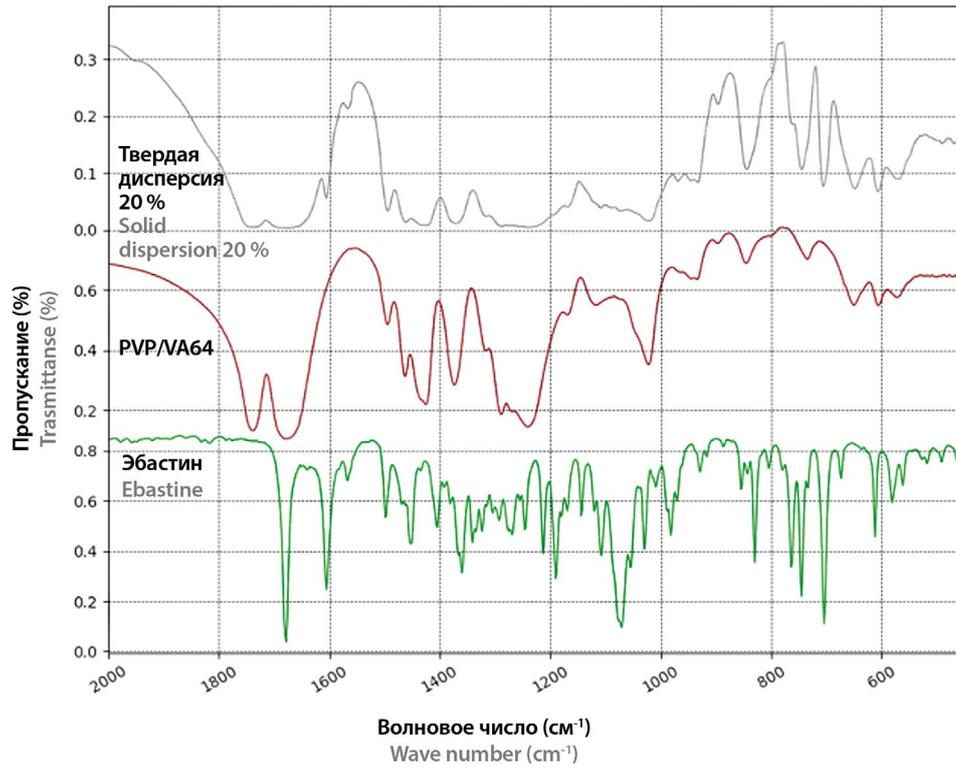


Рисунок 3. ИК-фурье-спектры эбастина, PVP/VA64 и ТДС (20 %)

Figure 3. FTIR spectrum of ebastine, PVP/VA64 and SDS (20 %)

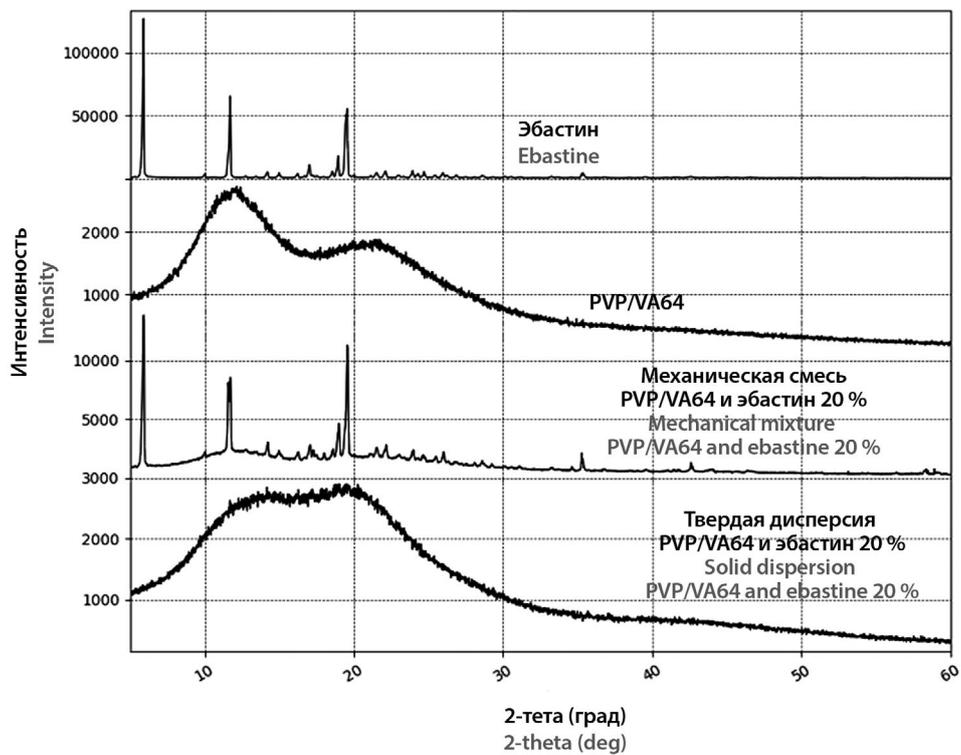


Рисунок 4. Результаты исследования порошковой рентгеновской дифракции образцов

Figure 4. XRPD diffractograms of samples

Таким образом, на основе PVP/VA64 получена аморфная твердая дисперсная система (АТДС), содержащая 20 % эбастина.

Для оценки скорости растворения ДВ эбастина из твердой дисперсии проведен тест сравнительной кинетики растворения. Для сравнения использовали исходную кристаллическую субстанцию, таблетки «Кестин», покрытые пленочной оболочкой, и лиофилизированные таблетки «Кестин».

Согласно полученным результатам (рисунок 5) кристаллическая субстанция демонстрирует низкую скорость растворения (53,5 % через 45 минут). Наивысшая скорость растворения характерна для оригинальных лиофилизированных таблеток «Кестин». При этом твердая дисперсия показывает результат, превышающий скорость высвобождения ДВ из таблеток, покрытых пленочной оболочкой, и приближается к результату лиофилизированных таблеток.

На основании изучения кинетики высвобождения эбастина можно сделать вывод о возможности создания орально диспергируемых таблеток методом прямого прессования на основе АТДС эбастина, полученной методом экструзии горячего расплава.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом проделанной работы стала разработка составов АТДС эбастина, содержащих 20 и 30 % ДВ, с улучшенными фармакокинетическими свойствами.

Показана возможность создания АТДС эбастина на основе кристаллической (немикронизированной) фармацевтической субстанции.

С помощью технологии экструзии горячего расплава увеличена скорость растворения и высвобождения эбастина из АТДС по сравнению с микронизированной субстанцией. Для уменьшения количества родственных примесей эбастина в целевой АТДС проведена оптимизация технологии экструзии. Исследован профиль кинетики растворения полученной АТДС, показано значительное улучшение скорости растворения и высвобождения эбастина из АТДС. Кинетика растворения АТДС оказалась близка к орально диспергируемым таблеткам, полученным методом лиофилизации. В перспективе дальнейших разработок лежит возможность получения орально диспергируемых таблеток на основе АТДС эбастина методом прямого прессования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hiew T. N., Taylor L. S. Combining drug salt formation with amorphous solid dispersions – a double edged sword. *Journal of Controlled Release*. 2022;352:47–60. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.09.056.
2. Takagi T., Ramachandran C., Bermejo M., Yamashita S., Yu L. X., Amidon G. L. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Molecular Pharmaceutics*. 2006;3(6):631–643. DOI: 10.1021/mp0600182.

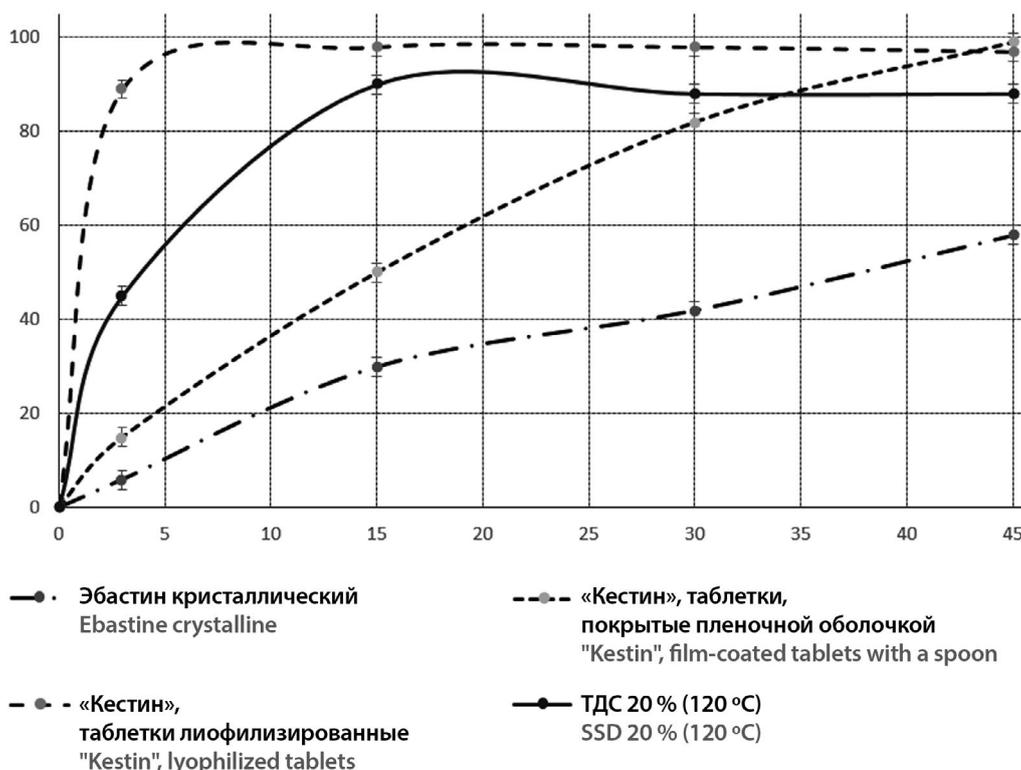


Рисунок 5. Кинетика высвобождения эбастина из различных образцов

Figure 5. Ebastine release kinetics from various samples

3. Erxleben A. Cocrystal Applications in Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):834. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090834.
4. Manne A. S. N., Hegde A. R., Raut S. Y., Rao R. R., Kulkarni V. I., Mutalik S. Hot liquid extrusion assisted drug-cyclodextrin complexation: a novel continuous manufacturing method for solubility and bioavailability enhancement of drugs. *Drug Delivery and Translational Research*. 2021;11(3):1273–1287. DOI: 10.1007/s13346-020-00854-w.
5. Lee M. K. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics*. 2020;12(3):264. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030264.
6. Csicsák D., Szolláth R., Kádár S., Ambrus R., Bartos C., Balogh E., Antal I., Köteles I., Tózsér P., Bárdos V., Horváth P., Borbás E., Takács-Novák K., Sinkó B., Völgyi G. The Effect of the Particle Size Reduction on the Biorelevant Solubility and Dissolution of Poorly Soluble Drugs with Different Acid-Base Character. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):278. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010278.
7. Gusev K. A., Maimistov D. N., Pavlovsky V. I., Aliev A. R., Pavlovsky A. V., Ivanova O. V., Tsyrenov D. O., Flisyuk E. V. Development of the Composition and Technology for Production a Solid Dispersion System by Hot Melt Extrusion to Increase the Bioavailability of the Active Substance. *Drug development & registration*. 2022;11(4):108–115. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-108-115.
8. Han X., Ghoroi C., To D., Chen Y., Davé R. Simultaneous micronization and surface modification for improvement of flow and dissolution of drug particles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;415(1–2):185–195. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.070.
9. Kim N. A., Oh H. K., Lee J. C., Choi Y. H., Jeong S. H. Comparison of solubility enhancement by solid dispersion and micronized butein and its correlation with in vivo study. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2021;51:53–60. DOI: 10.1007/s40005-020-00486.
10. Islam N., Irfan M., Zahoor A. F., Iqbal M. S., Syed H. K., Khan I. U., Rasul A., Khan S. U., Alqahtani A. M., Ikram M., Abdul Qayyum M., Khames A., Inam S., Abourehab M. A. S. Improved Bioavailability of Ebastine through Development of Transfersomal Oral Films. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1315. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081315.
11. Islam N., Irfan M., Khan S. U., Syed H. K., Iqbal M. S., Khan I. U., Mahdy A., Raafat M., Hossain M. A., Inam S., Munir R., Ishtiaq M. Poloxamer-188 and d- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate (TPGS-1000) Mixed Micelles Integrated Orodispersible Sublingual Films to Improve Oral Bioavailability of Ebastine; In Vitro and In Vivo Characterization. *Pharmaceutics*. 2021;13(1):54. DOI: 10.3390/pharmaceutics13010054.
12. Terenteva O. A., Gusev K. A., Tikhonova V. V., Maimistov D. N., Shandryuk G. A., Flisyuk E. V. Three-dimensional printing of ramipril tablets by fused deposition modeling. *Drug development & registration*. 2021;10(4):79–87. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-79-87.



Оригинальная статья / Research article

Об эффективности эмпаглифлозина в терапии экспериментального инфаркта миокарда

Д. Ю. Ивкин¹✉, М. В. Краснова¹, С. В. Оковитый¹, А. А. Карпов³,
А. Н. Куликов², Е. И. Елецкая¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России). 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, д. 2

✉ Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ORCID: Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; М. В. Краснова – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>;

С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>; А. А. Карпов – <https://orcid.org/0000-0003-0114-5896>;

А. Н. Куликов – <https://orcid.org/0000-0003-0305-4787>; Е. И. Елецкая – <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>.

Статья поступила: 26.09.2023

Статья принята в печать: 03.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. После появления эмпаглифлозина на фармацевтическом рынке отмечается рост публикаций, посвященных первичной и вторичной фармакодинамике препарата, увеличивается перечень потенциальных показаний к применению данного ингибитора натрий-глюкозного котранспортера. Гипотезы о фармакологических эффектах и механизмах их реализации проверяются как в масштабных клинических исследованиях, так и в экспериментах на животных.

Цель. Целью данной работы являлись исследования эффективности эмпаглифлозина с использованием эхокардиографических, гистологических и молекулярно-биологических анализов в трех наиболее значимых точках динамического перехода от острого инфаркта миокарда к постинфарктной хронической сердечной недостаточности на лабораторных крысах-самцах.

Материалы и методы. Эксперимент выполнялся на 60 аутобредных крысах-самцах. Инфаркт миокарда моделировали у наркотизированных животных путем перманентной перевязки левой коронарной артерии. Основываясь на данных эхокардиографического (ЭхоКГ) исследования, животных рандомизировали на две группы: контрольный инфаркт – группа патологии без лечения, получавшая плацебо, – и группа терапии с патологией, получавшая эмпаглифлозин в дозе 1 мг/кг per os внутривентрикулярно ежедневно с первого дня эксперимента. На 10, 20 и 30-й день после операции животным проводили ЭхоКГ-исследование, производилась эвтаназия части животных по 10 из каждой группы для выполнения гистологического исследования и молекулярного анализа.

Результаты и обсуждение. Использование эмпаглифлозина у животных после моделирования инфаркта миокарда способствовало значимому увеличению работоспособности миокарда на 10, 20 и 30-й день, достигая максимума на 20-й день ($47,58 \pm 1,87\%$). Препарат способствует длительному сохранению зоны повреждения сердечной мышцы с ранним образованием зрелой соединительной ткани, а также увеличивает сопротивляемость миокарда к воздействию гипоксии путем роста количества HIF-1.

Заключение. На основании проведенных исследований можно сделать вывод о возможности применения натрий-глюкозного котранспортера 2 типа эмпаглифлозина при формировании постинфарктной хронической сердечной недостаточности в условиях нормогликемии.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, SGLT2-ингибиторы, эхокардиографическое исследование, молекулярно-биологический анализ, гистология

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

Вклад авторов. С. В. Оковитый, А. Н. Куликов, Д. Ю. Ивкин разработали дизайн эксперимента. А. А. Карпов, М. В. Краснова провели моделирование инфаркта миокарда и эхокардиографическое исследование. М. В. Краснова, Е. И. Елецкая провели доклинические исследования сравнительной эффективности полученных составов. Д. Ю. Ивкин, М. В. Краснова участвовали в обработке данных и в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

Для цитирования: Ивкин Д. Ю., Краснова М. В., Оковитый С. В., Карпов А. А., Куликов А. Н., Елецкая Е. И. Об эффективности эмпаглифлозина в терапии экспериментального инфаркта миокарда. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):136–145. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1588>

Efficacy of Empagliflozin in the Treatment of Experimental Myocardial Infarction

Dmitry Yu. Ivkin¹✉, Marina V. Krasnova¹, Sergey V. Okovity¹, Andrey A. Karpov³,
Alexander A. Kulikov², Elizaveta I. Yeletskaia¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² FSBEI HE I.P. Pavlov SPbSMU MOH Russia. 6–8, Lev Tolstoy str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

³ Almazov National Medical Research Centre. 2, Akkuratova str., Saint-Petersburg, 197341, Russia

✉ Corresponding author: Dmitry Yu. Ivkin. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

© Ивкин Д. Ю., Краснова М. В., Оковитый С. В., Карпов А. А., Куликов А. Н., Елецкая Е. И., 2023

© Ivkin D. Yu., Krasnova M. V., Okovity S. V., Karpov A. A., Kulikov A. A., Yeletskaia E. I., 2023

ORCID: Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Marina V. Krasnova – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>;
Sergey V. Okovity – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>; Andrey A. Karpov – <https://orcid.org/0000-0003-0114-5896>;
Alexander A. Kulikov – <https://orcid.org/0000-0003-0305-4787>; Elizaveta I. Yeletskaia – <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>.

Received: 26.09.2023 Revised: 03.11.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. With the emergence of empagliflozin in the pharmaceutical market, there has been an increase in publications on the primary and secondary pharmacodynamics of the drug, and the list of potential indications for the use of this sodium-glucose co-transporter inhibitor is increasing. Hypotheses about pharmacological effects and mechanisms of their implementation are tested both in large-scale clinical studies and in animal experiments.

Aim. The purpose of this work was to study the effectiveness of empagliflozin by echocardiographic, histological and molecular biological analyses at the three most significant points of the dynamic transition from acute myocardial infarction to post-infarction chronic heart failure in laboratory male rats.

Materials and methods. The experiment was performed on 60 male outbred rats. Myocardial infarction was modeled in narcotic animals by permanent ligation of the left coronary artery. Based on echocardiographic (EchoCG) study data, animals were randomized to two groups: control infarction: untreated pathology group treated with placebo and pathology group treated with empagliflozin 1 mg/kg per os intragastric daily from the first day of the experiment. At 10, 20 and 30 days after the operation, the animals were also subjected to EchoCG testing, and a group of 10 animals from each group were euthanized for histological examination and molecular analysis.

Results and discussion. Empagliflozin use in animals after myocardial infarction modeling contributed to a significant increase in myocardial performance on days 10, 20 and 30, reaching a maximum on day 20 ($47.58 \pm 1.87\%$). The drug promotes long-term preservation of the area of damage to the heart muscle with early formation of mature connective tissue, and also increases myocardial resistance to hypoxia by increasing the amount of HIF-1.

Conclusion. Based on the studies carried out, it can be concluded that it is possible to use the sodium-glucose cotransporter type 2 empagliflozin in the formation of post-infarction chronic heart failure in the conditions of normoglycemia.

Keywords: myocardial infarction, SGLT2 inhibitors, echocardiogram, molecular biological analysis, histology

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

Contribution of the authors. Sergey V. Okovity, Alexander N. Kulikov, Dmitry Yu. Ivkin developed the design of the experiment. Andrey A. Karpov, Marina V. Krasnova conducted modeling of myocardial infarction and echocardiographic study. Marina V. Krasnova, Elizaveta I. Yeletskaia conducted preclinical studies of the comparative effectiveness of the obtained compositions. Dmitry Yu. Ivkin, Marina V. Krasnova participated in data processing and in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

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

For citation: Ivkin D. Yu., Krasnova M. V., Okovity S. V., Karpov A. A., Kulikov A. A., Yeletskaia E. I. Efficacy of empagliflozin in the treatment of experimental myocardial infarction. *Drug development & registration*. 2023;12(4):136–145. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1588>

ВВЕДЕНИЕ

Результаты исследования С. А. Шальной и соавт. о встречаемости инфаркта миокарда (ИМ) у населения Российской Федерации подтверждают общую долю патологии в 2,9 % от популяции: 5,2 % у мужчин и 1,5 % у женщин, с тенденцией к увеличению с возрастом [1]. Проведенное к 31.08.2023 клиническое исследование Empact-Mi посвящено оценке влияния гипогликемического средства – SGLT2-ингибитора эмпаглифлозина (Джардинс®, Boehringer Ingelheim) на госпитализацию пациентов с сердечной недостаточностью и смертность после перенесенного острого ИМ. Однако результаты данного исследования еще только должны стать общедоступными¹. Представлялось актуальным выполнение

экспериментального исследования на лабораторных животных, позволяющего достаточно быстро получить предварительные результаты и использовать методики, недоступные при проведении клинического исследования, в том числе гистологические post mortem. В проведенных нами ранее исследованиях была подтверждена эффективность испытуемого препарата на модели постинфарктной хронической сердечной недостаточности (ПИХСН) [2]. При литературном поиске не были обнаружены экспериментальные исследования похожего дизайна. Однако данные клинического исследования EMPA-RESPONSE-AHF² подтверждают возможность применения ингибиторов SGLT2 у госпитализированных пациентов с острым ИМ непосредственно после их стабилизации. В исследовании

¹ EMPACT-MI: A Study to Test Whether Empagliflozin Can Lower the Risk of Heart Failure and Death in People Who Had a Heart Attack (Myocardial Infarction). Identifier: NCT04509674// Available at: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04509674?term=EMPACT-MI&draw=2&rank=1>. Accessed: 28.09.2023.

² Effects of Empagliflozin on Clinical Outcomes in Patients With Acute Decompensated Heart Failure (EMPA-RESPONSE) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03200860. Available at: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03200860>. Accessed: 28.09.2023.

EMPA-RESPONSE-ANF 80 пациентов с острым ИМ были рандомизированы и начали получать эмпаглифлозин или плацебо в течение суток после возникновения ИМ. В целом эмпаглифлозин показал себя безопасным и хорошо переносимым препаратом, снижая выраженность эффектов комбинированной конечной точки [3].

Гибель кардиомиоцитов и дисфункция оставшихся жизнеспособных кардиомиоцитов являются основными патологическими факторами сердечной недостаточности после ИМ. Митохондриальные комплексы становятся важными медиаторами регуляции функции кардиомиоцитов. Однако точная роль субъединиц митохондриального комплекса при сердечной недостаточности после ИМ остается неясной. В исследовании Janbandhu показано, что HIF-1 или фактор, индуцируемый гипоксией, подавляет пролиферацию сердечных фибробластов после инфаркта, индуцируемую активными формами кислорода (АФК) [4]. HIF-1 является фактором транскрипции, который функционирует как главный регулятор кислородного гомеостаза у всех видов млекопитающих животных, он контролирует доставку кислорода, участвуя в процессах ангиогенеза и ремоделирования сосудов, а также использование кислорода, регулируя метаболизм глюкозы и окислительно-восстановительный гомеостаз.

При дисфункции миокарда после перенесенного инфаркта экспрессия NDUFV опосредует выраженный терапевтический эффект, связанный с регуляцией фиброза и апоптоза [5].

Ряд исследований демонстрируют важную роль митохондриального дыхательного комплекса II (сукцинатдегидрогеназа, SDHA) в модулировании продукции АФК при различных сердечно-сосудистых патологиях: так, нарушение его сборки в миокарде способствует развитию дилатационной кардиомиопатии [6]. Именно поэтому, помимо методов функциональной диагностики (ЭхоКГ) и гистологического анализа, при проведении эксперимента использованы молекулярно-биологические методы.

Целью данного исследования явилась оценка эффективности эмпаглифлозина при экспериментальном ИМ в динамике в условиях нормогликемии и выявление возможного механизма реализации кардиотропного эффекта. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- проведение эхокардиографического (ЭхоКГ) исследования на 10, 20 и 30-е сутки от перевязки левой коронарной артерии (ЛКА);
- динамическая гистологическая оценка патологических изменений в миокарде;
- динамическая оценка экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1), НАДН-дегидрогеназы [убихинон] флавопротеина 1 (NDUFV) и сукцинатдегидрогеназы (SDHA) методом молекулярно-биологического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнялся на 60 аутбредных крысах-самцах, полученных из питомника лабораторных животных ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАНН. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г. Исследование было выполнено с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986) в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики и в соответствии с протоколом биоэтической комиссии СПХФУ № Rat-SA(MI)-2020 от 03.02.2020.

Масса животных после периода адаптации на момент начала эксперимента составила (190 ± 10) г. Животные содержались в условиях 12/12-часового свет-темнового режима и получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Инфаркт миокарда моделировали у наркотизированных животных [золетил (Virbac, Франция) + ксилазин (Interchemie, Нидерланды)] путем перманентной перевязки левой коронарной артерии [7–9]. Сразу же после операции, основываясь на значениях эхокардиографического (ЭхоКГ) исследования и данных второго стандартного отведения снятых электрокардиограмм (ЭКГ), животных рандомизировали на две группы: контрольный инфаркт – группа патологии без лечения, получавшая плацебо (группа № 1), – и группа терапии с патологией, получавшая эмпаглифлозин в дозе 1 мг/кг *per os* внутривенно ежедневно с первого дня эксперимента (группа № 2). На 10, 20 и 30-й день после операции животным также производили ЭхоКГ-исследование, осуществляли забор и анализ гистологического материала. ЭхоКГ выполняли наркотизированным животным на ультразвуковой системе MyLabTouchSL 3116 (Esaote, Италия) (рисунок 1).

При проведении ЭхоКГ животных размещали на подогреваемом столике в положении на спине. Шерсть над областью сердца предварительно выбривали для максимального контакта с гелем и ультразвуковым сосудистым линейным датчиком высокого разрешения с частотой 13 МГц. ЭхоКГ проводили в В-режиме (двумерное сканирование) и М-режиме (одномерное сканирование) [9]. Ключевыми параметрами оценки были фракция выброса (ФВ, %), фракция укорочения (ФУ, %), конечный систолический размер левого желудочка (КСР ЛЖ, мм), конечный диастолический размер левого желудочка (КДР ЛЖ, мм) и частота сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин).

Через 10, 20 и 30 дней после моделирования ИМ производилась эвтаназия части животных по 10 из каждой группы для выполнения гистологического исследования и молекулярного анализа.

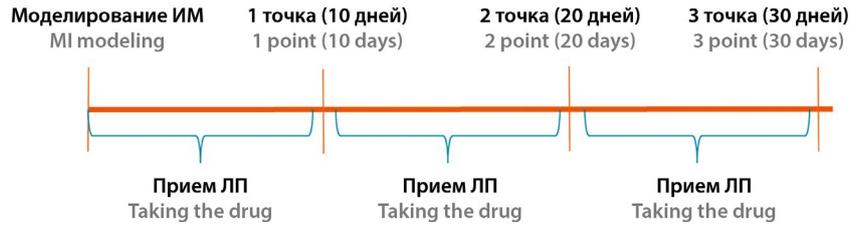


Рисунок 1. Схема эксперимента

Figure 1. Experimental design

Эвтаназию осуществляли внутрисердечной инъекцией 30 %-го раствора калия хлорида наркотизированных животных с целью остановки сердца в диастолу. После эвтаназии животных вскрывали, сердце извлекали, область с визуализированной зоной некроза помещали в раствор 10%-го забуференного нейтрального формалина для дальнейшего гистологического исследования, а оставшийся миокард замораживали в жидком азоте для последующего молекулярно-биологического анализа. Органы животных, погибших в интервале между точками, также подвергались гистологическому исследованию, но не замораживались.

Все данные выражены как среднее \pm стандартное отклонение. Что касается небольшого размера группы и отсутствия нормального распределения значений, то для обработки статистических данных использовались непараметрические статистические методы. В частности, критерий Краскела–Уоллиса использовался для оценки значимости различий между двумя несовпадающими популяциями. Анализ данных проводился с использованием пакета STATISTICA v10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), причем значения $p \leq 0,05$ рассматривались как указывающие на статистическую значимость.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первые 10 дней после моделирования ИМ выживаемость животных в группе контрольного инфаркта составила 80 %, а в группе терапии – 100 %. В последующем выживаемость в обеих группах была 100 %.

Эхокардиографическое исследование

Согласно данным, полученными нами в ранее проведенных исследованиях [7], ФВ (Т) здоровых крыс данного пола и возраста колеблется в пределах $(71,3 \pm 5,21)$ %, а по литературным данным, варьирует от 53,7 до 86 % [8]. При этом ФВ в группе контрольного инфаркта (группа № 1) на 10-й день составила $(18,71 \pm 7,60)$ % с возрастанием к 20-му дню до $(37,12 \pm 6,34)$ % и снижением на 30-й день до $(24,90 \pm 5,49)$ %, что соответствует формирова-

нию постинфарктной хронической сердечной недостаточности (ПИ ХСН). В случае применения эмпаглифлозина (группа № 2) значимые приросты эффективности работы миокарда наблюдались на 10, 20 и 30-й дни, а на точке «20 дней» достигали своего абсолютного максимума $(47,58 \pm 1,87)$ % (рисунок 2, А). Значимые различия имеются на точке «30 дней» ($p = 0,0476$).

При анализе ЭхоКГ в предыдущем эксперименте ФУ составила $(50 \pm 7,7)$ % [7], а по литературным данным – от 37 до 52 % [8]. Картина изменений значения данного показателя на 10, 20 и 30-й дни полностью сопоставима с таковой по ФВ (рисунок 2, Б).

Значимых различий по показателям КДР ЛЖ, КСР ЛЖ между исследуемыми группами контрольного инфаркта и группы лечения получено не было (рисунок 2 В, Г).

Показатель ЧСС на 30-е сутки достоверно увеличился в группе терапии по сравнению с патологией без лечения, что можно связать с компенсаторной реакцией на фоне уменьшения значений функциональных показателей миокарда (рисунок 2, Д).

На рисунке 2 сведены результаты исследования в динамике.

Гистологическое исследование

10-е сутки после операции

В группе контроля (естественное течение после экспериментального острого ИМ) патологические изменения были закономерно представлены преимущественно выраженным повреждением в виде некроза (60 % животных) с умеренно выраженными (20 %) или выраженными (20 %) реактивными экссудативными воспалительными изменениями и формированием умеренно (50 %) или значительно выраженных (50 %) грануляций. Грануляционная ткань характеризуется незрелостью (отсутствием зрелой соединительной ткани). В крупных очагах некроза кардиомиоцитов наблюдалось формирование умеренно выраженной незрелой грануляционной ткани с полиморфноклеточной воспалительной инфильтрацией (рисунок 3, А).

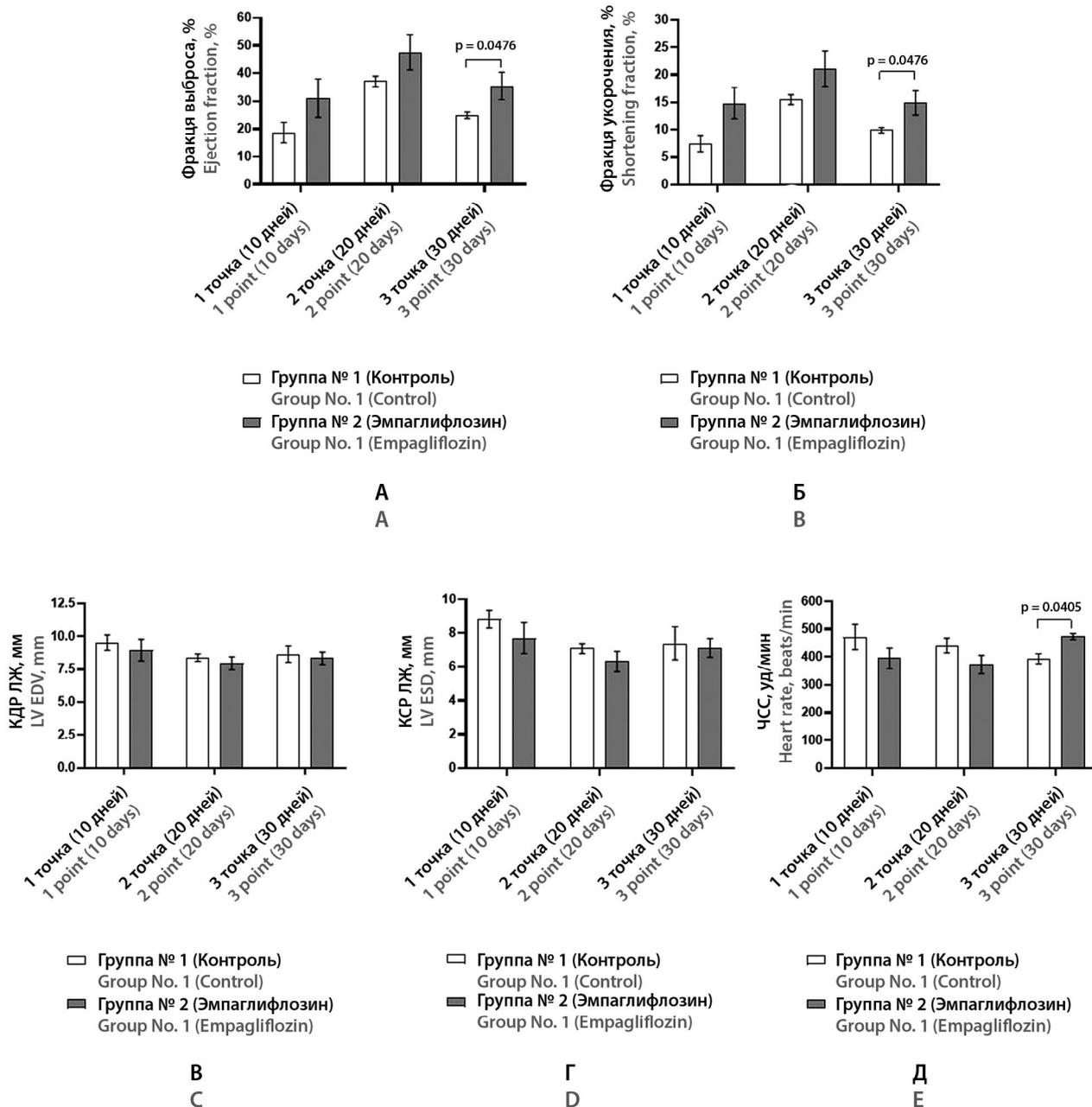


Рисунок 2. Динамика изменений основных ЭхоКГ-показателей в сравнении между группой № 1 (патология без лечения) и группой № 2 (патология с лечением эмпаглифлозином):

А – изменение значения фракции выброса, %; **Б** – изменение значения фракции укорочения, %; **В** – изменение значения КДР ЛЖ, мм; **Г** – изменение значения КСР ЛЖ, мм; **Д** – изменение ЧСС, уд/мин

Figure 2. Dynamics of changes in the main EchoCG indicators in comparison between group No. 1 (pathology without treatment) and group No. 2 (pathology with treatment with empagliflozin):

А – change in ejection fraction value, %; **Б** – change in the value of the shortening fraction, %; **В** – change in the value of LV EDR, mm; **Д** – change in LV ESR value, mm; **Е** – change in heart rate, beats/min

В группе терапии признаки повреждения миокарда (в виде некроза) были значительно выражены у меньшей части животных (40%), у остальных были выражены умеренно (20%) и слабо (20%) или не выражены вовсе (20%). Тем не менее воспалительные экссудативные изменения наблюдались у всех животных, были выражены умеренно (60%) или значитель-

но (40%) и сопровождалась выраженными разрастаниями грануляционной ткани. Грубая соединительная ткань на этом сроке эксперимента не была сформирована, но наблюдалось возникновение эпителиоидно-клеточной реакции вокруг шовного материала (рисунок 3, Б).

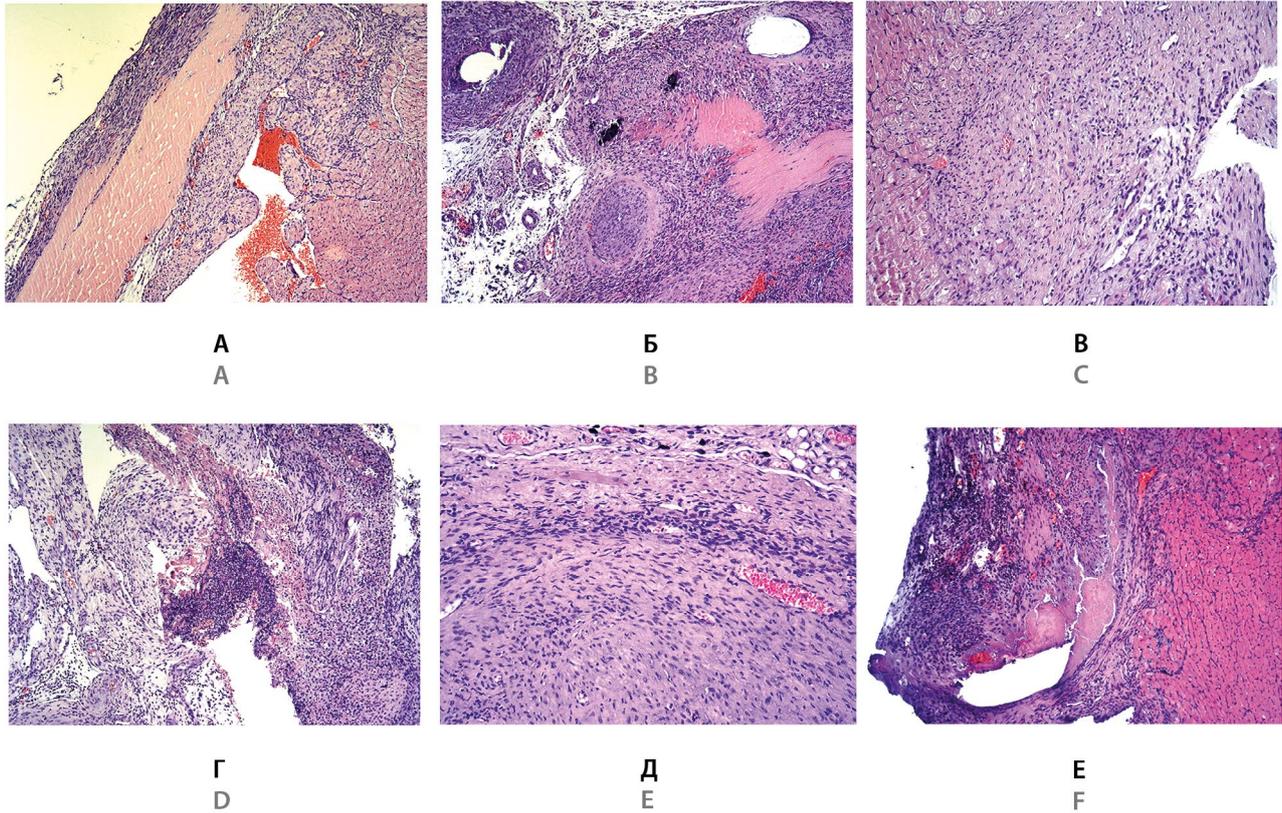


Рисунок 3. Гистологические изменения миокарда:

А – крупные очаги некроза кардиомиоцитов с формированием умеренно выраженной незрелой грануляционной ткани и умеренно выраженной полиморфноклеточной воспалительной инфильтрацией; **Б** – крупноочаговые некрозы кардиомиоцитов, окруженные обширными полями незрелой грануляционной ткани с умеренно выраженной лимфоплазмацитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, тучных клеток и гемосидерофагов, с дилатацией полостей сердца. Очаговая эпителиоидноклеточная реакция вокруг шовного материала, очаги обызвествления; **В** – крупноочаговый кардиосклероз со слабо выраженной перифокальной лимфогистиоцитарной инфильтрацией с примесью плазматических клеток и гемосидерофагов; **Г** – очаговые некрозы кардиомиоцитов, окруженные диффузными обширными полями незрелой грануляционной ткани с выраженной лимфоплазмацитарной инфильтрацией с обильной примесью нейтрофилов с формированием очагов гнойного расплавления, тучных клеток и гемосидерофагов; **Д** – крупные очаги формирования зрелой грануляционной и соединительной ткани со слабо выраженной перифокальной лимфогистиоцитарной инфильтрацией с примесью плазматических клеток, гемосидерофагов, тучных клеток; **Е** – очаговые некрозы кардиомиоцитов, окруженные полями незрелой и зрелой грануляционной ткани с очаговой выраженной лимфоплазмацитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, тучных клеток и гемосидерофагов, с дилатацией полостей сердца

Figure 3. Histological changes in the myocardium:

A – large foci of cardiomyocyte necrosis with the formation of moderately expressed immature granulation tissue and moderately expressed polymorphic cellular inflammatory infiltration; **B** – large-focal necrosis of cardiomyocytes, surrounded by vast fields of immature granulation tissue with moderately pronounced lymphoplasmacytic infiltration with an admixture of neutrophils, mast cells and hemosiderophages, with dilatation of the cavities of the heart. Focal epithelioid cell reaction around the suture material, foci of calcification; **C** – large-focal cardiosclerosis with weakly expressed perifocal lymphohistiocytic infiltration with an admixture of plasma cells and hemosiderophages; **D** – focal necrosis of cardiomyocytes, surrounded by diffuse extensive fields of immature granulation tissue with pronounced lymphoplasmacytic infiltration with an abundant admixture of neutrophils with the formation of foci of purulent melting, mast cells and hemosiderophages; **E** – large foci of formation of mature granulation and connective tissue with weakly expressed perifocal lymphohistiocytic infiltration with an admixture of plasma cells, hemosiderophages, mast cells; **F** – focal necrosis of cardiomyocytes, surrounded by fields of immature and mature granulation tissue with focal pronounced lymphoplasmacytic infiltration with an admixture of neutrophils, mast cells and hemosiderophages, with dilatation of the cavities of the heart

20-е сутки после операции

В группе контроля некроз отсутствовал у всех животных, однако продолжала сохраняться умеренно (60 %) или слабо выраженная (40 %) экссудативная клеточная реакция (воспаление) и преимущест-

венно умеренные разрастания грануляционной ткани без явлений формирования грубой фиброзной ткани. Кроме того, у 20 % животных наблюдался крупноочаговый кардиосклероз со слабовыраженной перифокальной лимфоцитарной инфильтрацией (рисунок 3, В).

У 40 % животных из группы терапии сохранялись признаки повреждения миокарда (в виде очагов «замершего инфаркта») среди умеренно выраженной воспалительной инфильтрации и выраженных разрастаний грануляционной ткани. Вместе с тем у всех животных при этом наблюдалось слабо выраженное образование грубой соединительной ткани. Наблюдалось возникновение очагового миксоматоза в зоне формирующегося рубца у 80 % крыс (рисунок 3, Г).

30-е сутки после операции

В группе контроля у всех животных некротические изменения отсутствовали, воспаление было выражено слабо, умеренные разрастания грануляционной ткани сочетались с формированием умеренных (50 %) или выраженных (50 %) разрастаний грубой рубцовой ткани, в двух наблюдениях отмечено формирование тяжелой сердечной недостаточности (рисунок 3, Д).

В группе терапии признаки повреждения миокарда сохранились лишь у одного животного, экссудативная воспалительная реакция чаще была слабо выражена, слабо и умеренно выраженные разрастания грануляционной ткани сочетались с разной степени выраженности разрастаниями грубой рубцовой ткани. Сохранялась выраженность миксоматоза в зоне рубца (80 %) (рисунок 3, Е).

Таким образом, на основании характера и с учетом степени выраженности выявленных патологических изменений экспериментальный острый инфаркт миокарда в группе животных, получавших эмпаглифлозин, по отношению к группе контроля протекал со сниженной элиминацией некротического детрита и длительным сохранением зоны повреждения («замерший инфаркт»), более умеренной степенью выраженности экссудативного воспаления в зоне повреждения и неравномерностью формирования грануляционной ткани, а также более ранним образованием (уже к 20-му дню) зрелой соединительной ткани.

Молекулярно-биологический анализ

Тканевая гипоксия или ишемия в результате артериальной окклюзии индуцирует активность HIF-1. В свою очередь, он активирует транскрипцию нескольких генов, кодирующих ангиогенные факторы роста и цитокины [фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста плаценты (PGF), фактор роста тромбоцитов В (PDGFB), ангиопоэтин 1 (ANGPT1) и 2 (ANGPT2), фактор стволовых клеток (SCF)], которые, связываясь с родственными рецепторами клеточной поверхности, опосредуют свое биологическое воздействие на эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки сосудов, эндотелиальные клетки-предшественники, мезенхимальные стволовые клетки и другие ангиогенные клетки, происходящие из костно-

го мозга (BMDACs). HIF-1 также опосредует метаболическое перепрограммирование, которое может защитить сердце от повреждений после продолжительной ишемии-реперфузии за счет снижения производства активных форм кислорода [10].

В контрольном инфаркте наблюдалось снижение уровня HIF-1 на 10, 20 и 30-е сутки после моделирования ИМ (рисунок 4, А). Это может свидетельствовать о замедлении репаративных процессов в зоне ишемии на фоне слабовыраженной экссудативной воспалительной реакции и формирования умеренных и выраженных разрастаний грубой рубцовой ткани. В опытной группе на 20-е сутки наблюдалось достоверное увеличение количества HIF-1 после моделирования патологии. Это может говорить о том, что терапия эмпаглифлозином повышает устойчивость миокарда к воздействию гипоксии посредством увеличения количества HIF-1 с последующим восстановлением доставки кислорода к тканям, предотвращением гибели клеток миокарда, приводящей к развитию некротических очагов и фиброза.

Кислородный дефицит означает для дыхательной цепи переноса электронов (ЭТЦ) нехватку как доноров, так и конечного акцептора электронов. Преобладание анаэробного гликолиза и снижение продукции пирувата приводят к ингибированию всех стадий ЦТК, в том числе обеспечивающих субстратами комплексы I и II (окисление сукцината до фумарата и реакции, сопровождающиеся восстановлением НАД). Дефицит акцептора электронов приводит к их утечке по пути следования к терминальному комплексу ЭТЦ, что сопровождается неполным восстановлением кислорода и образованием его активных форм. Изменение активности комплексов I и II ЭТЦ является одним из основных молекулярных механизмов развития гипоксии, а также играет важную роль в формировании клеточного ответа на нее. Эти комплексы поставляют электроны в цикл убихинона относительно независимо друг от друга, однако для эффективного протекания окислительного фосфорилирования и поддержания энергетического баланса в клетке необходима нормальная деятельность их обоих. Функционируя параллельно, они представляют собой первое звено ЭТЦ, и их блокада при гипоксии приводит к нарушению работы всех остальных ее звеньев. Наиболее ранней ответной реакцией на снижение концентрации кислорода в окружающей среде являются изменения активности митохондриальных ферментов не на терминальном, а на субстратном участке дыхательной цепи, т.е. репрограммирование работы ЭТЦ. Происходит обратимое подавление электрон-транспортной функции комплекса I и компенсаторная активация комплекса II. При этом резко возрастают как содержание сукцината в крови и тканях, так и вклад сукцинатоксидазного окисления в общее дыхание, который может достигать 70–80 %.

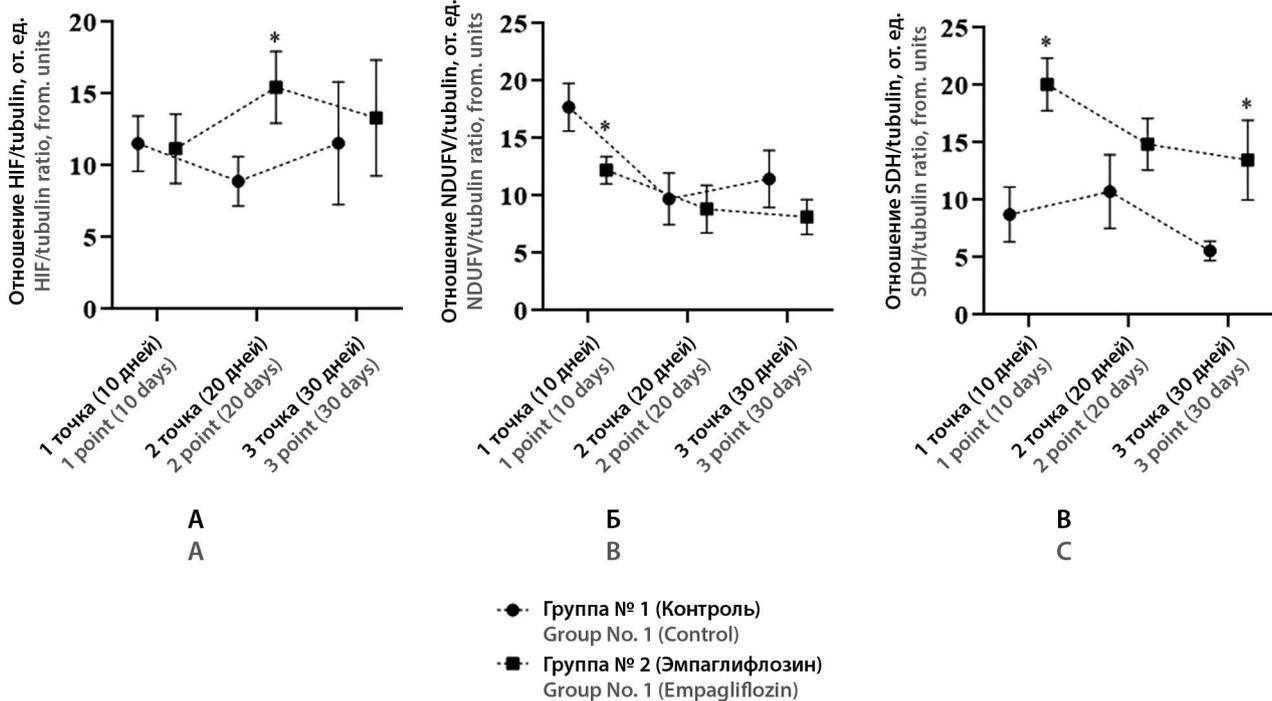


Рисунок 4. Изменение значений показателей молекулярно-биологического исследования (вестерн-блотт-анализа):

А – динамика изменения HIF-1 (фактор, индуцируемый гипоксией); **Б** – динамика изменения показателя NDUFV; **В** – динамика изменения показателя SDHA (сукцинатдегидрогеназы)

Figure 4. Changes in the values of indicators of molecular biological research (Western blot analysis):

A – dynamics of changes in HIF-1 (hypoxia-inducible factor); **B** – dynamics of changes in the NDUFV indicator; **C** – dynamics of changes in the SDHA (succinate dehydrogenase) indicator

НАДН-дегидрогеназа [убихинон] флавопротеин 1 – основная субъединица дыхательной цепи митохондриальной мембраны НАДН-дегидрогеназа (комплекс I), которая катализирует перенос электронов от НАДН через дыхательную цепь, используя убихинон в качестве акцептора электронов. Также играет важную роль в поддержании биоэнергетики клеток, так как является звеном ЭТЦ и участвует в процессе окислительного фосфорилирования.

По результатам проведенного исследования количество NDUFV достоверно снизилось на 10-е сутки в опытной группе в сравнении с группой контроля (рисунок 4, Б). В целом наблюдалось снижение данного показателя на 20 и 30-е сутки как в контрольной группе, так и в группе, которая получала терапию эмпаглифлозином.

Основными причинами снижения активности комплекса I при гипоксии считаются нехватка NADH и диссоциация флавиновой простетической группы НАДН-дегидрогеназной субъединицы. В условиях дефицита кислорода CoQ преимущественно находится в восстановленной форме, что делает невозможной передачу электронов от флавиновой простетической группы и приводит к разрушению ее связи с белком [11, 12]

Сукцинатдегидрогеназа (SDH – II комплекс) – это гетеротетрамерный интегрированный мембранно-протеиновый комплекс, участвующий как в процессе окислительного фосфорилирования, перенося электроны по дыхательной цепи, так и в критических реакциях цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса), катализируя окисление сукцината до фумарата. Комплекс SDH связан с внутренней мембраной митохондрий, имеет сложную структуру и состоит из 4 субъединиц, включая 2 гидрофильные субъединицы – SDHA и SDHB, которые вместе образуют каталитический центр энзима, и 2 гидрофобные субъединицы – SDHC и SDHD. Основная функция SDHA заключается в участии в окислительном фосфорилировании: превращение сукцината в фумарат преобразует FAD в FADH₂. Митохондрии оказывают прямое и косвенное влияние на физиологию кардиомиоцитов, регулируя биоэнергетику (кардиомиоциты имеют высокую потребность в синтезе АТФ и потреблении кислорода), окислительно-восстановительный сигнал (физиологический ответ), окислительный стресс (патологический ответ), метаболизм кальция, сократительные свойства, некроз и апоптоз. Следовательно, поддержание сердечной митохондриальной функции и целостности имеет решающее значение для здоровья человека.

Накопления сукцината (промежуточного звена Кребса) во время ишемии сердца достаточно, чтобы вызвать массивную генерацию АФК за счет индукции обратного транспорта электронов в ЭТЦ во время реперфузии [13, 14].

По результатам исследования в группе контроля показатель SDHA незначительно увеличивался на 20-е сутки по сравнению с 10-ми сутками, а к 30-му дню после моделирования патологии снижался, что может свидетельствовать о нарушении протекания окислительного фосфорилирования в митохондриях кардиомиоцитов за счет снижения активности работы ЭТЦ. Недостаток АТФ и накопление АФК будут способствовать повреждению клеток миокарда в условиях гипоксии. В опытной группе наблюдалось достоверное увеличение SDHA на 10 и 30-е сутки после моделирования ИМ. Это может указывать на ингибирование процессов окислительного стресса, восстановление работы ЭТЦ и биоэнергетики в кардиомиоцитах после ИМ на фоне терапии эмпаглифлозином (рисунок 4, В).

Экспериментально показано, что активность комплекса II при гипоксии снижается медленнее и в меньшей степени, нежели комплекса I. Это объясняется тем, что входящий в состав СДГ в качестве простетической группы ФАД в отличие от ФМН комплекса I в условиях умеренного дефицита кислорода не диссоциирует и продолжает выполнять свою электронтранспортную функцию. Временная, обратимая активация СДГ при гипоксии является экстренной компенсаторной реакцией, направленной на поддержание функционирования ЭТЦ в условиях блокады комплекса I. Она обеспечивает быструю энергопродукцию с целью немедленной компенсации происходящих изменений, а также стабилизацию транскрипционного фактора HIF и запуск процессов долговременной адаптации к гипоксии [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение эмпаглифлозина в раннем периоде после моделирования инфаркта миокарда у крыс способствовало улучшению эхокардиографических показателей относительно животных группы контрольного инфаркта. Наличие значимых отличий по показателям фракции выброса и фракции укорочения позволяют говорить об увеличении работы сердечной мышцы у животных, получавших лечение.

Основываясь на данных гистологической картины, у животных, которые получали лечение препаратом, можно выявить тенденцию к более раннему образованию зрелой соединительной ткани в зоне поражения миокарда, а также умеренность протекания процесса экссудативного воспаления по сравнению с данными животных контрольного инфаркта.

Результаты молекулярно-биологического анализа позволяют предположить, что одним из возможных механизмов, за счет которого эмпаглифлозин спо-

собствует увеличению устойчивости сердечной мышцы к воздействию гипоксии, является рост количества HIF-1. Увеличение показателя SDHA у данных животных также оказывает свою положительную роль в поддержании митохондриальной функции миокарда при наличии повреждения.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно заявить, что ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2 типа эмпаглифлозин оказывает значительную положительную роль в процессах раннего восстановления после перенесенного инфаркта миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шальнова С. А., Драпкина О. М., Куценко В. А., Капустина А. В., Муромцева Г. А., Яровая Е. Б., Баланова Ю. А., Евстифеева С. Е., Имаева А. Э., Шляхто Е. В., Бойцов С. А., Астахова З. Т., Барбараш О. Л., Белова О. А., Гринштейн Ю. И., Ефанов А. Ю., Карлачикова О. Н., Кулакова Н. В., Недогода С. В., Ротарь О. П., Трубачева И. А. Черных от имени участников исследования ЭССЕ-РФ Т.М. Инфаркт миокарда в популяции некоторых регионов России и его прогностическое значение. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(6):4952. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4952.
2. Krasnova M., Kulikov A., Okovityi S., Ivkin D., Karpov A., Kaschina E., Smirnov A. Comparative efficacy of empagliflozin and drugs of baseline therapy in post-infarct heart failure in normoglycemic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020;393(9):1649–1658. DOI: 10.1007/s00210-020-01873-7.
3. Damman K., Beusekamp J. C., Boorsma E. M., Swart H. P., Smilde T. D. J., Elvan A., van Eck J. W. M., Heerspink H. J. L., Voors A. A. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre pilot study on the effects of empagliflozin on clinical outcomes in patients with acute decompensated heart failure (EMPA-RESPONSE-AHF). *Eur. J. Heart Fail*. 2020;22:713–722.
4. Janbandhu V., Tallapragada V., Patrick R., Li Y., Abeygunawardena D., Humphreys D. T., Martin E. M. M. A., Ward A. O., Contreras O., Farbehi N., Yao E., Du J., Dunwoodie S. L., Bursac N., Harvey R. P. Hif-1a suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction. *Cell Stem Cell*. 2022;29(2):281–297. DOI: 10.1016/j.stem.2021.10.009.
5. Qi B., Song L., Hu L., Guo D., Ren G., Peng T., Liu M., Fang Y., Li C., Zhang M., Li Y. Cardiac-specific overexpression of Ndufs1 ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction by alleviating mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2022;54:946–960. DOI: 10.1038/s12276-022-00800-5.
6. Wang X., Zhang X., Cao K., Zeng M., Fu X., Zheng A., Zhang F., Gao F., Zou X., Li H., Li M., Lv W., Xu J., Long J., Zang W., Chen J., Gao F., Ding J., Liu J., Feng Z. Cardiac disruption of SDHAF4-mediated mitochondrial complex II assembly promotes dilated cardiomyopathy. *Nature Communications*. 2022;13(1):3947.
7. Казаченко А. А., Оковитый С. В., Куликов А. Н., Ивкин Д. Ю., Шустов Е. Б. Экспериментальное моделирование хронической сердечной недостаточности. *Биомедицина*. 2013;1(3):41–48.
8. Куликов А. Н., Оковитый С. В., Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Лисицкий Д. С., Любишин М. М. Эффекты эмпаглифлозина при экспериментальной модели хронической сердечной недостаточности у крыс с нормогликемией. *Журнал Сердечная Недостаточность*. 2016;17(6):454–460.
9. Карпов А. А., Ивкин Д. Ю., Драчева А. В., Питухина Н. Н., Успенская Ю. К., Ваулина Д. Д., Усков И. С., Эйвазова Ш. Д., Минасян С. М., Власов Т. Д., Бурякина А. В., Галагудза М. М. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки. *Биомедицина*. 2014;3:32–48.

- Semenza G. L. Hypoxia-inducible factors: roles in cardiovascular disease progression, prevention, and treatment. *Cardiovascular Research*. 2023;119(2):371–380. DOI: 10.1093/cvr/cvac089.
- Приходько В. А., Селизарова Н. О., Оковитый С. В. Молекулярные механизмы развития гипоксии и адаптации к ней. Часть I. *Архив патологии*. 2021;83(2):52–61. DOI: 10.17116/ptol20218302152.
- Приходько В. А., Селизарова Н. О., Оковитый С. В. Молекулярные механизмы развития гипоксии и адаптации к ней. Часть II. *Архив патологии*. 2021;83(3):6269.
- Zhang Y., Liu D., Hu H., Zhang P., Xie R., Cui W. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;120:109464. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109464.
- Kiyuna L. A., Albuquerque R. P. E., Chen C.-H., Mochly-Rosen D., Ferreira J. C. B. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. *Free radical biology & medicine*. 2018;129:155–168. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.019.
- del of post-infarct heart failure by left coronary artery occlusion: technical aspects, functional and morphological assessment. *Journal Biomed*. 2014;1(3):32–48. (In Russ.)
- Semenza G. L. Hypoxia-inducible factors: roles in cardiovascular disease progression, prevention, and treatment. *Cardiovascular Research*. 2023;119(2):371–380. DOI: 10.1093/cvr/cvac089.
- Prikhodko V. A., Selizarova N. O., Okovityi S. V. Molecular mechanisms for hypoxia development and adaptation to it. Part I. *Архив Патологии*. 2021;83(2):5261. (In Russ.) DOI: 10.17116/ptol20218302152.
- Prikhodko V. A., Selizarova N. O., Okovityi S. V. Molecular mechanisms of hypoxia and adaptation to it. Part II. *Архив Патологии*. 2021;83(3):6269. (In Russ.)
- Zhang Y., Liu D., Hu H., Zhang P., Xie R., Cui W. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;120:109464. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109464.
- Kiyuna L. A., Albuquerque R. P. E., Chen C.-H., Mochly-Rosen D., Ferreira J. C. B. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. *Free radical biology & medicine*. 2018;129:155–168. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.019.

REFERENCES

- Shalnova S. A., Drapkina O. M., Kutsenko V. A., Kapustina A. V., Muromtseva G. A., Yarovaya E. B., Balanova Yu. A., Evstifeeva S. E., Imaeva A. E., Shlyakhto E. V., Boytsov S. A., Astakhova Z. T., Barbarash O. L., Belova O. A., Grinshtein Yu. I., Efanov A. Yu., Kalachikova O. N., Kulakova N. V., Nedogoda S. V., Rotar O. P., Trubacheva I. A., Chernykh on behalf of the ESSE-RF study participants. T.M. Myocardial infarction in the population of some Russian regions and its prognostic value. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(6):4952. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4952.
- Krasnova M., Kulikov A., Okovityi S., Ivkin D., Karpov A., Kaschina E., Smirnov A. Comparative efficacy of empagliflozin and drugs of baseline therapy in post-infarct heart failure in normoglycemic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020;393(9):1649–1658. DOI: 10.1007/s00210-020-01873-7.
- Damman K., Beusekamp J. C., Boersma E. M., Swart H. P., Smilde T. D. J., Elvan A., van Eck J. W. M., Heerspink H. J. L., Voors A. A. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre pilot study on the effects of empagliflozin on clinical outcomes in patients with acute decompensated heart failure (EMPA-RESPONSE-AHF). *Eur. J. Heart Fail*. 2020;22:713–722.
- Janbandhu V., Tallapragada V., Patrick R., Li Y., Abeygunawardena D., Humphreys D. T., Martin E. M. M. A., Ward A. O., Contreras O., Farbehi N., Yao E., Du J., Dunwoodie S. L., Bursac N., Harvey R. P. Hif-1 α suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction. *Cell Stem Cell*. 2022;29(2):281–297. DOI: 10.1016/j.stem.2021.10.009.
- Qi B., Song L., Hu L., Guo D., Ren G., Peng T., Liu M., Fang Y., Li C., Zhang M., Li Y. Cardiac-specific overexpression of Ndufs1 ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction by alleviating mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2022;54:946–960. DOI: 10.1038/s12276-022-00800-5.
- Wang X., Zhang X., Cao K., Zeng M., Fu X., Zheng A., Zhang F., Gao F., Zou X., Li H., Li M., Lv W., Xu J., Long J., Zang W., Chen J., Gao F., Ding J., Liu J., Feng Z. Cardiac disruption of SDHAF4-mediated mitochondrial complex II assembly promotes dilated cardiomyopathy. *Nature Communications*. 2022;13(1):3947.
- Kazachenko A. A., Okovityi S. V., Kulikov A. N., Ivkin D. Yu., Shustov E. B. Experimental modeling of chronic warm insufficiency. *Biomeditsina Biomedicine*. 2013;1(3):41–48. (In Russ.)
- Kulikov A. N., Okovityi S. V., Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Lisitsky D. S., Lyubishin M. M. Effects of empagliflozin in an experimental model of chronic heart failure in normoglycemic rats. *Heart Failure*. 2016;6(6):454–460. (In Russ.)
- Karpov A. A., Ivkin D. Yu., Dracheva A. V., Pitukhina N. N., Uspenskaya Yu. K., Vaulina D. D., Uskov I. S., Eyvazova S. D., Mina-syan S. M., Vlasov T. D., Buryakina A. V., Galagudza M. M. Rat mo-

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1574>
УДК 61:615.1



Оригинальная статья / Research article

Влияние параметров технологического процесса на микрокапсулирование субстанций с неудовлетворительными технологическими свойствами

И. Д. Касымов✉, А. Л. Марченко, А. В. Басевич, М. Е. Валеева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Касымов Илья Данисович. E-mail: kasymov.ilya@pharminnotech.com

ORCID: И. Д. Касымов – <https://orcid.org/0000-0001-6954-3810>; А. Л. Марченко – <https://orcid.org/0000-0002-8049-6207>; А. В. Басевич – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>; М. Е. Валеева – <https://orcid.org/0009-0002-8775-6144>.

Статья поступила: 18.09.2023 Статья принята в печать: 10.11.2023 Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. В статье представлены результаты исследования влияния критических параметров микрокапсулирования на свойства микрокапсул, полученных методом диффузии эмульсионного растворителя. Полученные результаты позволили установить удовлетворительные параметры ведения процесса, такие как скорость перемешивания, тип перемешивающего устройства, объем водной фазы, концентрация полимера в масляной фазе, соотношение «лекарственное вещество (ЛВ) : полимер», температурные условия.

Цель. Целью работы стало изучение влияния параметров ведения процесса микрокапсулирования на свойства микрокапсул, полученных методом диффузии эмульсионного растворителя.

Материалы и методы. В качестве модельной субстанции для микрокапсулирования был использован ибупрофен. Полимером-носителем был выбран Eudragit® RS 100. Для оценки формы и характера поверхности микрокапсул использовали микроскоп Levenhuk D80L LCD, определение размеров микрокапсул проводили с помощью лазерного анализатора частиц «Микросайзер 201С» (ООО «ВА Инсталт», Россия).

Результаты и обсуждение. Изучено влияние параметров ведения процесса микрокапсулирования на свойства микрокапсул ибупрофена, полученных методом диффузии эмульсионного растворителя, как модельной субстанции. Установлены параметры технологии, определены зависимости между критическими параметрами микрокапсулирования и свойствами образующихся микрокапсул.

Заключение. В ходе выполнения исследования предложен и обоснован выбор технологических параметров микрокапсулирования методом диффузии эмульсионного растворителя. Полученные экспериментальные данные на примере ибупрофена как модельной субстанции будут положены в основу эксперимента при получении микрокапсул на основе других АФС, растворимых в органических растворителях.

Ключевые слова: микрокапсулирование, метод диффузии эмульсионного растворителя, ибупрофен, Eudragit

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

Вклад авторов. И. Д. Касымов, М. Е. Валеева – проведение экспериментов. И. Д. Касымов, А. В. Басевич, А. Л. Марченко, М. Е. Валеева – обработка полученных данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

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

Для цитирования: Касымов И. Д., Марченко А. Л., Басевич А. В., Валеева М. Е. Влияние параметров технологического процесса на микрокапсулирование субстанций с неудовлетворительными технологическими свойствами. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(4):146–154. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1574>

Influence of Technological Process Parameters on Microcapsulation of Substances with Unsatisfactory Technological Properties

Ilya D. Kasymov✉, Alexei L. Marchenko, Anna V. Basevich, Mariya E. Valeeva

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

✉ Corresponding author: Ilya D. Kasymov. E-mail: kasymov.ilya@pharminnotech.com

ORCID: Ilya D. Kasymov – <https://orcid.org/0000-0001-6954-3810>; Alexei L. Marchenko – <https://orcid.org/0000-0002-8049-6207>; Anna V. Basevich – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>; Mariya E. Valeeva – <https://orcid.org/0009-0002-8775-6144>.

Received: 18.09.2023 Revised: 10.11.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. The article presents the results of a study of the influence of parameters of microcapsulation on the properties of microcapsules obtained by diffusion of an emulsion solvent. The results obtained made it possible to establish optimal parameters of the process, such as the mixing speed, the type of mixing device, the volume of the aqueous phase, the concentration of the polymer in the oil phase, the ratio of medicinal substance : polymer, temperature conditions.

© Касымов И. Д., Марченко А. Л., Басевич А. В., Валеева М. Е., 2023

© Kasymov I. D., Marchenko A. L., Basevich A. V., Valeeva M. E., 2023

Aim. The aim of the work was to study the influence of the parameters of the microcapsulation process on the properties of microcapsules obtained by diffusion of an emulsion solvent.

Materials and methods. Ibuprofen was used as a model substance for microcapsulation. Eudragit® RS 100 was chosen as the carrier polymer. To assess the shape and nature of the microcapsule surface, a microscope Levenhuk D80L LCD was used, and the size of microcapsules was determined using a laser particle analyzer Microsizer 201C (VA Instalt, Russia).

Results and discussion. The influence of the parameters of the microcapsulation process on the properties of ibuprofen microcapsules as a model substance obtained by diffusion of an emulsion solvent has been studied. The optimal parameters of the technology are established, the dependences between the critical parameters of microcapsulation and the properties of the resulting microcapsules are determined.

Conclusion. In the course of the study, the choice of technological parameters of microcapsulation by diffusion of an emulsion solvent was proposed and justified. The experimental data obtained on the example of ibuprofen as a model substance will be used as the basis of the experiment when preparing microcapsules based on other substances soluble in organic solvents.

Keywords: microcapsulation, emulsion solvent diffusion method, ibuprofen, Eudragit

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. Ilya D. Kasymov, Mariya E. Valeeva – conducting experiments. Ilya D. Kasymov, Mariya E. Valeeva, Anna V. Basevich, Alexei L. Marchenko – processing of the received data. All the authors participated 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: Kasymov I. D., Marchenko A. L., Basevich A. V., Valeeva M. E. Influence of technological process parameters on microcapsulation of substances with unsatisfactory technological properties. *Drug development & registration*. 2023;12(4):146–154. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1574>

ВВЕДЕНИЕ

Модификация высвобождения лекарственного вещества – это перспективное направление в фармации. Среди различных подходов к модификации высвобождения отдельно можно выделить микрокапсулирование. Микрокапсулирование – это процесс заключения мелких частичек лекарственного вещества в тонкую оболочку пленкообразующего материала с целью придания ему требуемых свойств. Среди задач, которые позволяет решить микрокапсулирование, выделяют следующие: регулирование профиля высвобождения, локализация высвобождения, защита ЛВ от воздействия окружающей среды и увеличение срока хранения, снижение локального раздражающего действия ЛВ, маскировка органолептических свойств и др. [1–5].

Выбор метода микрокапсулирования во многом зависит от физико-химических свойств капсулируемого вещества. Метод диффузии эмульсионного растворителя применим в ситуациях, когда ЛВ нерастворимо в воде и растворимо в органических растворителях. Данный метод отличается высоким коэффициентом захвата ЛВ и относительной простотой исполнения оборудования. К его недостаткам можно отнести большое количество факторов процесса, значительно влияющих на качество микрокапсул, и, как следствие, сложность масштабирования [6–11].

Таким образом, целью настоящей работы стало изучение влияния параметров ведения процесса микрокапсулирования на свойства микрокапсул, полученных методом диффузии эмульсионного растворителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе разработки исследователи часто сталкиваются с проблемой высоких затрат, так как новые оригинальные исследуемые субстанции имеют высокую стоимость. Поэтому на начальных этапах разработки имеет смысл отрабатывать технологии на модельной смеси. Такая смесь или субстанция должна быть максимально приближена к оригинальной по своим физико-химическим свойствам. Метод диффузии эмульсионного растворителя был выбран для микрокапсулирования этилтиобензмидазола фумарата (ЭТБИФ). Субстанция ЭТБИФ, в свою очередь, имеет схожие физико-химические и технологические свойства с субстанцией ибупрофена, поэтому с целью уменьшения расхода ЭТБИФ в качестве модельной субстанции в данной работе был использован ибупрофен.

В качестве полимера-носителя был использован Eudragit® RS100 (Evonik Röhm GmbH, Германия) – сополимер этилакрилата, метилметакрилата и эфира

метакриловой кислоты. Также в работе были использованы спирт этиловый 96%-й и пищевой эмульгатор на основе высокомолекулярных спиртов для стабилизации образующейся в процессе микрокапсулирования эмульсии.

Микрокапсулы получали следующим образом. Готовили масляную фазу – точные навески ибупрофена и полимера растворяли в 96%-м спирте – и водную – точную навеску эмульгатора растворяли в воде. При перемешивании вносили масляную фазу в водную с помощью дозирующего устройства за определенный промежуток времени с определенной скоростью, перемешивание осуществляли в течение 30 минут. Далее отделяли полученные микрокапсулы декантацией и фильтрованием, промывали их водой и сушили в течение 24 часов на открытом воздухе при температуре 20–22 °С [6–11].

Оценку формы и характера поверхности микрокапсул проводили с помощью микроскопии (Levenhuk D80L LCD), определение размеров микрокапсул выполняли на лазерном анализаторе «Микросайзер 201С» (ООО «ВА Инсталт», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение критических параметров процесса микрокапсулирования

На основании литературных данных, а также с учетом особенностей процесса микрокапсулирования методом диффузии эмульсионного растворителя [12–17] к критическим параметрам были отнесены: тип перемешивающего устройства, скорость перемешивания, соотношение «ЛВ:полимер» в масляной фазе, объем растворителя в масляной фазе, объем водной фазы, температура смеси. Значения параметров, рассмотренные в работе, приведены в таблице 1. Изучение параметров ведения данного процесса вели поэтапно: для нахождения зависимостей и выбора удовлетворительных значений изменяли значения одного из рассматриваемых параметров при постоянных значениях всех остальных.

Оценка влияния параметров процесса на свойства микрокапсул

Скорость и тип перемешивающего устройства. Процесс образования микрокапсул связан с диффузией органического растворителя в водную фазу из частиц масляной фазы. При введении масляной фазы необходимо за короткий промежуток времени получить эмульсию, на что в значительной мере влияют условия перемешивания системы. Результаты исследования влияния типа и скорости работы перемешивающего устройства на характеристики микрокапсул представлены в таблицах 2 и 3. Качество микрокапсул оценивали по их форме и размеру.

Таблица 1. Критические параметры и их значения

Table 1. Critical parameters and their values

Параметр Parameter	Значения Values	
Тип перемешивающего устройства Type of stirring device	3-лопастная мешалка 3-paddle stirrer	
	4-лопастная мешалка 4-paddle stirrer	
Скорость перемешивания, об/мин Mixing speed, rpm	200	
	400	
	600	
Объем водной фазы, мл Volume of the water phase, ml	100	
	300	
	500	
Объем этанола, мл / Концентрация полимера, % Volume of ethanol, ml / Polymer concentration, %	Объем этанола Volume of ethanol	Концентрация полимера Polymer concentration
		10
	15	16,7 %
	20	12,5 %
Соотношение «ЛВ : полимер» Substance : Polymer ratio	1 : 2	
	1 : 1	
	2 : 1	
	3 : 1	
Температура процесса, °С Process temperature	+5	
	+20	
	+60	

По данным из таблиц 2 и 3 установлено, что интенсивное перемешивание способствует уменьшению размера частиц. При этом, несмотря на то, что на отдельных фотографиях внешний вид капсул у 4-лопастной мешалки лучше, в общей массе эти микрокапсулы содержали большое количество пылевой фракции и конгломераты. Это может быть связано с излишне высокой интенсивностью перемешивания. Капсулы, полученные с использованием 3-лопастной мешалки имели более однородный фракционный состав. По результатам проведенных экспериментов целесообразным оказалось использование 3-лопастной мешалки при скорости перемешивания 400 об/мин.

Объем водной фазы. На основании проведенных опытов был сделан вывод о том, что объем водной фазы значительно влияет на показатели качества микрокапсул. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 4.

Эффективность инкапсуляции и сферичность частиц увеличиваются по мере увеличения объема водной фазы. Вероятно, больший объем водной фазы за счет большего разбавления растворителя ускоряет диффузию органического растворителя, приводит к ускоренному затвердеванию микрочастиц и препятствует их слипанию.

Таблица 2. Результаты исследования 3-лопастной мешалки (увел. x40)

Table 2. Results of the study of a 3-blade mixer (increase x40)

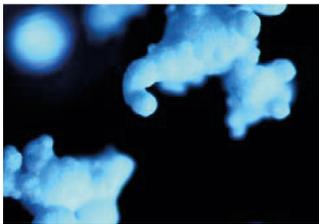
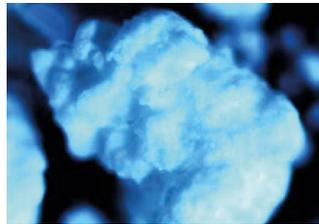
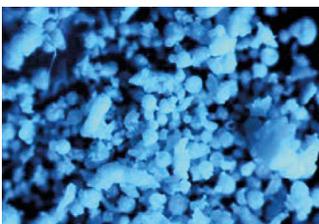
Тип мешалки Type of stirring device	3-лопастная 3-paddle stirrer		
Скорость работы, об/мин Mixing speed, rpm	200 ± 5	400 ± 5	600 ± 5
Внешний вид Appearance			
Описание микрокапсул Characteristic of microcapsules	Частицы неправильной формы с неровной поверхностью, фракционный состав разнороден (0.5–5 мм), сыпучесть удовлетворительная Irregularly shaped particles with an uneven surface, the fractional composition is heterogeneous (0.5 mm – 5 mm), the flowability is satisfactory	Маленькие частицы с гладкой поверхностью, плотные, сыпучие, однородные по фракционному составу. Форма частиц преимущественно неправильно-сферическая Small particles with a smooth surface, dense, loose, homogeneous in fractional composition. The shape of the particles is predominantly irregular-spherical	Частицы имеют вид слипшихся крупных агломератов. Форма неправильная, края неровные, размеры сильно разнятся The particles have the appearance of large agglomerates stuck together. The shape is irregular, the edges are uneven, the sizes vary greatly

Таблица 3. Результаты исследования 4-лопастной мешалки (увеличение x40)

Table 3. Results of the study of a 4-blade mixer (increase x40)

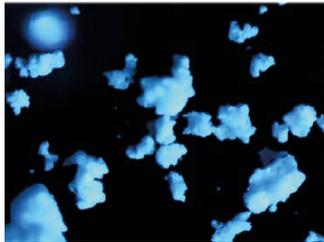
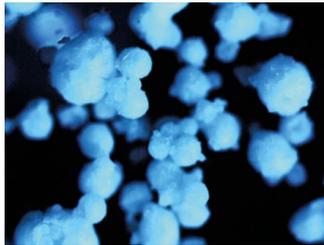
Тип мешалки Type of stirring device	4-лопастная 4-paddle stirrer		
Скорость работы, об/мин Mixing speed, rpm	200 ± 5	400 ± 5	600 ± 5
Внешний вид Appearance			
Описание микрокапсул Characteristic of microcapsules	Частицы сферической формы с гладкой поверхностью, плотные, сыпучие, однородные по фракционному составу. Преобладающая фракция – пылевая Spherical particles with a smooth surface, dense, loose, homogeneous in fractional composition. The predominant fraction is dust	Частицы разнородны по фракционному составу и форме, сыпучесть удовлетворительная The particles are heterogeneous in fractional composition and shape, the flowability is satisfactory	Состав неоднородный, основная часть – пылевая фракция. Сыпучесть неудовлетворительная, при вращении емкости для хранения визуально заметно залипание порошка The composition is heterogeneous, the main part of which is the dust fraction. The flowability is unsatisfactory, when the storage container rotates, the sticking of the powder is visually noticeable

Объем этанола в масляной фазе. Далее изучали влияние объема растворителя (спирт этиловый 96%-й), определяющего концентрацию полимера-носителя в масляной фазе. Эксперименты проводились с объемами этанола 10 мл, 15 мл и 20 мл, задающими концентрацию полимера 25,0, 16,7 и 12,5 % соот-

ветственно. Значения остальных параметров сохранялись постоянными. На основании проведенных опытов, результаты которых представлены в таблице 5, был сделан вывод о том, что объем этанола в масляной фазе значительно влияет на показатели качества микрокапсул.

Таблица 4. Результаты исследования влияния объема водной фазы (увел. х40)

Table 4. Results of the study of the effect of the volume of the aqueous phase (increase x40)

Объем водной фазы, мл Volume of the aqueous phase, ml	Описание микрокапсул Characteristic of microcapsules	Внешний вид Appearance
100 ± 1	Частицы разнородны по фракционному составу и форме, их поверхность неровная The particles are heterogeneous in fractional composition and shape, their surface is uneven	
300 ± 1	Частицы разнородны по фракционному составу, сыпучесть удовлетворительная. Форма частиц преимущественно сферическая The particles are heterogeneous in fractional composition, the flowability is satisfactory. The shape of the particles is predominantly spherical	
500 ± 1	Маленькие частицы с гладкой поверхностью, плотные, сыпучие, однородные по фракционному составу. Форма частиц преимущественно сферическая Small particles with a smooth surface, dense, loose, homogeneous in fractional composition. The shape of the particles is predominantly spherical	

С уменьшением концентрации полимера и увеличением объема растворителя наблюдали уменьшение размера микрокапсул. Приемлемый размер и однородность частиц по размеру наблюдали при наименьшей концентрации полимера. Таким образом, по результатам исследования влияния объема этанола в масляной фазе на характеристики микрокапсул можно рекомендовать объем этанола 20 мл, соответствующий концентрации полимера 12,5 %.

Соотношение «ЛВ: полимер». Следующий этап исследования – установление соотношения «ЛВ: полимер-носитель» в масляной фазе. От этого параметра, помимо качества образующихся капсул, зависит то, каким будет их конечный состав. Результаты экспериментов представлены в таблице 6.

Соотношения 1:2 и 1:1 не позволили получить микрокапсулы. В соотношениях 2:1 и 3:1 наблюдали образование плотных, сыпучих, однородных по фракционному составу частиц сферической формы. Однако при соотношении 3:1 микрокапсулы имеют дозировку ЛВ на 30 % выше, а потому выбор был сделан в их пользу.

Температура. Заключительный этап исследования – установление влияния температурного режима на протекание процесса и качество получаемых микрокапсул. Результаты экспериментов представлены в таблице 7.

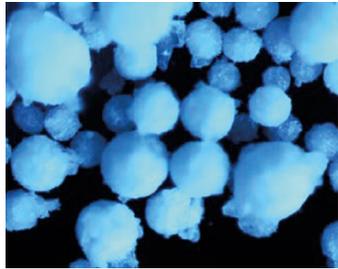
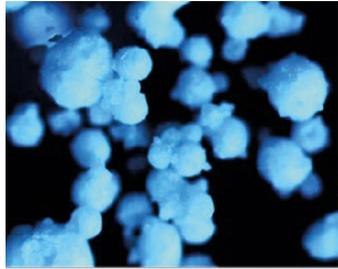
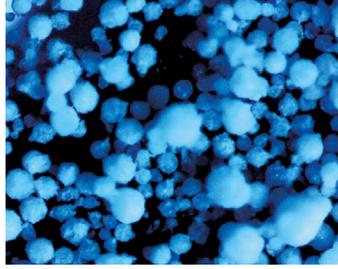
При низкой температуре микрокапсулы имели неоднородный внешний вид и фракционный состав, а при повышенной температуре микрокапсулы не образовывались. При этом из результатов, представленных в таблице 6, можно сделать вывод, что комнатную температуру (18–22 °С) следует считать оптимальной, так как форма полученных микрокапсул является удовлетворительной.

Анализ размера микрокапсул и распределения их по размерам

Далее в ходе исследования была проведена наработка шести опытных серий микрокапсул ибупрофена согласно установленным параметрам микрокапсулирования. Анализ воспроизводимости разработанной технологии проводился по размеру и серийному распределению микрокапсул по размерам,

Таблица 5. Результаты исследования объема растворителя в масляной фазе (увел. х40)

Table 5. Results of the study of the solvent volume in the oil phase (magnification x 40)

Объем этанола, мл / Концентрация полимера, % Volume of ethanol, ml / Polymer concentration	Описание микрокапсул Characteristic of microcapsules	Внешний вид Appearance
10,0 ± 0,5 / 25	Маленькие частицы с гладкой поверхностью, плотные, сыпучие, однородные по фракционному составу. Форма частиц преимущественно сферическая. Различие наблюдается в размере Small particles with a smooth surface, dense, loose, homogeneous in fractional composition. The shape of the particles is predominantly spherical. The difference is observed in the size	
15 ± 5 / 16,7		
20 ± 5 / 12,5		

так как данные параметры являются неизменными и поддаются точному измерению.

Определение размеров пробы микрокапсул и распределения их по размерам проводилось с помощью лазерного анализатора частиц «Микросайзер 201С». Полученные результаты представляют собой зависимость массовой (весовой) доли частиц Р (%) от их диаметра D (мкм). Погрешность измерения, согласно характеристикам прибора, не превышает 5 %.

Результаты наложения графических зависимостей 6 проб, отобранных из разных, последовательно воспроизведенных серий одного состава по разработанной технологии при установленных параметрах ведения процесса, представлены на рисунке 1.

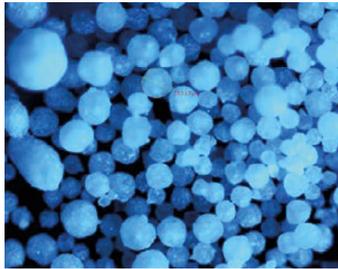
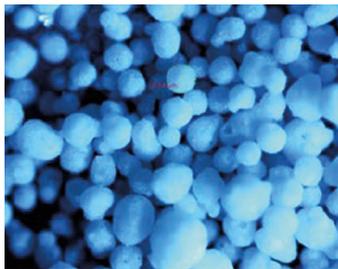
На рисунке 1 видно, что графики распределения частиц по размерам во всех шести опытных сериях при наложении совпадают, поэтому процесс производства микрокапсул на основе субстанции ибупрофена можно считать воспроизводимым. Таким образом, подтверждается однородность серий микрокапсул, полученных при установленных параметрах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Обоснован выбор метода получения микрокапсул с субстанцией, имеющей определенные физико-химические свойства, методом диффузии эмульсионного растворителя с применением полимера-носителя Eudragit® RS100.
2. В результате выполнения исследования на примере субстанции ибупрофена было изучено влияние параметров ведения процесса микрокапсулирования на свойства микрокапсул, полученных методом диффузии эмульсионного растворителя.
3. На основании полученных результатов были установлены параметры ведения процесса микрокапсулирования: трехлопастная мешалка, скорость перемешивания – 400 об/мин, объем водной фазы – 500 мл, объем спирта в масляной фазе – 20 мл, соотношение «ЛП:полимер» 3:1, комнатная температура (18–22 °С).
4. Была подтверждена воспроизводимость процесса получения микрокапсул на основе сравнения размеров частиц шести опытных серий микрокапсул ибупрофена.

Таблица 6. Результаты исследования соотношения «ЛВ : полимер» (увел. х40)

Table 6. Results of the Substance : Polymer ratio study (magnification x 40)

Соотношение «ЛВ : полимер» Substance : Polymer ratio	Описание микрокапсул Characteristic of microcapsules	Внешний вид Appearance
1 : 2	Микрокапсулы не образовались. Частицы имеют вид слипшихся крупных агломератов. Форма неправильная, края неровные Microcapsules have not formed. The particles have the appearance of large agglomerates stuck together. The shape is irregular, the edges are uneven	–
1 : 1	Микрокапсулы не образовались. Частицы имеют вид слипшихся крупных агломератов. Форма неправильная, уплощенная, края неровные Microcapsules have not formed. The particles have the appearance of large agglomerates stuck together. The shape is irregular, flattened, the edges are uneven	–
2 : 1	Маленькие частицы с гладкой поверхностью, плотные, сыпучие, однородные по фракционному составу. Форма частиц преимущественно сферическая Small particles with a smooth surface, dense, loose, homogeneous in fractional composition. The shape of the particles is predominantly spherical	
3 : 1	Маленькие частицы с гладкой поверхностью, плотные, сыпучие, однородные по фракционному составу. Форма частиц преимущественно сферическая Small particles with a smooth surface, dense, loose, homogeneous in fractional composition. The shape of the particles is predominantly spherical	

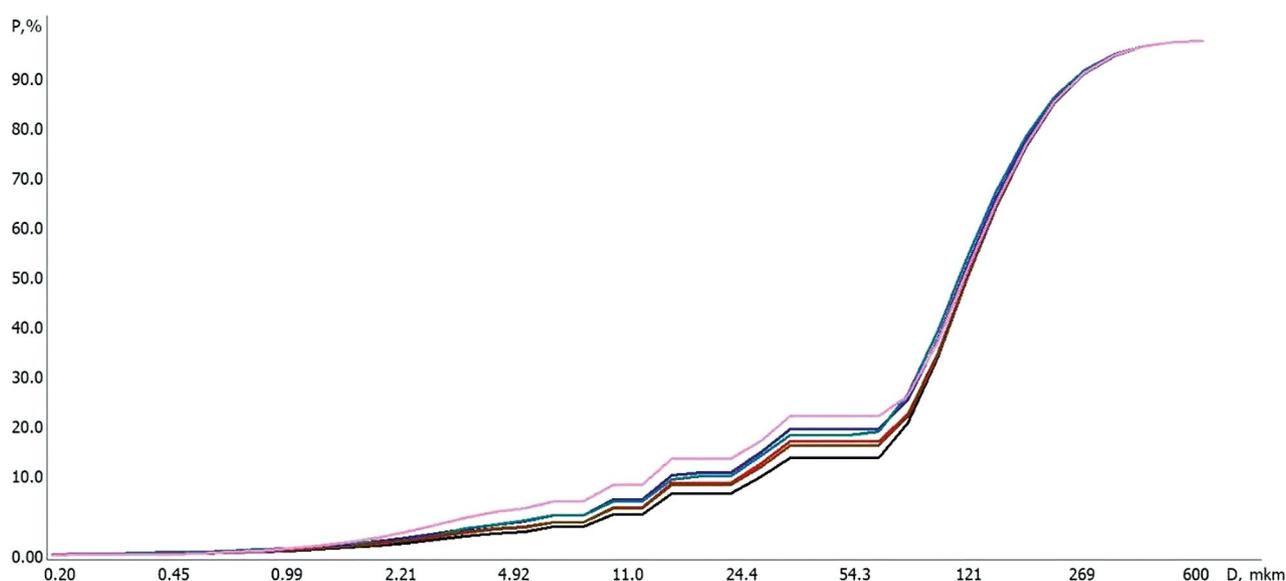
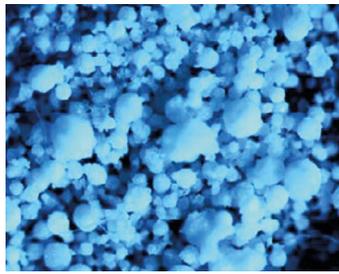
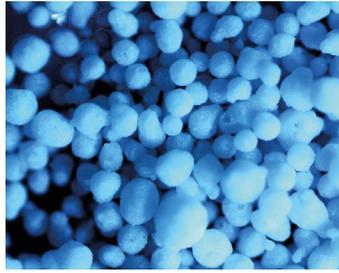


Рисунок 1. Графические зависимости массовых (весовых) долей частиц от их диаметров в 6 образцах разных серий в дифференциальном виде

Figure 1. Graphical dependences of the mass (weight) fractions of particles on their diameters in 6 samples of different series in differential form

Таблица 7. Исследование влияния температуры (увел. х40)

Table 7. Study of the influence of temperature (magnification x40)

Температура, °C Temperature, °C	Описание микрокапсул Characteristic of microcapsules	Внешний вид Appearance
+5 ± 2	<p>Маленькие частицы с неровной поверхностью, плотные, сыпучие, разнородные по фракционному составу. Форма частиц преимущественно сферическая</p> <p>Small particles with an uneven surface, dense, loose, heterogeneous in fractional composition. The shape of the particles is predominantly spherical</p>	
+20 ± 2	<p>Маленькие частицы с гладкой поверхностью, плотные, сыпучие, однородные по фракционному составу. Форма частиц преимущественно сферическая</p> <p>Small particles with a smooth surface, dense, loose, homogeneous in fractional composition. The shape of the particles is predominantly spherical</p>	
+60 ± 2	<p>Размер полученных агломератов (до 10 мм) не позволяет отнести их к микрокапсулам. Форма агломератов неправильная, поверхность неровная.</p> <p>The size of the resulting agglomerates (up to 10 mm) does not allow them to be attributed to microcapsules. The shape of the agglomerates is irregular, the surface is uneven.</p>	-

5. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для получения микрокапсул с другими субстанциями со схожими физико-химическими свойствами, в частности для микрокапсулирования этилтиобензимидазола fumarата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хишова О.М., Рафалович Е.О. Современные подходы в создании лекарственных средств с модифицированным высвобождением. *Реценз.* 2018;21(3):338–350.
2. Lengyel M., Kállai-Szabó N., Antal V., Laki A.J., Antal I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica*. 2019;87(3):20. DOI: 10.3390/scipharm87030020.
3. Paroma A., Md Shehan H., Dipankar C., Sreebhash C., Suman D., Debabrata K., Dip B. An overview of microcapsule dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*. 2020;7(4):155–160. DOI: 10.18231/j.ijpca.2020.025.
4. Полковникова Ю.А., Ковалёва Н.А. Современные исследования в области микрокапсулирования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):50–61. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-50-61.
5. Salah A., Bing L., Jichao S., Safia A., Zhen D., Fusheng C., Xu-zheng Z., Shad M., Jiyu Z. Recent advances in microencapsulation of drugs for veterinary applications. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2021;44(3):298–312. DOI: 10.1111/jvp.12946.
6. Yaowalak S., Prasong S. Human Hair Keratin Microspheres Prepared by the Water-in-oil Emulsion Solvent Diffusion Method for Hydrophilic Drug Carrier. *Oriental journal of chemistry*. 2019;35(3):1112–1116. DOI: 10.13005/ojc/350326.
7. Gupta J., Mohan G., Prabakaran L., Gupta R. ACF loaded ethyl Cellulose Microspheres: Formulation Designing, Characterization and In-Vivo anti-Inflammatory and Analgesic activities in Albino Wistar Rats. *International Journal of Drug Development and Research*. 2019;6(3):133–144.
8. Петрова Е.А., Кедик С.А., Алексеев К.В., Блынская Е.В., Панов А.В., Суслов В.В., Тихонова Н.В. Изучение параметров микроинкапсулирования при получении пролонгированной формы налтрексона. *Химико-фармацевтический журнал*. 2014;48(1):50–53. DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-1-50-53.
9. Кедик С.А., Суслов В.В., Седишев И.П., Нгуен Т.Т.Т., Шняк Е.А. Лекарственные формы нестероидных противовоспалительных средств с модифицированным высвобождением. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2(19):74–83.
10. Mitra J., Seyed H. M. Comparison of Microencapsulation by Emulsion-Solvent Extraction/Evaporation Technique Using Derivatives Cellulose and AcrylateMethacrylate Copolymer as Carriers. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2012;7(4):144–152.
11. Wesley O., Makwena O. Encapsulation of ibuprofen into solid lipid nanoparticles for controlled and sustained release using emulsification solvent evaporation technique. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2019;12(8):74–81. DOI: 10.22159/ajpcr.2019.v12i18.33652.
12. Paroma A., Shehan H., Mohammad M., Dipankar C., Sreebhash C., Saidul A., Debabrata K. Evaluation of the Influence of Stirring Speed on the Release Kinetics of Fexofenadine HCl Polymeric Microspheres. *Biosciences biotechnology research asia*. 2021;18(4): 733–741. DOI: 10.13005/bbra/2955.
13. Hanieh S., Michael F., Nicholas K., Omolola E. Effect of the Emulsion Solvent Evaporation Technique Cosolvent Choice on the Loading Efficiency and Release Profile of Anti-CD47

- from PLGA Nanospheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;111(9):2525–2520. DOI: 10.1016/j.xphs.2022.04.007.
14. Yaowalak S., Prasong S. Human Hair Keratin Microspheres Prepared by the Water-in-oil Emulsion Solvent Diffusion Method for Hydrophilic Drug Carrier. *Oriental journal of chemistry*. 2019;35(3):1112–1116. DOI: 10.13005/ojc/350326.
15. Биткина Т. А., Басевич А. В., Родин В. М. Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенохирургии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):28–35. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35.
16. Семкина О. А., Белошапкина О. М., Джавахян М. А. Критерии оценки качественных и количественных показателей микрокапсул. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2021;24(12):11–17. DOI:10.29296/25877313-2021-12-02.
17. Aparna D., Abhra D., Rajkumar G. Eudragit® RL100 microspheres as delayed-release system for ibuprofen: in vitro evaluation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2022;14(12):6–10. DOI: 10.22159/ijpps.2022v14i12.45838.
- Microspheres. *Biosciences biotechnology research asia*. 2021;18(4): 733–741. DOI: 10.13005/bbra/2955.
13. Hanieh S., Michael F., Nicholas K., Omolola E. Effect of the Emulsion Solvent Evaporation Technique Cosolvent Choice on the Loading Efficiency and Release Profile of Anti-CD47 from PLGA Nanospheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;111(9):2525–2520. DOI: 10.1016/j.xphs.2022.04.007.
14. Yaowalak S., Prasong S. Human Hair Keratin Microspheres Prepared by the Water-in-oil Emulsion Solvent Diffusion Method for Hydrophilic Drug Carrier. *Oriental journal of chemistry*. 2019;35(3):1112–1116. DOI: 10.13005/ojc/350326.
15. Bitkina T. A., Basevich A. V., Rodin V. M. Critical points of production of polymer microspheres used in X-ray surgery. *Drug development & registration*. 2020;9(3):28–35. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35. (In Russ.)
16. Semkina O. A., Beloshapkina O. M., Dzhavahjan M. A. Criteria for evaluating qualitative and quantitative indicators of microcapsules. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2021;24(12):11–17. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2021-12-02.
17. Aparna D., Abhra D., Rajkumar G. Eudragit® RL100 microspheres as delayed-release system for ibuprofen: in vitro evaluation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2022;14(12):6–10. DOI: 10.22159/ijpps.2022v14i12.45838.

REFERENCES

1. Hishova O. M., Rafalovich E. O. Modern approaches in the creation of modified-release drugs. *Recept*. 2018;21(3):338–350. (In Russ.)
2. Lengyel M., Kállai-Szabó N., Antal V., Laki A. J., Antal I. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica*. 2019;87(3):20. DOI: 10.3390/scipharm87030020.
3. Paroma A., Md Shehan H., Dipankar C., Sreebhash C., Suman D., Debabrata K., Dip B. An overview of microcapsule dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*. 2020;7(4):155–160. DOI: 10.18231/j.ijpca.2020.025.
4. Polkovnikova Ju. A., Kovaljova N. A. Modern research in the field of microcapsulation. *Drug development & registration*. 2021;10(2):50–61. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-50-61.
5. Salah A., Bing L., Jichao S., Safia A., Zhen D., Fusheng C., Xu-zheng Z., Shad M., Jiyu Z. Recent advances in microencapsulation of drugs for veterinary applications. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2021;44(3):298–312. DOI: 10.1111/jvp.12946.
6. Yaowalak S., Prasong S. Human Hair Keratin Microspheres Prepared by the Water-in-oil Emulsion Solvent Diffusion Method for Hydrophilic Drug Carrier. *Oriental journal of chemistry*. 2019;35(3):1112–1116. DOI: 10.13005/ojc/350326.
7. Gupta J., Mohan G., Prabakaran L., Gupta R. ACF loaded ethyl Cellulose Microspheres: Formulation Designing, Characterization and In-Vivo anti-Inflammatory and Analgesic activities in Albino Wistar Rats. *International Journal of Drug Development and Research*. 2019;6(3):133–144.
8. Petrova E. A., Kedik S. A., Alekseev K. V., Blynskaja E. V., Panov A. V., Suslov V. V., Tihonova N. V. Study of microencapsulation parameters in obtaining a prolonged form of naltrexone. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;48(1):50–53. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-1-50-53.
9. Kedik S. A., Suslov V. V., Sedishev I. P., Nguen T. T. T., Shnjak E. A. Dosage forms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with modified release. *Drug development & registration*. 2017;2(19):74–83. (In Russ.)
10. Mitra J., Seyed H. M. Comparison of Microencapsulation by Emulsion-Solvent Extraction/Evaporation Technique Using Derivatives Cellulose and AcrylateMethacrylate Copolymer as Carriers. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2012;7(4):144–152.
11. Wesley O., Makwena O. Encapsulation of ibuprofen into solid lipid nanoparticles for controlled and sustained release using emulsification solvent evaporation technique. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2019;12(8):74–81. DOI: 10.22159/ajpcr.2019.v12i18.33652.
12. Paroma A., Shehan H., Mohammad M., Dipankar C., Sreebhash C., Saidul A., Debabrata K. Evaluation of the Influence of Stirring Speed on the Release Kinetics of Fexofenadine HCl Polymeric

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1523>
УДК 615.453.6; 615.014.21



Оригинальная статья / Research article

Разработка мини-таблеток амлодипина как компонента полипилла для персонализированной терапии артериальной гипертензии

К. М. Церковная¹✉, Е. В. Флисюк¹, Ю. М. Коцур¹, И. А. Наркевич¹,
И. Е. Смехова¹, Д. Ю. Ивкин¹, Н. В. Филимонова²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² Акционерное общество «Фармпроект». 192236, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Софийская, д. 14

✉ Контактное лицо: Церковная Ксения Михайловна. E-mail: ksenia.kirillova@spcru.ru

ORCID: К. М. Церковная – <https://orcid.org/0000-0001-5047-0295>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>;

И. Е. Смехова – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Н. В. Филимонова – <https://orcid.org/0009-0002-2572-1261>.

Статья поступила: 18.07.2023

Статья принята в печать: 10.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Персонализированный подбор антигипертензивных комбинаций лекарственных средств (ЛС) и их дозировок является одним из перспективных направлений в области комбинированной терапии артериальной гипертензии (АГ). Для реализации данной концепции может быть использован полипилл в виде твердой желатиновой капсулы, содержащей комбинацию мини-таблеток.

Цель. Разработка состава и технологии мини-таблеток амлодипина с дозировками 2,5 мг и 5 мг, покрытых цветными пленочными оболочками, как компонента полипилла для реализации персонализированной терапии АГ.

Материалы и методы. В исследовании использовали активную фармацевтическую субстанцию (АФС) амлодипина безилата (Glochem Industries Private Ltd., Индия), а также вспомогательные вещества (ВВ), выполняющие функции наполнителей, дезинтегранта, опудривающего компонента, красителя и пленкообразующей композиции. Для оценки профилей высвобождения амлодипина в качестве референтного препарата использовали оригинальный препарат Норваск®, таблетки 5 мг. Смешение проводили в лабораторном смесителе типа «пьяная бочка» DGN-II (Shanghai Unique Machinery Technology Co., Ltd., Китай); мини-таблетки прессовали на лабораторном автоматическом однопуансонном таблеточном прессе DP30A (Beijing Gylongli Sci. & Tech.Co., Ltd., Китай); пленочные покрытия на мини-таблетки-ядра наносили с помощью лабораторной установки BGB-1 (Chongqing Jinggong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd., Китай). Оценку технологических свойств АФС и таблеточных смесей, а также контроль качества полученных мини-таблеток осуществляли по методикам Государственной фармакопеи РФ XIV издания.

Результаты и обсуждение. В результате исследования обоснован оптимальный состав ВВ группы наполнителей (лактозы моногидрат, МКЦ и кальция гидрофосфат безводный в соотношении 1:1:1) для получения мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг и 5 мг методом прямого прессования. Для различия дозировок и возможности дальнейшего инкапсулирования мини-таблеток разработана технология покрытия цветными пленочными оболочками мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг и 5 мг. Установлена эквивалентность профилей высвобождения амлодипина из разработанных мини-таблеток профилю высвобождения амлодипина из референтного препарата.

Заключение. Разработаны состав и технология мини-таблеток амлодипина 2,5 мг и 5 мг, покрытых пленочной оболочкой, являющихся одним из компонентов полипилла, содержащего оригинальную комбинацию ЛС для персонализированной терапии АГ.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, полипилл, мини-таблетки, амлодипин, прямое прессование, однородность дозирования, пленочная оболочка, высвобождение

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

Вклад авторов. К. М. Церковная и Е. В. Флисюк спланировали эксперимент. К. М. Церковная выполнила эксперимент. Н. В. Филимонова участвовала в прессовании мини-таблеток. К. М. Церковная, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова, Д. Ю. Ивкин, Ю. М. Коцур и И. А. Наркевич участвовали в обработке данных и в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

Для цитирования: Церковная К. М., Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю., Филимонова Н. В. Разработка мини-таблеток амлодипина как компонента полипилла для персонализированной терапии артериальной гипертензии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):155–164. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1523>

© Церковная К. М., Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Смехова И. Е., Ивкин Д. Ю., Филимонова Н. В., 2023

© Tserkovnaya K. M., Flisyuk E. V., Kotsur Ju. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu., Filimonova N. V., 2023

Development of Amlodipine Mini-tablets as a Polypill-component for the Personalized Therapy of Arterial Hypertension

Ksenia M. Tserkovnaya¹✉, Elena V. Flisyuk¹, Julia M. Kotsur¹, Igor A. Narkevich¹, Irina E. Smekhova¹, Dmitry Yu. Ivkin¹, Natalya V. Filimonova²

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² JSC "Pharmproekt", 14, Sofiyevskaya str., Saint-Petersburg, 192236, Russia

✉ **Corresponding author:** Ksenia M. Tserkovnaya. **E-mail:** ksenia.kirillova@spcpu.ru

ORCID: Ksenia M. Tserkovnaya – <https://orcid.org/0000-0001-5047-0295>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

Julia M. Kotsur – <http://orcid.org/0000-0001-9292-4240>; Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>;

Irina E. Smekhova – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>; Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Natalya V. Filimonova – <https://orcid.org/0009-0002-2572-1261>.

Received: 18.07.2023

Revised: 10.11.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. A personalized choice of antihypertensive combinations and doses is one of the promising trend in the field of combination therapy of arterial hypertension (AH). A polypill as a solid gelatin capsule with combination of mini-tablets can be used to realise this concept.

Aim. Development of the composition and technology of Amlodipine 2,5 mg and 5 mg film-coated mini-tablets as a polypill-component for the personalized therapy of AH.

Materials and methods. Active pharmaceutical ingredient (API) Amlodipine besylate (Glochem Industries Private Ltd., India) and excipients, such as diluent, disintegrant, lubricant, dye and premix for film coating, were used. Norvasc[®], 5 mg tablets were used as a reference drug to estimate the release profile of Amlodipine. API and excipients were mixed in a «drunken barrel» mixer DGN-II (Shanghai Unique Machinery Technology Co., Ltd., China); mini-tablets were obtained on a DP30A laboratory automatic single-punch tablet press (Beijing Gylongli Sci. & Tech. Co., Ltd., China); film coatings on mini-tablets-cores were applied by using a BGB-1 laboratory machine (Chongqing Jinggong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd., China). Assessment of technological characteristics of API and tablet mixtures and quality control of mini-tablets were conducted by the methods of State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed.

Results and discussion. As a result of the study, the optimal composition of the excipients of the fillers group (lactose monohydrate, MCC and anhydrous calcium hydrogen phosphate in a ratio of 1:1:1) for the production of Amlodipine 2,5 mg and 5 mg mini-tablets-cores by direct compression was established. The technology of applying film coatings was developed. The equivalence of the release profiles of Amlodipine from the developed mini-tablets to the release profile of the reference drug was established.

Conclusion. The composition and technology of Amlodipine 2,5 mg and 5 mg film-coated mini-tablets as a polypill-component for the personalized therapy of AH were developed.

Keywords: arterial hypertension, polypill, mini-tablets, Amlodipine, direct compression, content uniformity, film coating, release

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

Contribution of the authors. Ksenia M. Tserkovnaya and Elena V. Flisyuk developed the experiment. Ksenia M. Tserkovnaya carried out the experiment. Natalya V. Filimonova participated in mini-tablets compression. Ksenia M. Tserkovnaya, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova, Dmitry Yu. Ivkin, Julia M. Kotsur and Igor A. Narkevich participated in data processing and in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

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

For citation: Tserkovnaya K. M., Flisyuk E. V., Kotsur Ju. M., Narkevich I. A., Smekhova I. E., Ivkin D. Yu., Filimonova N. V. Development of amlodipine mini-tablets as a polypill-component for the personalized therapy of arterial hypertension. *Drug development & registration*. 2023;12(4):155–164. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1523>

ВВЕДЕНИЕ

Артериальная гипертензия (АГ) – широко распространенное заболевание и частая причина развития различных сердечно-сосудистых, цереброваскулярных и почечных осложнений [1, 2].

Основопологающей стратегией для достижения необходимых клинических результатов и обеспечения приверженности пациентов лечению является комбинированная антигипертензивная терапия [1].

Одним из перспективных направлений в области комбинированной терапии АГ может быть персонализированный подбор антигипертензивных комбинаций лекарственных средств (ЛС) и их дозировок в виде полипиллов. Полипилл – это комбинация трех и более лекарственных препаратов в составе одной таблетки или капсулы [3]. Подобный персонализированный подход в проведении антигипертензивной терапии способен повысить эффективность и безопас-

ность проводимого лечения, а также снизить уровень сердечно-сосудистого риска [4–7].

Существуют различные варианты наполнения твердых желатиновых капсул, одним из которых является наполнение мини-таблетками. Мини-таблетки диаметром от 1 до 5 мм обладают свойствами таблеток традиционных размеров, но при этом отличаются определенными преимуществами: быстрой распадаемостью, возможностью образовывать рациональные комбинации и титровать дозы действующего вещества путем наполнения капсулы необходимым числом мини-таблеток [8, 9]. Титрование дозы представляет собой фармакологический подход к подбору минимальной эффективной дозы для каждого конкретного пациента с определенным шагом дозирования [6].

В настоящее время в ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в целях реализации персонализированной терапии АГ проводится разработка полипилла в виде твердой желатиновой капсулы, содержащей комбинацию мини-таблеток. Создаваемая тройная комбинация ЛС является фармакологически рациональной и до настоящего времени не зарегистрированной на территории Российской Федерации. Одним из компонентов комбинации является представитель группы дигидропиридиновых блокаторов кальциевых каналов III поколения, обладающий сверхдлительным антигипертензивным действием (более 24 часов), – амлодипин [10]. Он отличается высокой антигипертензивной активностью, выраженными органопротективными свойствами и способностью входить в рациональные сочетания ЛС для терапии АГ [10].

Для разработки мини-таблеток амлодипина выбраны дозировки 2,5 мг и 5 мг, что позволяет охватить терапевтический диапазон от ½ начальной суточной дозы (2,5 мг) до максимальной суточной дозы (10 мг) путем наполнения капсулы одной или двумя мини-таблетками амлодипина 2,5 мг и/или 5 мг.

Целью данного исследования являлась разработка состава и технологии мини-таблеток амлодипина с дозировками 2,5 мг и 5 мг, покрытых цветными пленочными оболочками, как компонента полипилла для реализации персонализированной терапии АГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Для проведения исследования использовали активную фармацевтическую субстанцию (АФС) амлодипина безилата (Glochem Industries Private Ltd., Индия, серия BN11-22008, количественное содержание 100,4 %, срок годности до 11.2026).

Для получения мини-таблеток амлодипина 2,5 и 5 мг методом прямого прессования были использованы следующие вспомогательные вещества (ВВ): лактозы моногидрат марки Tablettose® 80 (Meggler AG,

Германия); микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) марки VIVAPUR® 200 (JRS Pharma GmbH & Co. KG, Германия); кальция гидрофосфат безводный марки Fujicalin® (Fuji Chemical Industries Co., Ltd., Япония); кроскармеллоза натрия марки Ac-Di-Sol® WL-729 NF (DuPont, США) и магния стеарат (ООО «ХИМСТАБ», Россия).

В качестве пленкообразующей композиции использовалось универсальное пленочное покрытие AquaPolish® P white 010.256 (Bioground GmbH, Германия), в котором пленкообразователем является гипромеллоза (ГПМЦ).

В качестве красителя использовался сухой водорастворимый краситель R100 «зеленое яблоко» (CondiColor, Россия).

Для выполнения исследования использовались следующие реактивы: вода очищенная, кислота хлористоводородная (ос. ч., АО «БЕКТОН», Россия).

В качестве референтного препарата для оценки профилей высвобождения амлодипина из разработанных мини-таблеток использовался оригинальный препарат Норваск®, таблетки 5 мг (Pfizer Pharmaceuticals LLC, Пуэрто-Рико, серия GN1607, срок годности до 02.2026).

Методы

Смешение компонентов таблеточных смесей проводили в лабораторном смесителе типа «пьяная бочка» многофункциональной лабораторной установки DGN-II (Shanghai Unique Machinery Technology Co., Ltd., Китай). Для получения тритурации предварительно отвешенное количество АФС подвергали дробному смешению с частью наполнителя [лактозы моногидрата (составы № 1, 3, 4) или кальция гидрофосфата безводного (состав № 2)] в течение 10 мин при скорости вращения 45 об/мин. Затем полученную тритурацию смешивали с другими ВВ (20 мин, 45 об/мин). После этого в смеситель загружали магния стеарат для опудривания в течение 2 мин при той же скорости вращения.

Определение сыпучести таблеточных смесей проводили на тестере сыпучести гранулированного материала ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Германия).

Для получения мини-таблеток-ядер методом прямого прессования использовали лабораторный автоматический однопуансонный таблеточный пресс DP30A (Beijing Gylongli Sci. & Tech.Co., Ltd., Китай). Усилие прессования подбиралось индивидуально для каждой смеси в диапазоне 2,5–3,5 кН с целью получения желаемой геометрии мини-таблеток (высота – от 2,70 до 3,00 мм).

Для приготовления пленкообразующих суспензий использовали мешалку с верхним приводом Heidolph RZR 2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия); для нанесения пленочной оболочки на мини-таблетки-ядра – лабораторную установку для нанесения покрытий BGB-1 (Chongqing Jingtong Pharmaceutical Machinery Co., Ltd., Китай).

Контроль качества полученных мини-таблеток проводили по соответствующим методикам Государственной фармакопеи РФ XIV издания с использованием следующего оборудования: весов аналитических с точностью 0,1 мг «Сартогосм» CE224-C (ООО «САРТОГОСМ», Россия); тестера твердости таблеток ERWEKA TBH 125 TDP (ERWEKA GmbH, Германия); тестера контроля истираемости таблеток ERWEKA TAR 220 (ERWEKA GmbH, Германия); тестера контроля распадаемости таблеток ERWEKA ZT 221 (ERWEKA GmbH, Германия); тестера растворения таблеток ERWEKA DT 626 (ERWEKA GmbH, Германия); спектрофотометра СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) [11].

Проведение испытаний «Однородность дозирования», «Растворение» и «Количественное определение» осуществляли методом УФ-спектрофотометрии по методике ФС.3.1.0002.18 «Амлодипина безилат, таблетки», раздел «Растворение» [11].

В работе использовались методы статистической обработки данных при помощи пакета Microsoft Office Excel (версия 16.42).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения мини-таблеток была выбрана технология прямого прессования, как наиболее экономически выгодный, рациональный и воспроизводимый метод, отличающийся отсутствием воздействия влаги и высокой температуры на компоненты таблеток [12].

В ходе предварительных исследований было выявлено, что АФС амлодипина безилат является мелкодисперсным порошком с частицами пластинчатой формы и обладает неудовлетворительными показателями сыпучести и прессуемости (таблица 1).

Учитывая неудовлетворительные технологические свойства АФС и параметры лекарственной формы (ЛФ) (таблица 2), наиболее важной задачей при

разработке состава и технологии мини-таблеток являлось обеспечение однородности распределения амлодипина безилата в таблеточной смеси и ЛФ.

Таблица 1. Результаты определения технологических свойств АФС амлодипина безилат

Table 1. The results of the determination of technological characteristics of amlodipine besylate

Технологическая характеристика Technological characteristic	Значение Value
Насыпная плотность до уплотнения, г/мл Bulk density, g/ml	0,24
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл Tapped density, g/ml	0,40
Число Хауснера Hausner Ratio	1,67
Индекс Карра, % Carr Index	40,00
Сыпучесть при отсутствии перемешивания, г/с Flowability without mixing, g/s	0,0

При разработке составов для таблетирования особое внимание уделялось выбору наполнителей, способных придать таблеточной смеси необходимые свойства сыпучести и прессуемости. В качестве наполнителей использовались: лактозы моногидрат марки Tablettose® 80, представляющий собой агломерированную лактозу с размером агломератов до 630 мкм, обладающую высокой текучестью; гранулированная МКЦ марки VIVAPUR® 200 со средним размером частиц 180 мкм, применяемая для рецептур с плохой сыпучестью; кальция гидрофосфат безводный марки Fujicalin®, представляющий собой частицы сферической формы и, согласно рекомендациям, способный значительно повышать сыпучесть и прессуемость таблеточных смесей для прямого прессования [13]. Составы таблеточных смесей амлодипина 2,5 мг (таблица 3) отличаются лишь комбинациями наполнителей, взятых в равных соотношениях (1:1 или 1:1:1). Дезинтегрант и смазывающее (опудривающее) веществ-

Таблица 2. Параметры мини-таблеток

Table 2. Parameters of mini-tablets

Параметр Parameter	Значение Value	Обоснование Explanation
Метод получения Processing technology	Прямое прессование Direct compression	Наиболее рациональный и экономически выгодный метод The most efficient and cost effective method
Форма Shape	Двояковыпуклая Biconvex tablet	Необходимость покрытия пленочной оболочкой Necessity of film coating
Диаметр, мм Diameter, mm	5,00	Возможность инкапсулирования Possibility of encapsulation
Высота, мм Thickness, mm	2,70–3,00	
Масса, мг Mass, mg	70,0 ± 7,0	
Дозировка амлодипина, мг (в виде амлодипина безилата, мг) Dose of Amlodipine, mg (Amlodipine besylate, mg)	2,5 (3,47) 5,0 (6,94)	Возможность титрования дозы Possibility of titration of the dose

во использовались одной марки и в одинаковых количествах, обусловленных рекомендациями производителей ВВ и ограничением по содержанию магния стеарата [11, 13].

Таблица 3. Составы таблеточных смесей амлодипина 2,5 мг

Table 3. Composition of Amlodipine 2,5 mg tablet mixtures

№ состава Mixture number	1	2	3	4
Вещество, % Ingredient, %				
Амлодипина безилат Amlodipine besylate	4,96	4,96	4,96	4,96
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	46,04	–	45,00	30,00
МКЦ MCC	45,00	45,00	–	30,00
Кальция гидрофосфат безводный Calcium hydrogen phosphate, anhydrous	–	46,04	46,04	31,04
Кроскармеллоза натрия Croscarmellose Sodium	3,00	3,00	3,00	3,00
Магния стеарат Magnesium stearate	1,00	1,00	1,00	1,00
Итого Total	100,00	100,00	100,00	100,00

Для полученных смесей была проведена оценка сыпучести. Анализ результатов (таблица 4) показал, что все составы обладают хорошей сыпучестью и могут быть использованы для дальнейшего таблетирования.

Мини-таблетки-ядра получали методом прямого прессования. Скорость прессования сохранялась постоянной и составляла 25 мини-таблеток/мин.

Важной задачей исследования являлась оценка однородности дозирования амлодипина 2,5 мг в мини-таблетках-ядрах. Установлено, что однородность распределения АФС наблюдалась только в мини-таблетках-ядрах состава № 4 (таблица 5, рисунок 1).

По результатам контроля качества (таблица 6) можно сделать вывод, что мини-таблетки-ядра составов № 1–4 соответствовали фармакопейным требованиям по показателям: внешнему виду, однородности массы, истираемости, прочности на раздавливание, распадаемости [11]. Однако следует отметить, что по

Таблица 4. Оценка сыпучести таблеточных смесей амлодипина 2,5 мг

Table 4. Evaluation of flowability of Amlodipine 2,5 mg tablet mixtures

№ состава Mixture number	1	2	3	4
Сыпучесть, с/100 г Flowability, s/100 g	0,94 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1
Сыпучесть, г/с Flowability, g/s	107,0 ± 13,7	33,0 ± 1,5	50,1 ± 6,2	46,9 ± 3,1

результатам количественного определения составы № 1 и 3 не удовлетворяли критериям приемлемости. В связи с этим дальнейшее испытание «Растворение» проводилось только для мини-таблеток-ядер составов № 2 и 4.

Таблица 5. Результаты контроля качества мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг по показателю «Однородность дозирования»

Table 5. Results of quality control of Amlodipine 2,5 mg mini-tablets-cores (the test for Content Uniformity)

Показатель Characteristic name	Состав 1 Mixture 1	Состав 2 Mixture 2	Состав 3 Mixture 3	Состав 4 Mixture 4
Среднее содержание АФС в мини-таблетке, % Average of API content per mini-tablet, %	85,49	95,93	82,25	99,97
Стандартное отклонение (s) Standard deviation (s)	16,60	5,27	4,71	1,62
Первый показатель приемлемости (AV), % Acceptance value (AV), %	52,86	15,22	27,56	3,89
Должно выполняться условие: AV ≤ L1; L1 = 15 % Condition: AV ≤ L1; L1 = 15 %				

Исследования показали, что результаты испытаний «Однородность дозирования», «Количественное определение» и «Растворение» соответствуют критериям приемлемости при применении в качестве наполнителей лактозы моногидрата, МКЦ и кальция гидрофосфата безводного в соотношении 1:1:1 (состав № 4). Таким образом, данный состав является оптимальным для получения мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг методом прямого прессования.

На основании результатов разработки состава мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг, а также с учетом целевой массы и геометрии мини-таблетки для ЛФ с дозировкой АФС вдвое больше (6,94 мг амлодипина безилата, что соответствует 5 мг амлодипина) был предложен состав, приведенный в таблице 7.

Для полученной таблеточной смеси была определена сыпучесть при отсутствии перемешивания, которая составила 7,5 ± 0,6 с / 100 г (13,4 ± 1,1 г/с).

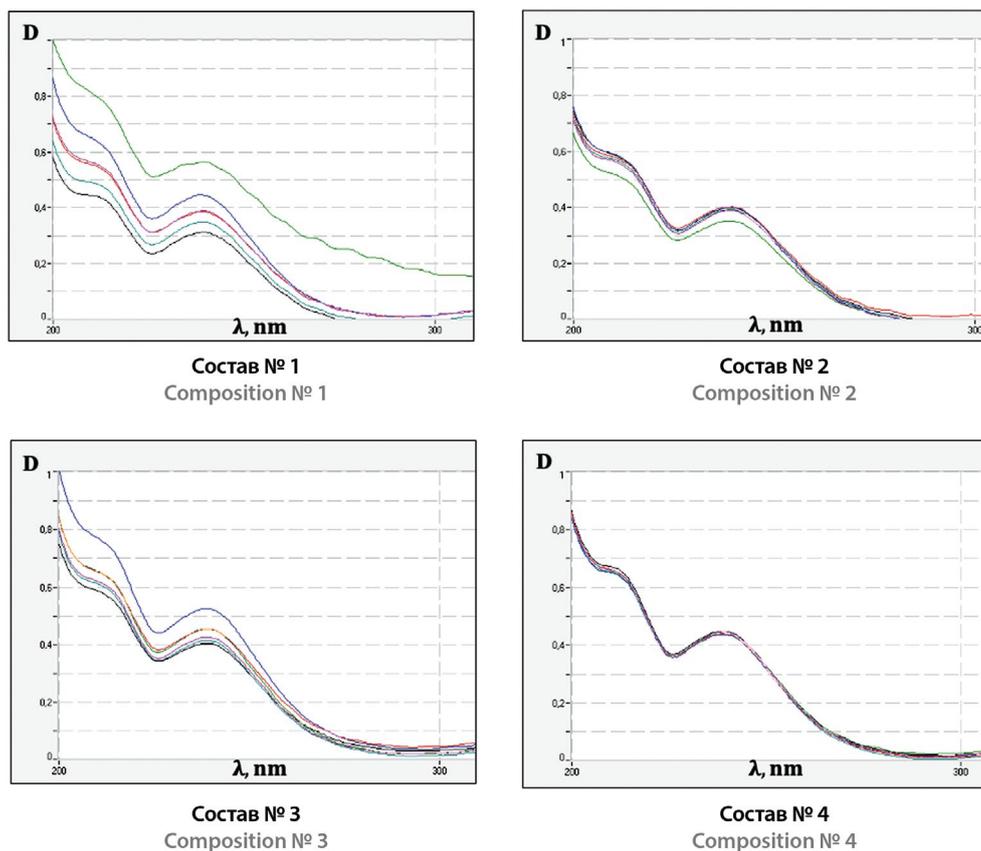


Рисунок 1. УФ-спектры растворов мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг при проведении испытания «Однородность дозирования»

Figure 1. UV spectrum of Amlodipine 2,5 mg mini-tablets-cores solutions of the test for Content Uniformity

Таблица 6. Результаты контроля качества мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг

Table 6. Results of quality control of Amlodipine 2,5 mg mini-tablets-cores

Показатель качества Level of quality	Результат Result				Критерий Criteria
	№ состава Mixture number				
	1	2	3	4	
Внешний вид Appearance	Круглые, двояковыпуклые, белого цвета White round biconvex				Круглые, двояковыпуклые, белого цвета White round biconvex
	Однородность массы, мг Weight variation, mg 69,2 ± 0,6 69,7 ± 0,5 70,2 ± 0,4 72,2 ± 0,3				70,0 ± 7,0 (±10%)
Истираемость, % Friability, %	0,29	0,14	0,14	0,29	Менее 3 % Less than 3 %
Прочность, Н Hardness, N	92,2 ± 2,9	144,0 ± 7,5	81,3 ± 8,1	107,7 ± 4,3	Не менее 30 Н Not less than 30 N
Распадаемость, мин Disintegration, min	3,0 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	2,0 ± 0,3	Не более 15 мин Not more than 15 min
Количественное определение, мг Drug content, mg	2,17 ± 0,01	2,31 ± 0,01	2,21 ± 0,01	2,54 ± 0,02	2,5 ± 0,25
Растворение, % Dissolution, %	–	95,86 ± 2,90	–	100,76 ± 1,46	Через 30 мин в раствор должно перейти не менее 85 % At least 85 % for 30 min

Таблица 7. Состав мини-таблеток-ядер амлодипина 5 мг

Table 7. Composition of Amlodipine 5 mg mini-tablets-cores

Вещество Ingredient, %	Количество на одну таблетку Amount per tablet	
	мг mg	%
Амлодипина безилат Amlodipine besylate	6,94	9,91
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	19,95	28,50
МКЦ МСС	19,95	28,50
Кальция гидрофосфат безводный Calcium hydrogen phosphate, anhydrous	20,36	29,09
Кроскармеллоза натрия Croscarmellose Sodium	2,10	3,00
Магния стеарат Magnesium stearate	0,70	1,00
Итого Total	70,00	100,00

При получении мини-таблеток-ядер амлодипина 5 мг при скорости прессования 25 мини-таблеток/мин, используемой ранее для мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг, наблюдалось неравномерное заполнение матрицы таблеточной смесью. По-видимому, данное явление обусловлено различием в сыпучести таблеточных смесей: сыпучесть таблеточной смеси для получения мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг более чем в три раза превышала таковую для получения мини-таблеток-ядер амлодипина 5 мг. При высокой скорости прессования матрица заполняет-

ся равномерно смесью с более высокой сыпучестью из-за лучшей текучести смеси из загрузочного бункера. В связи с этим скорость прессования мини-таблеток-ядер амлодипина 5 мг была снижена до 15 мини-таблеток/мин, что позволило обеспечить равномерность заполнения матрицы.

Полученные мини-таблетки-ядра амлодипина 5 мг по всем показателям качества соответствовали фармакопейным требованиям (таблица 8) [11].

Для различия дозировок мини-таблеток амлодипина и возможности их дальнейшего инкапсулирования было решено нанести на ядра пленочные оболочки различного цвета.

В результате изучения вязкости, поверхностного натяжения и оценки рассчитанного значения работы адгезии пленкообразующих суспензий, приготовленных на основе универсального пленочного покрытия AquaPolish® P white 010.256 в концентрациях 12, 15 и 18 %, в качестве наиболее оптимальной концентрации была выбрана 15 % суспензия.

В процессе приготовления суспензии вводился водорастворимый краситель в количестве 30,0 мг на 200,0 г пленкообразующей суспензии для покрытия мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг светло-зеленой оболочкой и 200,0 мг на 200,0 г пленкообразующей суспензии для покрытия мини-таблеток-ядер амлодипина 5 мг ярко-зеленой оболочкой.

В ходе исследования были установлены оптимальные технологические параметры нанесения пленочного покрытия (таблица 9) с учетом возможных проблем, возникающих при покрытии таблеток пленочными оболочками [14, 15].

Таблица 8. Результаты контроля качества мини-таблеток-ядер амлодипина 5 мг

Table 8. Results of quality control of Amlodipine 5 mg mini-tablets-cores

Показатель качества Level of quality	Результат Result	Критерий Criteria
Внешний вид Appearance	Круглые, двояковыпуклые, белого цвета White round biconvex	Круглые, двояковыпуклые, белого цвета White round biconvex
Однородность массы, мг Weight variation, mg	70,7 ± 0,3	70,0 ± 7,0 (± 10 %)
Истираемость, % Friability, %	0,14	Менее 3% Less than 3%
Прочность, Н Hardness, N	103,0 ± 2,7	Не менее 30 Н Not less than 30 N
Распадаемость, мин Disintegration, min	3,2 ± 0,1	Не более 15 мин Not more than 15 min
Количественное определение, мг Drug content, mg	4,77 ± 0,03	5,0 ± 0,5
Растворение, % Dissolution, %	98,93 ± 0,93	Через 30 мин в раствор должно перейти не менее 80 % At least 80 % for 30 min
Однородность дозирования Content Uniformity		
Среднее содержание АФС в мини-таблетке, % Average of API content per mini-tablet, %	98,90	AV ≤ L1; L1 = 15 %
Стандартное отклонение (s) Standard deviation (s)	1,20	
Первый показатель приемлемости (AV), % Acceptance value (AV), %	2,88	

Таблица 9. Технологические параметры нанесения пленочного покрытия

Table 9. Technological parameters of applying film coating

Параметр Parameter	Значение Value
Частота работы вентилятора на подачу воздуха, Гц Supply fan freq, Hz	40,0
Частота работы вентилятора на отведение воздуха, Гц Exhaust fan freq, Hz	45,0
Температура входящего воздуха, °C Supply air temp, °C	70,0
Температура выходящего воздуха, °C Exhaust air temp, °C	40,0
Скорость вращения барабана, об/мин Coating bowl speed, Rpm	9,0
Скорость подачи пленкообразующей суспензии, мл/мин Pump speed, Rpm	7,0
Давление сжатого воздуха на распыл, бар Atomizing pressure, bar	1,0

Для сохранения целевой геометрии мини-таблеток покрытие наносилось до достижения его массовой доли 2 % от массы ядра ($70,0 \pm 7,0$ мг).

Полученные мини-таблетки, покрытые пленочной оболочкой, обладали удовлетворительным внешним видом: на поверхности не наблюдалось расслаивания смеси, сколов, трещин и других дефектов. Фотографии мини-таблеток, покрытых оболочкой (п/о), представлены на рисунке 2.

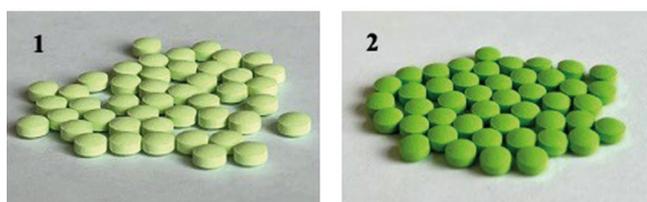


Рисунок 2. Мини-таблетки, покрытые пленочной оболочкой:
1 – амлодипин 2,5 мг; 2 – амлодипин 5 мг

Figure 2. Coated mini-tablets:

1 – Amlodipine 2,5 mg; 2 – Amlodipine 5 mg

Нанесение пленочной оболочки не оказало существенного влияния на распадаемость мини-таблеток, которая составляла $2,5 \pm 0,1$ мин и $3,8 \pm 0,1$ мин для мини-таблеток п/о с дозировками 2,5 и 5 мг соответственно.

Высвобождение амлодипина из полученных мини-таблеток с дозировками 2,5 мг и 5 мг изучали в среде 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты по фармакопейной методике в сравнении с ре-

ферентным препаратом Норваск®, таблетки 5 мг (рисунки 3 и 4). Выбор референтного препарата проводился в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 85¹. В связи с тем, что, как было установлено, за 15 минут из исследуемых препаратов в раствор переходит более 85 % амлодипина ($94,71 \pm 0,99$ % – из референтного препарата; $91,53 \pm 0,93$ % – из мини-таблеток-ядер 2,5 мг; $89,29 \pm 0,88$ % – из мини-таблеток п/о 2,5 мг; $90,71 \pm 0,86$ % – из мини-таблеток-ядер 5 мг; $88,66 \pm 1,19$ % – из мини-таблеток п/о 5 мг), профили растворения считали эквивалентными без математической оценки [16–18]. Нанесение пленочного покрытия существенно не повлияло на профиль высвобождения амлодипина (рисунки 3 и 4).

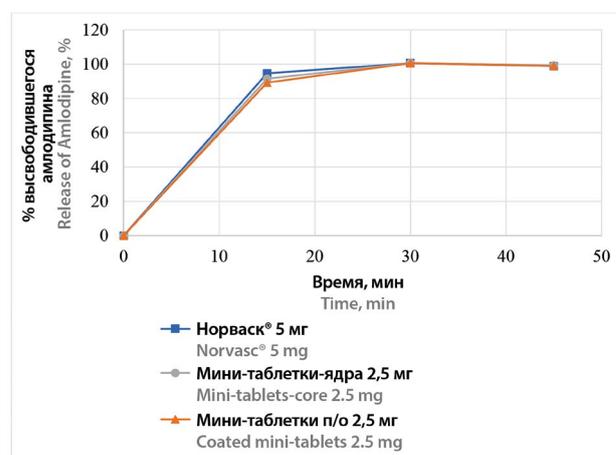


Рисунок 3. Профили высвобождения амлодипина (мини-таблетки амлодипина 2,5 мг и Норваск® 5 мг)

Figure 3. Amlodipine release profiles (Amlodipine mini-tablets 2,5 mg and Norvasc® 5 mg)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны состав и технология мини-таблеток п/о амлодипина 2,5 мг и 5 мг как компонента полипила для персонализированной терапии АГ. Обоснован оптимальный состав ВВ группы наполнителей (лактозы моногидрат, МКЦ и кальция гидрофосфат безводный в соотношении 1:1:1) для получения мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг и 5 мг методом прямого прессования. Мини-таблетки-ядра соответствовали фармакопейным требованиям по показателям: внешнему виду, однородности массы, исти-

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026107>. Ссылка активна на 10.07.2023.

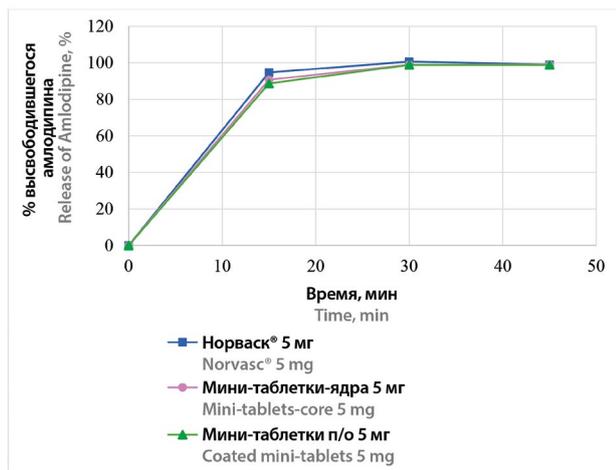


Рисунок 4. Профили высвобождения амлодипина (мини-таблетки амлодипина 5 мг и Норваск® 5 мг)

Figure 4. Amlodipine release profiles (Amlodipine mini-tablets 5 mg and Norvasc® 5 mg)

раемости, прочности на раздавливание, распадаемости, количественному определению, растворению, однородности дозирования.

Разработана технология покрытия пленочной оболочкой различных оттенков мини-таблеток-ядер амлодипина 2,5 мг и 5 мг.

Установлена эквивалентность профилей высвобождения амлодипина из разработанных мини-таблеток профилю высвобождения амлодипина из референтного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клинические рекомендации «Артериальная гипертензия у взрослых». М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2020. 161 с.
2. Ishida T., Oh A., Hiroi S., Shimasaki Y., Nishigaki N., Tsuchihashi T. Treatment patterns and adherence to antihypertensive combination therapies in Japan using a claims database. *Hypertension Research*. 2019;42(2):249–256. DOI: 10.1038/s41440-018-0127-0.
3. Teo K., Yusuf S. Polypill variants (Quarter pill trials). *American Journal of Hypertension*. 2018;31(7):758–761. DOI: 10.1093/ajh/hpy040.
4. Atkins E. R., Chow C. K. Low-dose combination therapy for initial treatment of hypertension. *Current Hypertension Reports*. 2020;22(9):65. DOI: 10.1007/s11906-020-01069-7.
5. Campbell N. R. C. A step in the global effort to control hypertension: Fixed dose combination antihypertensive drugs. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)*. 2019;21(9):1426–1428. DOI: 10.1111/jch.13683.
6. Tserkovnaya K. M., Kotsur Yu. M., Okovityi S. V., Ivkin D. Yu., Kulikov A. N., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Polypill concept in the treatment of arterial hypertension (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(5):577–582. DOI: 10.1007/s11094-022-02678-z.
7. Menditto E., Orlando V., De Rosa G., Minghetti P., Musazzi U. M., Cahir C., Kurczewska-Michalak M., Kardas P., Costa E., Sousa Lobo J. M., Almeida I. F. Patient centric pharmaceutical drug product design – The impact on medication adherence. *Pharmaceutics*. 2020;12(1):44. DOI: 10.3390/pharmaceutics12010044.

8. Mitra B., Chang J., Wu S. J., Wolfe C. N., Ternik R. L., Gunter T. Z., Victor M. C. Feasibility of mini-tablets as a flexible drug delivery tool. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;525(1):149–159. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.037.
9. Janczura M., Sip S., Cielecka-Piontek J. The development of innovative dosage forms of the fixed-dose combination of active pharmaceutical ingredients. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):834. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040834.
10. Luo Y., Ren L., Jiang M., Chu Y. Anti-hypertensive efficacy of amlodipine dosing during morning versus evening: A meta-analysis. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2019;20(2):91–98. DOI: 10.31083/j.rcm.2019.02.31814.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2, 3. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018. 7019 с.
12. Коцур Ю. М., Ладутько Ю. М., Наркевич И. А., Флисюк Е. В. Прогнозирование состава таблеток с пролонгированным высвобождением на основе 4,4'-(пропандиамидо)добензоата натрия с применением метода SeDeM. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):54–62. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
13. Rowe R. C., Sheskey P. J., Quinn M. E. Handbook of pharmaceutical excipients. Sixth edition. London: Pharmaceutical Press; 2009. 888 p.
14. Seo K. S., Bajracharya R., Lee S. H., Han H. K. Pharmaceutical application of tablet film coating. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):853. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090853.
15. Стрелкова А. В., Флисюк Е. В. Проблемы нанесения пленочных покрытий при трансфере технологий. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):150–159. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-150-159.
16. Шохин И. Е., Раменская Г. В., Василенко Г. Ф., Малашенко Е. А. Сравнительная кинетика растворения и биофармацевтические свойства лекарственных средств амлодипина. *Фармация*. 2010;5:13–15.
17. Смехова И. Е., Перова Ю. М., Кондратьева И. А., Родыгина А. Н., Турецкова Н. Н. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2013;1(2):50–61.
18. Benet L. Z., Sodhi J. K. Can in vitro-in vivo extrapolation be successful? Recognizing the incorrect clearance assumptions. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2022;111(5):1022–1035.

REFERENCES

1. Clinical recommendations «Arterial hypertension in adults». Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2020. 161 p. (In Russ.)
2. Ishida T., Oh A., Hiroi S., Shimasaki Y., Nishigaki N., Tsuchihashi T. Treatment patterns and adherence to antihypertensive combination therapies in Japan using a claims database. *Hypertension Research*. 2019;42(2):249–256. DOI: 10.1038/s41440-018-0127-0.
3. Teo K., Yusuf S. Polypill variants (Quarter pill trials). *American Journal of Hypertension*. 2018;31(7):758–761. DOI: 10.1093/ajh/hpy040.
4. Atkins E. R., Chow C. K. Low-dose combination therapy for initial treatment of hypertension. *Current Hypertension Reports*. 2020;22(9):65. DOI: 10.1007/s11906-020-01069-7.
5. Campbell N. R. C. A step in the global effort to control hypertension: Fixed dose combination antihypertensive drugs. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)*. 2019;21(9):1426–1428. DOI: 10.1111/jch.13683.
6. Tserkovnaya K. M., Kotsur Yu. M., Okovityi S. V., Ivkin D. Yu., Kulikov A. N., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Polypill concept in the treatment of arterial hypertension (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(5):577–582. DOI: 10.1007/s11094-022-02678-z.

7. Menditto E., Orlando V., De Rosa G., Minghetti P., Musazzi U. M., Cahir C., Kurczewska-Michalak M., Kardas P., Costa E., Sousa Lobo J. M., Almeida I. F. Patient centric pharmaceutical drug product design – The impact on medication adherence. *Pharmaceutics*. 2020;12(1):44. DOI: 10.3390/pharmaceutics12010044.
8. Mitra B., Chang J., Wu S. J., Wolfe C. N., Ternik R. L., Gunter T. Z., Victor M. C. Feasibility of mini-tablets as a flexible drug delivery tool. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;525(1):149–159. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.037.
9. Janczura M., Sip S., Cielecka-Piontek J. The development of innovative dosage forms of the fixed-dose combination of active pharmaceutical ingredients. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):834. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040834.
10. Luo Y., Ren L., Jiang M., Chu Y. Anti-hypertensive efficacy of amlodipine dosing during morning versus evening: A meta-analysis. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2019;20(2):91–98. DOI: 10.31083/j.rcm.2019.02.31814.
11. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. V. 2, 3. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. 7019 p. (In Russ.)
12. Kotsur Ju. M., Ladytko Ju. M., Narkevich I. A., Flisyuk E. V. Prediction of the composition of prolonged release tablets based on 4,4'-(propanoimid) sodium dibenzoate using the SeDeM method. *Drug development & registration*. 2021;10(4–1):54–62. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-54-62.
13. Rowe R. C., Sheskey P. J., Quinn M. E. Handbook of pharmaceutical excipients. Sixth edition. London: Pharmaceutical Press; 2009. 888 p.
14. Seo K. S., Bajracharya R., Lee S. H., Han H. K. Pharmaceutical application of tablet film coating. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):853. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090853.
15. Strelkova A. V., Flisyuk E. V. Problems of applying film coatings during scale-up technology. *Drug development & registration*. 2022;11(4): 150–159. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-150-159.
16. Shohin I. E., Ramenskaya G. V., Vasilenko G. F., Malashenko E. A. In vitro equivalence dissolution test and biopharmaceutical properties of Amlodipine drugs. *Pharmacy*. 2010;5:13–15. (In Russ.)
17. Smekhova I. E., Petrova Yu. M., Kondratieva I. A., Rodygina A. N., Turetskova N. N. The «Dissolution» test and modern approaches to assessing the equivalence of medicines. *Drug development & registration*. 2013;1(2):50–61. (In Russ.)
18. Benet L. Z., Sodhi J. K. Can in vitro-in vivo extrapolation be successful? Recognizing the incorrect clearance assumptions. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2022;111(5):1022–1035.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1467>
УДК 615.243; 615.453.6



Оригинальная статья / Research article

Критерии выбора технологии получения таблеток ребамипида, покрытых пленочной оболочкой

Г. В. Трусов^{1,2}, Б. В. Бровченко¹, Ж. М. Козлова², И. И. Краснюк²

¹ Общество с ограниченной ответственностью «АЗТ ФАРМА К.Б.», 123458, Россия, г. Москва, ул. Твардовского, д. 8, стр. 1, Технопарк «СТРОГИНО»

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

✉ Контактное лицо: Трусов Герман Владимирович. E-mail: gtrusov@azt.group

ORCID: Г. В. Трусов – <https://orcid.org/0009-0004-9285-2362>; Б. В. Бровченко – <https://orcid.org/0009-0005-4904-8253>;

Ж. М. Козлова – <https://orcid.org/0000-0003-1525-732X>; И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 25.04.2023

Статья принята в печать: 17.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. В настоящее время развитие фармацевтического рынка и жесткая конкуренция требуют от компаний, производящих лекарственные препараты (ЛП), более пристальной и детальной модернизации уже существующих производственных линий. Современной и экономичной технологией производства лекарственных форм является технология прямого прессования. Альтернативным подходом к оптимизации производства смесей, для которых ввиду физико-химических и технологических особенностей неприменимо использование технологии влажной грануляции или невозможно прямое прессование, может стать технология сухой грануляции методом компактирования.

Цель. Целью данной работы является изучение возможности получения таблеток ребамипида с применением технологии прямого прессования и технологии сухой грануляции методом компактирования с уходом от технологии влажной грануляции как от технологически сложного и экономически затратного метода, а также исследование влияния технологии на такие показатели качества, как распадаемость и растворение.

Материалы и методы. В качестве материалов использовался ребамипид (N-(4-хлорбензоил)-3-(2-оксо-1,2-дигидрохинолин-4-ил) аланин) (экспериментальный образец), МКЦ-102 (J. Rettenmaier & Söhne (JRS), Германия), крахмал прежелатинизированный (Colocon Ltd., Великобритания), коллидон SR (BASF, Германия), кроскармеллоза натрия (J. Rettenmaier & Söhne (JRS), Германия), безводная лимонная кислота (Scharlab S.L., Испания), натрия лаурилсульфат (BASF, Германия), аэросил 200 vv (Evonik Industries AG, Германия), натрия стеарилфумарат (J. Rettenmaier & Söhne (JRS), Германия), кальция стеарат (FACI, Италия), пленочное покрытие Вивакоат® ПА-1Р-000 (J. Rettenmaier & Söhne (JRS), Германия). В качестве оборудования использовался Y-образный смеситель (ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», Россия), ролл-компактор LGC100 (Beijing Gylongli Automation Tech. Co., Ltd., Китай), роторный таблеточный пресс PG16G (Beijing Gylongli Automation Tech. Co., Ltd., Китай), система для покрытия таблеток оболочкой Labcoat™ M (O'Hara Technologies Inc., Канада), антистатический ионизирующий пистолет Simco Cobra (Simco-Ion, Нидерланды), тестер сыпучести ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Германия), тестер насыпной плотности ERWEKA SVM 122 (ERWEKA GmbH, Германия), вибростеро CISA RP 200N (CISA Cedaceria Industrial S.L., Испания), прибор для определения прочности, диаметра и толщины таблеток SOTAX HT 10 (SOTAX AG, Швейцария), тестер растворения DT 626/1000HH (ERWEKA GmbH, Германия), тестер распадаемости ZT321 (ERWEKA GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение. В ходе ряда экспериментов методами прямого прессования и компактирования были получены таблетки-ядра, а также таблетки, покрытые пленочной оболочкой (ТППО). В результате изучения полученных таблеток было установлено, что при аналогичных составах таблетки, нарабатываемые методом компактирования, отличаются большим временем распадаемости и растворения по сравнению с таблетками, полученными прямым прессованием, что следует учитывать при планировании скорости высвобождения действующего вещества в ходе разработки лекарственных препаратов.

Заключение. В результате экспериментов, описанных в данной работе, было установлено, что существует прямая зависимость между использованием определенной технологии и влиянием ее на такие показатели качества, как распадаемость и растворение таблеток. Также установлено, что технология сухой грануляции позволяет получить более технологичную массу для таблетирования.

Ключевые слова: ребамипид, прямое прессование, сухая грануляция, таблетки, покрытие пленочной оболочкой

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

Вклад авторов. Б. В. Бровченко и Г. В. Трусов спланировали и разработали ход экспериментов. Г. В. Трусов проводил экспериментальные работы и анализировал полученные данные. Б. В. Бровченко и Г. В. Трусов участвовали в написании текста статьи. Ж. М. Козлова и И. И. Краснюк принимали участие в рецензировании статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

Для цитирования: Трусов Г. В., Бровченко Б. В., Козлова Ж. М., Краснюк И. И. Критерии выбора технологии получения таблеток ребамипида, покрытых пленочной оболочкой. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(4):165–172. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1467>

Technology Criteria for the Manufacturing of Rebamipide Film-coated Tablets

German V. Trusov^{1,2}, Bogdan V. Brovchenko¹, Zhanna M. Kozlova², Ivan I. Krasnyuk²

¹ LLC "AZT PHARMA K.B.". Technopark "STROGINO", 8/1, Tvardovskogo str., Moscow, 123458, Russia

² I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ Corresponding author: German V. Trusov. E-mail: gtrusov@azt.group

© Трусов Г. В., Бровченко Б. В., Козлова Ж. М., Краснюк И. И., 2023

© Trusov G. V., Brovchenko B. V., Kozlova Z. M., Krasnyuk I. I., 2023

ORCID: German V. Trusov – <https://orcid.org/0009-0004-9285-2362>; Bogdan V. Brovchenko – <https://orcid.org/0009-0005-4904-8253>;
Zhanna M. Kozlova – <https://orcid.org/0000-0003-1525-732X>; Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 25.04.2023 Revised: 17.11.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. The current growth of the pharmaceutical market and stiff competition require from drug manufacturers make a more detailed and thorough fine-tuning of existing production lines. Direct compression technology is a modern and cost-effective technology for solid dosage form drug manufacturing. Roll-compaction technology (dry granulation) can be an alternative approach to optimize the manufacturing of formulations, for which the use of wet granulation or direct compression technologies is not possible due to their physical and chemical properties.

Aim. The goal of this work is to investigate the possibility of manufacturing Rebamipide tablets by using direct compression technology and dry granulation technology (roll-compaction), avoiding such complicated and more expensive technology as wet granulation. Also aim of this work is study the impact of production methods on such quality factors as disintegration and dissolution time.

Materials and methods. In this study were used such materials as Rebamipide substance (α -[(4-Chlorobenzoyl)amino]-1,2-dihydro-2-oxo-4-quinolinepropanoic acid) (experimental sample), MCC-102 (J. Rettenmaier & Söhne (JRS), Germany), Starch pregelatinized (Colorcon LTD., England), Kollidone SR (BASF, Germany), Croscarmellose sodium (J. Rettenmaier & Söhne (JRS), Germany), Anhydrous citric acid (Scharlau), Sodium lauryl sulfate (BASF, Germany), Aerosil 200 vv Pharma (Evonik Industries AG, Germany), Sodium stearyl fumarate (J. Rettenmaier & Söhne (JRS), Germany), Calcium stearate (FACI, Italy), Film coating VIVACOAT® PA-1P-000 (J. Rettenmaier & Söhne (JRS), Germany). Also were used such equipment as Y shape blender («AZT FARMA K.B.», Russia), roll compactor LGC100 (Beijing Gylongli Automation Tech. Co., Ltd, China), rotary tablet press PG16G (Beijing Gylongli Automation Tech. Co., Ltd, China), tablet coating system Labcoat™ M (O'Hara Technologies Inc, Canada), ionising air gun Simco Cobra (Simco-Ion, Netherlands), flowability tester ERWEKA GT (ERWEKA GmbH, Germany), powder density tester ERWEKA SVM 122 (ERWEKA GmbH, Germany), vibrating sieve CISA RP 200N (CISA Cedacera Industrial S.L., Spain), tablet hardness, thickness and height tester SOTAX HT 10 (SOTAX AG, Switzerland), dissolution tester DT 626/1000HH (ERWEKA GmbH, Germany) and disintegration tester ZT321 (ERWEKA GmbH, Germany).

Results and discussion. In a series of experiments were obtained tablet's cores and film coated tablets by direct compression and roll-compaction methods. Experimentally it was found, that in tablets with similar formulations roller compaction technology provides slower disintegration and dissolution time, compared to direct compression method. This fact should be taken into account during drug development when planning the rate of release of the active ingredient.

Conclusion. As a result of the experiments it was shown a direct correlation between the use of a certain technology and its impact in such quality indicators as disintegration and dissolution time of tablets. It was also found that dry granulation technology provides a more technologically suitable tablet mass.

Keywords: Rebamipide, direct compression, dry granulation, film-coated 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. Bogdan V. Brovchenko and German V. Trusov planned and developed the design of the experiments. German V. Trusov performed experimental work and reviewed the data obtained. Bogdan V. Brovchenko and German V. Trusov participated in the text writing of the article. Zhanna M. Kozlova and Ivan I. Krasnyuk participated in the article reviewing. All authors participated in the discussion of the results and writing of the article.

For citation: Trusov G. V., Brovchenko B. V., Kozlova Z. M., Krasnyuk I. I. Technology criteria for the manufacturing of rebamipide film-coated tablets. *Drug development & registration*. 2023;12(4):165–172. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1467>

ВВЕДЕНИЕ

Современное развитие фармацевтического рынка в части технологического разнообразия и высокая конкуренция среди производителей требуют от разработчиков ЛП проведения постоянного поиска новых технологических подходов и типов вспомогательного сырья, а также совершенствования и удешевления существующих производств. Пристального внимания заслуживает метод прямого прессования, поскольку он является одним из самых актуальных, постоянно модернизируется за счет обновления оборудования и увеличения ассортимента вспомогательных веществ. Данный метод производства является не только экономически выгодным, но и обеспечивает большую экологичность производства. Тем не менее в настоящее время, в условиях эко-

номических санкций и отказа ряда иностранных производителей вспомогательных компонентов поставлять готовые решения для технологии прямого прессования на рынок РФ, многие разработчики сталкиваются с ситуацией, когда предложенный состав с использованием готовых комплексных решений после завершения процедуры государственной регистрации ЛП может быть недоступен производителю, что приведет к невозможности использования метода прямого прессования. Указанные риски заставляют разработчиков искать альтернативные решения, особенно при невозможности применения влажной грануляции для ряда действующих веществ ввиду их гигроскопичности или деградации в присутствии воды. Таким решением может стать сухая грануляция методом компактирования.

Следует отметить, что технология компактирования порошков также является одним из возможных решений по оптимизации фармацевтического производства, поскольку, помимо экономического эффекта, может решать задачи таблетирования для некоторых продуктов, для которых ввиду физико-химических особенностей классический метод сухой грануляции – получение таблеток-брикетов (брикетирование) с последующим размолотом – неприменим [1–3].

В последнее время в технологии прямого прессования используют давно известные вспомогательные вещества в новых формах готовых комплексных продуктов (МКЦ [4], натрия лаурилсульфат, кукурузный крахмал, кремния диоксид коллоидный и др.), которые применимы и в технологии получения таблеток методом компактирования в классическом виде, что позволяет снизить риски при выборе состава, в частности, для воспроизведенных препаратов. Возможность использовать одни и те же вспомогательные вещества при применении различных технологий позволяет при анализе рисков, опираясь на целевой профиль качества препарата, надлежащим образом определить методологические подходы и технологические параметры изготовления будущего лекарственного средства [5].

При разработке твердых лекарственных форм, на наш взгляд, критическими показателями качества являются распадаемость и растворение. Первый параметр можно отнести к параметру предварительной оценки процесса растворения и, соответственно, к процессу высвобождения активных компонентов. Контроль второго параметра необходим для достижения требуемой скорости высвобождения активной фармацевтической субстанции (АФС) в среде растворения за определенный промежуток времени [6–8].

Для проведения данных экспериментальных работ была выбрана субстанция ребамипида, которая обладает гастропротекторными и цитопротекторными свойствами [9, 10]. Разработка новых препаратов данной группы в настоящее время является актуальной. Однако в большинстве случаев при производстве препаратов ребамипида применима только технология влажной грануляции, так как субстанция имеет форму удлиненных пластинчатых кристаллов [11], то есть анизодиаметрическую (неправильную). Такие субстанции, как известно, обладают негативными технологическими характеристиками.

Целью данной работы является изучение возможности получения таблеток ребамипида методами прямого прессования и сухой грануляцией с возможностью ухода от технологии влажной грануляции как от технологически сложного и экономически затратного метода, а также изучение влияния технологии на такие показатели качества, как распадаемость и растворение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – таблетки ребамипида, покрытые пленочной оболочкой, которые были получены двумя способами – методом прямого прессования и сухой грануляции.

АФС ребамипид (экспериментальный образец) – кристаллический порошок белого цвета, без запаха, с горьким вкусом. Растворим в диметилформамиде, очень мало растворим или практически нерастворим в метаноле и спирте 96%-м, практически нерастворим в воде.

В качестве вспомогательных веществ использовались:

- МКЦ-102 (микрористаллическая целлюлоза) – обладает средним размером частиц и сочетает в себе хорошую сыпучесть и прессуемость¹. В составе таблеток ребамипида выполняет роль наполнителя, позволяющего улучшить технологические характеристики АФС и массы для таблетирования.
- Крахмал прежелатинизированный – позволяет уменьшить количество опудривающих компонентов, так как сам частично выполняет эту функцию². В данном составе выполняет роль наполнителя, позволяющего улучшить технологические характеристики АФС и массы для таблетирования.
- Коллидон SR – выполняет роль связующего, позволяющего получить таблетки с необходимыми показателями прочности и истираемости. Применим для различных видов технологий³.
- Кроскармеллоза натрия – выполняет роль дезинтегранта, позволяющего получить таблетки с необходимыми значениями времени распадаемости и растворения, так как может использоваться как в технологии влажной грануляции, так и в технологии прямого прессования⁴.
- Лимонная кислота безводная – выполняет роль регулятора кислотности, позволяющего получить таблетки с необходимым значением времени растворения⁵.

¹ JRS PHARMA. Available at: https://www.jrspharma.com/pharma_en/products/excipients/vivapur.php. Accessed: 27.09.2023.

² Colorcon. Available at: <https://www.colorcon.com/markets/pharmaceuticals/excipients/tablets/starch-1500>. Accessed: 27.09.2023.

³ BASF. Available at: <https://pharma.basf.com/products/kollidon-sr>. Accessed: 27.09.2023.

⁴ JRS PHARMA. Available at: https://www.jrspharma.com/pharma_en/products/excipients/vivasol.php. Accessed: 27.09.2023.

⁵ Rowe C. R., Sheskey P. J., Quinn M. E., editors. Handbook of pharmaceutical excipients. London: Pharmaceutical Press; 6th ed., 2009, 888 p. Available at: https://www.academia.edu/27602529/Handbook_of_Pharmaceutical_Excipients_6th_Edition. Accessed: 27.09.2023.

- Натрия лаурилсульфат – применяется в данной рецептуре как солюбилизатор (для улучшения растворимости АФС), также может выполнять роль опудривающего вещества¹.
- Аэросил 200 vv – выполняет роль скользящего, позволяющего улучшить технологические характеристики АФС и массы для таблетирования².
- Кальция стеарат – выполняет роль опудривающего, позволяющего улучшить внешний вид таблеток и избежать проблем в процессе таблетирования (например, возможное налипание массы на пресс-инструмент)³.
- Натрия стеарилфумарат – применяется как опудривающее вещество в тех случаях, когда другие вспомогательные вещества аналогичного действия несовместимы с АФС⁴. Вводился в состав помимо кальция стеарата ввиду того, что опудривающих свойств кальция стеарата недостаточно.
- Пленочное покрытие – в составе препарата выполняет эстетическую функцию, блокирует запах, защищает от воздействия света, а также способствует улучшению стабильности препарата. В качестве растворителя при приготовлении суспензии пленочного покрытия использовали воду.

В технологическом процессе использовались:

- Y-образный смеситель производства «АЗТ ФАРМА К.Б.» (смешивание компонентов);
- ролл-компактор LGC100 производства Beijing Gylongli Automation Tech. Co., Ltd., Китай (сухая грануляция методом компактирования);
- роторный таблеточный пресс PG16G производства Beijing Gylongli Sci. & Tech. Co., Ltd., Китай;
- система для покрытия таблеток оболочкой Labcoat™ M производства O'Hara Technologies Inc., Канада.

Параметры смешивания, грануляции (где она присутствовала), таблетирования и нанесения покрытия были идентичны для всех наработок.

Массы для таблетирования, полученные с помощью прямого смешивания и с применением стадии сухого гранулирования, анализировали по показателям насыпной плотности (до/после уплотнения), сыпучести (рассчитывали индекс Карра и число Хауснера) и фракционному составу в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XIV изд.:

¹ BASF. Available at: <https://pharma.basf.com/products/kolliphor-sls>. Accessed: 27.09.2023.

² EVONIK. Available at: https://www.silica-specialist.com/en/product/PR_52001873. Accessed: 27.09.2023.

³ Rowe C.R., Sheskey P.J., Quinn M.E., editors. Handbook of pharmaceutical excipients. London: Pharmaceutical Press; 6th ed., 2009, 888 p. Available at: https://www.academia.edu/27602529/Handbook_of_Pharmaceutical_Excipients_6th_Edition. Accessed: 27.09.2023.

⁴ JRS PHARMA. Available at: https://www.jrspharma.com/pharma_en/products/excipients/pruv.php. Accessed: 27.09.2023.

- Тестирование сыпучести и насыпной плотности осуществляли в соответствии с ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков», применяя три повторности для каждого эксперимента. Для определения насыпной плотности использовали оборудование ERWEKA SVM 122, а для сыпучести – ERWEKA GT.
- Расчет индекса Карра и числа Хауснера происходит по следующим формулам:

$$IC = \frac{D_c - D_a}{D_c} \cdot 100 \%,$$

$$IH = \frac{D_c}{D_a},$$

где D_a – насыпная плотность до уплотнения; D_c – насыпная плотность после уплотнения; IC – индекс Карра; IH – число Хауснера.

- Определение фракционного состава осуществляли в соответствии с ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ», применяя три повторности для каждого эксперимента. Для определения фракционного состава использовали вибросито CISA RP 200N.
- Тестирование времени распадаемости осуществляли в соответствии с ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» на 6 таблетках, покрытых пленочной оболочкой, для каждого эксперимента. Для определения распадаемости использовали оборудование ERWEKA ZT321. Результаты исследования представлены на рисунке 1.
- Изучение времени растворения проводилось на оборудовании ERWEKA DT 626/100HN с установкой перемешивающего устройства типа «лопастная мешалка» в соответствии с ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Для получения наиболее достоверных данных использовали 6 таблеток. Скорость вращения мешалки составляла 50 об/мин, в качестве среды растворения выступал фосфатный буфер с pH = 7,2, объем среды – 900 мл. Время проведения теста – 45 минут. Результаты исследования представлены на рисунке 2. Для удобства чтения данных график высвобождения по каждому эксперименту построен по среднему арифметическому из полученных значений высвобождения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед получением масс для таблетирования различными методами были изучены технологические свойства АФС. Результаты исследования описаны в таблице 1.

Исходя из полученных результатов исследований, можно сделать вывод, что субстанция представляет собой несипучий порошок с низкой насыпной плотностью. Согласно насыпному объему и расчету коэф-

фициента прессуемости, степень сыпучести субстанции-порошка низкая. Отсутствие сыпучести и наличие статики может негативно сказаться на однородности распределения (количественном содержании) в массе для таблетирования и, соответственно, таблетках-ядрах, особенно при использовании технологии прямого прессования.

Таблица 1. Технологические характеристики АФС (средний показатель \pm SN, n = 3)

Table 1. Technological characteristics of APS (average \pm SN, n = 3)

	АФС ребамипид API Rebamipide
Насыпная плотность, г/мл (до уплотнения/ после) Bulk and tapped density, g/ml	0,12 \pm 0,06 / 0,17 \pm 0,08
Сыпучесть (г/с) Flowability (g/s)	\emptyset 10 – 0 \emptyset 15 – 0
Фракционный состав (было отмечено, что частицы, находящиеся на ситах с размером ячеек 0,5 и 0,2 мм, продавливаются через ячейки при ручном воздействии) Particle size distribution (it was noticed, that particles on 0,5 mm and 0,2 mm sieves could be pushed through by manual action)	0,5–1,0 мм – 46,89 %; 0,2–0,5 мм – 53,11 %; <0,2 мм – 0,00 % 0,5–1,0 мм – 46,89 %; 0,2–0,5 мм – 53,11 %; <0,2 мм – 0,00 %
Потеря в массе при высушивании, % Loss on drying, %	<1
Индекс Карра, % Carr Index, %	1,42 \pm 0,07
Число Хауснера Hausner ratio	29,0 \pm 0,92

При выборе состава таблеток, покрытых пленочной оболочкой, использовали современные вспомогательные вещества, способные корректировать технологические свойства субстанции. Подбор вспомогательных компонентов был осуществлен ранее и производился исходя из полученных результатов технологических характеристик АФС, а также с учетом требований к готовой лекарственной форме. Выбранные составы описаны в таблице 2.

Массы для таблетирования для прямого прессования получали путем последовательного смешивания компонентов в Y-образном смесителе. На первой стадии АФС смешивали с наполнителями (МКЦ-102 и крахмал прежелатинизированный). Затем добавляли связующее (коллидон SR), дезинтегрант (кроскармеллоза натрия, в случае ее присутствия в составе) и солилизатор (натрия лаурилсульфат). На следующей стадии вводили скользящее (аэросил 200vv, в случае его присутствия в составе). На предпоследней стадии вводили первое опудривающее (натрия стеарилфумарат). На завершающей стадии к смеси добавляли второе опудривающее (кальция стеарат).

Для получения наиболее технологичных по характеристикам масс для таблетирования с помощью компактирования часть компонентов вносилась экстрагранулярно, а часть – интрагранулярно. В первом составе для этого пополам разделяли кроскармеллозу натрия, натрия стеарилфумарат полностью вносили интрагранулярно, а кальция стеарат – экстра-

гранулярно. Во втором составе пополам разделяли аэросил 200vv. Натрия стеарилфумарат и кальция стеарат вносили аналогично первому составу.

Таблица 2. Составы ТППО, которые получали с помощью технологии прямого прессования и технологии компактирования

Table 2. Film-coated tablet formulations, manufactured by direct compression and roller compaction technology

	Состав № 1 Formulation № 1	Состав № 2 Formulation № 2
АФС API		
Ребамипид, мг (ФС 000951-231014) Rebamipide, mg (FS 000951-231014)	100,00	
Вспомогательные вещества Excipients		
МКЦ-102, мг (Ph.Eur. или USP) MCC-102, mg (Ph.Eur. or USP)	64,80	55,20
Крахмал прежелатинизированный, мг (Ph.Eur. или USP) Starch pregelatinized, mg (Ph.Eur. or USP)	39,70	44,50
Коллидон SR, мг (Ph.Eur. или USP) Kollidon SR, mg (Ph.Eur. or USP)	19,20	24,00
Кроскармеллоза натрия, мг (Ph.Eur. или USP) Croscarmellose sodium, mg (Ph.Eur. or USP)	4,80	–
Лимонная кислота безводная, мг (Ph.Eur. или USP) Citric acid anhydrous, mg (Ph.Eur. or USP)	2,30	2,30
Натрия лаурилсульфат, мг (Ph.Eur. или USP) Sodium lauryl sulfate, mg (Ph.Eur. or USP)	2,00	2,00
Аэросил 200vv, мг (Ph.Eur. или USP) Aerosil 200vv, mg (Ph.Eur. or USP)	–	4,80
Натрия стеарилфумарат, мг (Ph.Eur. или USP) Sodium stearyl fumarate, mg (Ph.Eur. or USP)	4,80	4,80
Кальция стеарат, мг (Ph.Eur. или USP) Calcium stearate, mg (Ph.Eur. or USP)	2,40	2,40
Масса таблетки-ядра, мг Tablet core mass, mg	240,00	
Пленочное покрытие, мг (Спецификация фирмы) Film coat, mg (Firm specification)	7,20	7,20
Масса таблетки ППО, мг Film coated tablet mass, mg	247,20	

Процесс компактирования на ролл-компакторе LGC100 на обеих массах проходил аналогично. Пластика формировалась однородно, без расслоения и без изменения толщины. Для формирования гранул была установлена сетка с размером ячеек 1,5 мм.

Результаты анализа масс по технологическим показателям приведены в таблице 3.

Как видно из результатов тестирования технологических параметров, массы, полученные технологией сухой грануляцией, имеют лучшие технологи-

Таблица 3. Сравнение наработанных масс по технологическим характеристикам (средний показатель \pm SN, $n = 3$)

Table 3. Technological characteristics comparison of manufactured formulations (average \pm SN, $n = 3$)

	Состав № 1 (прямое прессование) Formulation № 1 (direct compression)	Состав № 1 (компактирование) Formulation № 1 (roll-compaction)	Состав № 2 (прямое прессование) Formulation № 2 (direct compression)	Состав № 2 (компактирование) Formulation № 2 (roll-compaction)
Насыпная плотность, г/мл (до уплотнения/после) Bulk and tapped density, g/ml	0,18 \pm 0,3 / 0,29 \pm 0,12	0,35 \pm 0,04 / 0,49 \pm 0,25	0,20 \pm 0,08 / 0,30 \pm 0,24	0,47 \pm 0,77 / 0,60 \pm 0,35
Сыпучесть (г/с) Flowability (g/s)	\varnothing 10 – 0 \varnothing 15 – 0	\varnothing 10 – 5,70 \pm 0,56 \varnothing 15 – 13,54 \pm 0,02	\varnothing 10 – 0 \varnothing 15 – 0	\varnothing 10 – 14,32 \pm 0,03 \varnothing 15 – 20,83 \pm 0,24
Фракционный состав Particle size distribution	0,5–1,0 мм – 1,34 %; 0,2–0,5 мм – 75,19 %; <0,2 мм – 23,47 % 0,5–1,0 мм – 1,34 %; 0,2–0,5 мм – 75,19 %; <0,2 мм – 23,47 %	1,0–1,5 мм – 3,55 %; 0,5–1,0 мм – 22,28 %; 0,2–0,5 мм – 54,05 %; <0,2 мм – 20,12 % 1,0–1,5 мм – 3,55 %; 0,5–1,0 мм – 22,28 %; 0,2–0,5 мм – 54,05 %; <0,2 мм – 20,12 %	0,5–1,0 мм – 0,93 %; 0,2–0,5 мм – 68,64 %; <0,2 мм – 30,43 % 0,5–1,0 мм – 0,93 %; 0,2–0,5 мм – 68,64 %; <0,2 мм – 30,43 %	1,0–1,5 мм – 7,80 %; 0,5–1,0 мм – 27,55 %; 0,2–0,5 мм – 34,70 %; <0,2 мм – 29,95 % 1,0–1,5 мм – 7,80 %; 0,5–1,0 мм – 27,55 %; 0,2–0,5 мм – 34,70 %; <0,2 мм – 29,95 %
Индекс Карра, % Carr Index, %	1,61 \pm 0,08	1,40 \pm 0,05	1,50 \pm 0,31	1,28 \pm 0,55
Число Хауснера Hausner ratio	38 \pm 0,01	29 \pm 0,06	33 \pm 0,24	22 \pm 0,77
Заключение о сыпучести по индексам Summary of flowability according to values	Очень, очень плохая Very, very poor	Плохая Poor	Очень плохая Very poor	Умеренная Passable

ческие характеристики. Для дальнейшего получения таблеток были использованы оба состава, полученные сухой грануляцией, и состав № 2, полученный прямым смешиванием.

Процесс таблетирования осуществляли на роторном таблеточном прессе. На пресс устанавливали все 16 станций пресс-инструмента (ПИ) 9 мм с установкой бункера и питателя с двумя ворошителями. Поскольку дозирование в данном прессе осуществляется по объему, такие параметры, как объем заполнения, усилие предварительного и усилие основного прессования, подбирались таким образом, чтобы получить таблетку, которая будет выдерживать испытание на истираемость (не более 1 % потери в массе) и распадаемость (не более 15 минут для таблеток-ядер и не более 30 минут для ТППО). Скорость ротора и скорость вращения ворошителей в питателе подбирались и корректировались в соответствии с результатами промежуточного контроля масс таблеток-ядер [масса таблеток-ядер должна была держаться в диапазоне 222–258 мг ($240 \pm 7,5$ %)]. Свойства полученных таблеток-ядер описаны в таблице 4.

Как видно из табличных данных, представленные составы хорошо прессуются и держат массу. Полученные таблетки покрывались пленочной оболочкой в системе для покрытия таблеток оболочкой Lab-coat™ M (O'Hara Technologies Inc., Канада).

Полученные таблетки имели круглую, двояковыпуклую форму, были покрыты пленочной оболочкой белого цвета, поперечный срез был белым или почти белым.

Важными критериями выбора оптимальной технологии получения таблеток ребамипида, покрытых пленочной оболочкой, на наш взгляд, являются такие показатели качества, как распадаемость и растворение таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Оценку качества по данным показателям проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

Как видно на рисунке 1, таблетки состава № 2, независимо от технологии получения, имели более длительное время распадаемости. На втором составе видно, что компактирование позволяет получить более медленное время распадаемости (среднее время для состава № 1: компактирование ($3,53 \pm 0,24$) мин, для состава № 2: прямое прессование ($7,12 \pm 0,26$) мин, компактирование ($9,01 \pm 0,35$) мин).

Из представленных данных на рисунке 2 видно, что скорость высвобождения АФС коррелирует с полученными результатами теста распадаемости. Высвобождение из состава № 1, полученного методом компактирования, к 5-й минуте составляет $83,80 \pm 0,71$ %. Высвобождение из состава № 2, полученного методом прямого прессования, к 5-й минуте составляет $51,33 \pm 0,57$ %, а методом компактирования – $32,57 \pm 0,22$ %.

В связи с представленными результатами можно сделать вывод о том, что наработанные таблетки, покрытые пленочной оболочкой, соответствуют критериям приемлемости по времени распадаемости и растворения. Следует отметить, что по полученным данным прослеживается следующая закономерность: использование технологии сухой грануляции (компактирования) замедляет процесс высвобождения АФС в сравнении с технологией прямого прессования.

Таблица 4. Характеристики полученных таблеток-ядер

Table 4. Core tablets parameters

Наименование показателя Quality control name	Регламентные данные Standard values	Фактические данные Actual values		
		Состав № 1 (компактирование) Formulation № 1 (roll-compaction)	Состав № 2 (прямое прессование) Formulation № 2 (direct compression)	Состав № 2 (компактирование) Formulation № 2 (roll-compaction)
Внешний вид Appearance	Круглые двояковыпуклые таблетки белого или почти белого цвета, без сколов, с гладкой однородной поверхностью, с ровными краями Round biconvex tablets, white or almost white, no chips, with smooth and homogenous surface and flat edges	Соответствует Conforms		
Средняя масса таблеток и отклонение от средней массы, мг Average tablet weight and weight deviation, mg	От 222 до 258 (240 ± 7,5 %) From 222 to 258 (240 ± 7.5 %)	246 (от 239 до 252) 246 (from 239 to 252)	244 (от 239 до 247) 244 (from 239 to 247)	244 (от 240 до 247) 244 (from 240 to 247)
Диаметр таблеток, мм Tablet diameter, mm	9,0	9,0		
Высота таблеток, мм Tablet height, mm	По факту In fact	От 3,79 до 3,85 From 3.79 to 3.85	От 3,80 до 3,86 From 3.80 to 3.86	От 3,80 до 3,86 From 3.80 to 3.86
Прочность таблеток на раздавливание, Н Crushing strength of tablets, N	≥80	От 73 до 146 From 73 to 146	От 121 до 124 From 121 to 124	От 91 до 127 From 91 to 127
Усилие прессования, кН Compression force, kN	≤20	14,0–14,3	13,4	14,5
Истираемость, % Abrasion, %	≤1	0,11	0,13	0,16

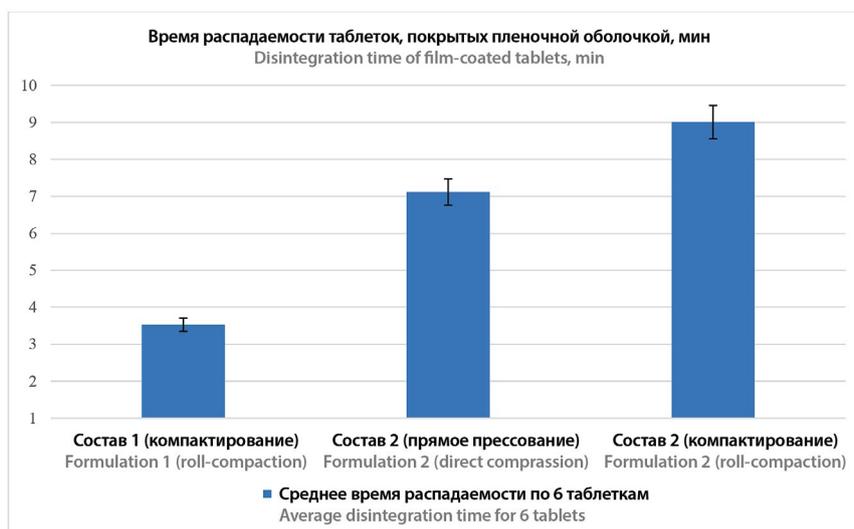


Рисунок 1. Результаты оценки качества таблеток ребамипида, покрытых пленочной оболочкой, по показателю «Распадаемость таблеток и капсул» (средний показатель ±SN, n = 6)

Figure 1. Results of evaluation of the quality of Rebamipide film-coated tablets according to the parameter "Disintegration of tablets and capsules" (average ±SN, n = 6)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных работ изучена возможность получения таблеток ребамипида с применением как технологии прямого прессования, так и

технологии сухой грануляции методом компактирования с уходом от технологии влажной грануляции как от технологически сложного и экономически затратного метода. Были изучены технологические

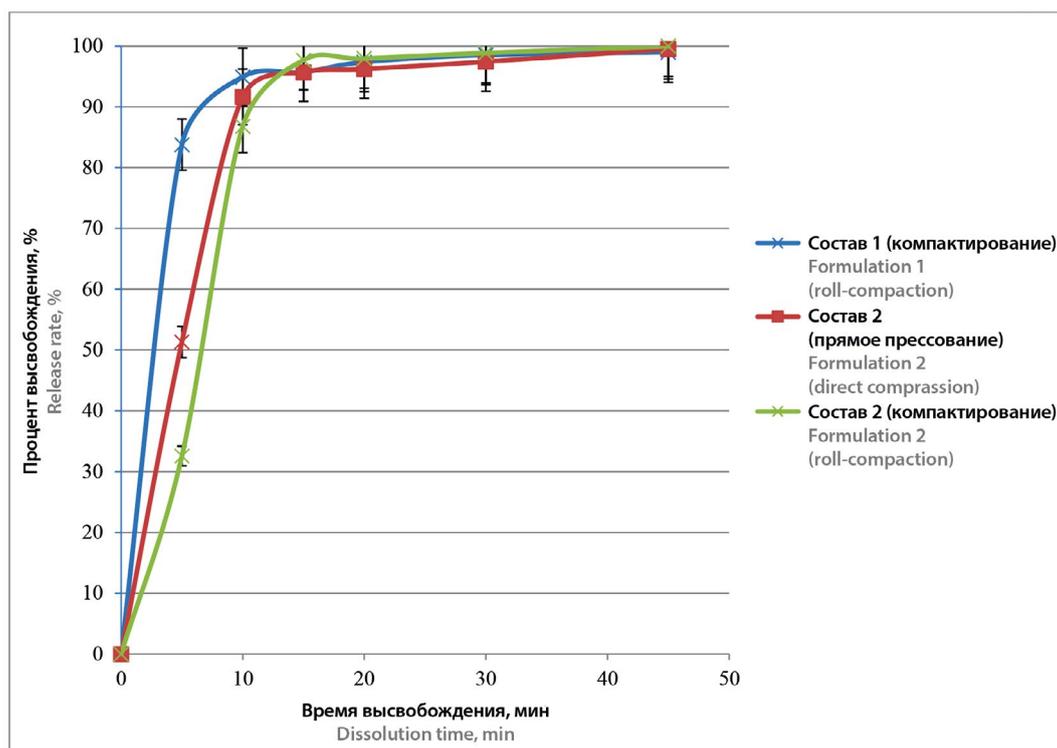


Рисунок 2. Результаты оценки качества таблеток ребамипида, покрытых пленочной оболочкой, по показателю «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (средний показатель \pm SN, $n = 6$)

Figure 2. Results of the evaluation of the quality of Rebamipide film-coated tablets according to the parameter "Dissolution test for solid dosage forms" (average \pm SN, $n = 6$)

свойства АФС ребамипида, что позволило скорректировать выбор вспомогательных веществ, которые можно использовать как для прямого прессования, так и для компактирования. Установлена возможность применения технологии прямого прессования и сухой грануляции для получения таблеток ребамипида, покрытых оболочкой. В ходе работы изучено влияние различных технологических подходов на такие показатели качества таблеток, как время распадаемости и растворения. Обоснован состав вспомогательных веществ и технологические подходы, которые могут позволить получить таблетки, соответствующие критериям приемлемости.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Diomina N. B. Pharmaceutical development: review of equipment for laboratory development and pilot batches production of solid dosage forms. *Drug development & registration*. 2016;(1):38–46. (In Russ.)
- Perez-Gandarillas L., Perez-Gago A., Mazor A., Kleinebudde P., Lecoq O., Michrafy A. Effect of roll-compactation and milling conditions on granules and tablet properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;106:38–49. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.05.020.
- Nesarikar V. V., Patel C., Early W., Vatsaraj N., Sprockel O., Jerzweski R. Roller compaction process development and scale up using Johanson model calibrated with instrumented roll data. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;436(1-2):486–507. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.027.
- Zhao H., Zhao L., Lin X., Shen L. An update on microcrystalline cellulose in direct compression: Functionality, critical material attributes, and co-processed excipients. *Carbohydrate Polymers*. 2022;278:118968. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118968.
- Dai S., Xu B., Zhang Z., Yu J., Wang F., Shi X., Qiao Y. A compression behavior classification system of pharmaceutical powders for accelerating direct compression tablet formulation design. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;572:118742. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118742.
- Costa P., Sousa Lobo J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;13(2):123–133. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
- Nickerson B., Kong A., Gerst P., Kao S. Correlation of dissolution and disintegration results for an immediate-release tablet. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;150:333–340. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.12.017.
- Markl D., Zeitler J. A. A Review of Disintegration Mechanisms and Measurement Techniques. *Pharmaceutical Research*. 2017;34(5):890–917. DOI: 10.1007/s11095-017-2129-z.
- Lee J. S., Jeon S. W., Lee H. S., Kwon Y. H., Nam S. Y., Bae H. I., Seo A. N. Rebamipide for the Improvement of Gastric Atrophy and Intestinal Metaplasia: A Prospective, Randomized, Pilot Study. *Digestive Diseases Sciences*. 2022;67(6):2395–2402. DOI: 10.1007/s10620-021-07038-7.
- Oh D. J., Yoon H., Kim H. S., Choi Y. J., Shin C. M., Park Y. S., Kim N., Lee D. H., Ha Y. J., Kang E. H., Lee Y. J., Kim N., Kim K. J., Liu F. The effect of rebamipide on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastro-enteropathy: a multi-center, randomized pilot study. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2022;37(6):1153–1166. DOI: 10.3904/kjim.2021.216.
- Xiong X., Xu K., Li S., Tang P., Xiao Y., Li H. Solid-state amorphization of rebamipide and investigation on solubility and stability of the amorphous form. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2017;43(2):283–292. DOI: 10.1080/03639045.2016.1239627

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1637>
УДК 57.088.2



Оригинальная статья / Research article

Разработка технологии сухого экстракта на основе биомассы каллусных культур *Scutellaria baicalensis*

А. А. Данилова✉, Н. С. Пивоварова, Е. В. Флисюк

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Данилова Александра Артёмовна. E-mail: shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

ORCID: А. А. Данилова – <https://orcid.org/0000-0002-0191-7342>; Н. С. Пивоварова – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 02.11.2023 Статья принята в печать: 15.11.2023 Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Исследования последних лет показали, что природные биологически активные вещества растений эволюционно более близки организму человека, чем синтетические. Они легко включаются в обменные процессы и практически не имеют побочных эффектов, а многие из них являются предшественниками физиологически активных веществ. Примером ценного лекарственного растительного сырья (ЛРС) являются корни шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*), в составе которых присутствуют видоспецифичные флавоноиды – байкалин и скутеллярин, обладающие потенциалом для создания противовирусных ЛС и систем функционального питания с антиоксидантными и адаптогенными свойствами. Для нивелирования существующих недостатков использования интактного растения в фармацевтической практике предложен природосберегающий и эргономичный подход к культивированию клеток шлемника байкальского в контролируемых условиях *in vitro*. Данная технология позволяет извлекать активные вещества *S. baicalensis* без нанесения ущерба окружающей среде и способствует сокращению времени наработки необходимого количества растительного материала с повышением эффективности производственных процессов.

Цель. Разработка технологии сухого экстракта на основе биомассы каллусных культур *S. baicalensis*.

Материалы и методы. Объект исследования – биомасса клеток *S. baicalensis*, полученная из каллусной культуры. *Функциональные характеристики* (сыпучесть, коэффициент Хауснера, индекс Карра, фракционный состав, а также пористость и гигроскопичность) биомассы шлемника байкальского и сухого экстракта на ее основе рассчитаны согласно методикам Фармакопеи ЕАЭС. Экстракция растительного материала осуществлялась методом мацерации при нагревании на водяной бане с обратным холодильником. Качественный и количественный анализ БАВ в составе сухого экстракта реализован методами спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Показатели качества и функциональные характеристики готового продукта оценивались в соответствии с фармакопейными требованиями.

Результаты и обсуждение. Проведена оценка функциональных характеристик биомассы шлемника байкальского, и подтверждена возможность получения сухого экстракта на ее основе. Подобраны параметры процесса извлечения БАВ, установлено присутствие байкалина в экстракте биомассы, и проведена сравнительная оценка профиля агликона в экстракте на основе каллусной культуры и корней шлемника байкальского. Оценены свойства готового продукта на предмет соответствия нормативным требованиям, а также технологические характеристики.

Заключение. Показатели качества сухого экстракта биомассы шлемника байкальского удовлетворяют нормативным требованиям, а технологические характеристики являются пригодными для использования полученного продукта в качестве фитосубстанции для разработки ЛС комбинированного типа и биологически активных добавок.

Ключевые слова: шлемник байкальский, каллусные культуры, биомасса растительных клеток, сухой экстракт, байкалеин, функциональные характеристики

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

Вклад авторов. Н. С. Пивоварова, А. А. Данилова, Е. В. Флисюк – постановка задачи, обсуждение планов экспериментальных работ. А. А. Данилова – выполнение эксперимента, обработка полученных данных. А. А. Данилова, Н. С. Пивоварова, Е. В. Флисюк – обсуждение и представление результатов, написание текста статьи.

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

Для цитирования: Данилова А. А., Пивоварова Н. С., Флисюк Е. В. Разработка технологии сухого экстракта на основе биомассы каллусных культур *Scutellaria baicalensis*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):173–180. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1637>

The Development of Dry Extract Technology from Callus Culture Biomass of *Scutellaria baicalensis*

Alexandra A. Danilova✉, Nadezhda S. Pivovarova, Elena V. Flisyuk

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

✉ Corresponding author: Alexandra A. Danilova. E-mail: shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

© Данилова А. А., Пивоварова Н. С., Флисюк Е. В., 2023

© Danilova A. A., Pivovarova N. S., Flisyuk E. V., 2023

ORCID: Alexandra A. Danilova – <https://orcid.org/0000-0002-0191-7342>; Nadezhda S. Pivovarova – <https://orcid.org/0000-0003-3020-8526>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 02.11.2023 Revised: 15.11.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Plant biologically active substances (BAS) are valuable for drug development in view of their pharmacological effects and metabolic proximity to the human body. As an example of a useful herbal raw material, the roots of *Scutellaria baicalensis*, which contain species-specific flavonoids, baicalin and scutellarin, possess the potency of creating antiviral drugs and functional nutrition systems with antioxidant and adaptogenic properties. In order to levelling the existing limitations of using intact plant in pharmaceutical practice, we proposed a nature-saving and ergonomic approach of cultivation of *S. baicalensis* cells under *in vitro* conditions. This technology allows to extract active substances of *S. baicalensis* without causing damage to the environment and contributes to the reduction of the time required to produce the necessary amount of plant material with an increase in the efficiency of production processes.

Aim. The development of dry extract technology from *S. baicalensis* callus biomass.

Materials and methods. The object of the study – biomass of *S. baicalensis* cells obtained from callus culture. Functional characteristics (friability, Hausner's coefficient, Carr's index, fractional composition, as well as porosity and hygroscopicity) of *S. baicalensis* biomass and dry extract on its basis were determined according to the methods of the EAEU Pharmacopoeia. Extraction of plant material was carried out by maceration method with heating in a water bath with reflux condenser. Qualitative and quantitative analysis of BAS in the dry extract was carried out by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. Quality indicators and functional characteristics of the finished product were evaluated in accordance with pharmacopoeial requirements.

Results and discussion. The functional characteristics of the *S. baicalensis* biomass were evaluated and the possibility of obtaining a dry extract on its basis was confirmed. We selected parameters of BAS extraction process, established the presence of baicalin in the biomass extract and carried out a comparative evaluation of aglycone profile in the extract based on callus culture and roots of intact plant. The properties of the finished product were evaluated for compliance with regulatory requirements, as well as technological characteristics.

Conclusion. The quality indicators of the dry extract of the *S. baicalensis* biomass satisfy the normative conditions. The technological characteristics of dry extract are suitable for the utilisation as a phytosubstance for the development of medicines of combined type and dietary supplements.

Keywords: Baikal skullcap, callus cultures, plant cell biomass, dry extract, baicalein, functional characteristics

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

Contribution of the authors. Nadezhda S. Pivovarova, Alexandra A. Danilova, Elena V. Flisyuk – problem statement, discussion of experimental plans. Alexandra A. Danilova – execution of the experiment, processing of the obtained data. Alexandra A. Danilova, Nadezhda S. Pivovarova, Elena V. Flisyuk – discussion and presentation of results, 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: Danilova A. A., Pivovarova N. S., Flisyuk E. V. The development of dry extract technology from callus culture biomass of *Scutellaria baicalensis*. *Drug development & registration*. 2023;12(4):173–180. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1637>

ВВЕДЕНИЕ

Биологически активные вещества (БАВ) растительного происхождения, или вторичные метаболиты, представляют существенный интерес для разработки лекарственных средств (ЛС) [1–3]. Причина повышенного внимания к фитосубстанциям заключается в разнообразии фармакологических эффектов и метаболитной близости к организму человека, что в конечном итоге определяет перспективность и востребованность растительных молекул [1, 3–5].

В контексте направленности населения на фитомедицину и принципы здорового образа жизни весьма ценным лекарственным растением является шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis*). В состав корней растения входят такие видоспецифичные флавоноиды, как байкалин и скутеллярин, осо-

бенно ценные в контексте создания противовирусных ЛС, адаптогенных пищевых добавок и систем функционального питания с антиоксидантными свойствами [6, 7]. С точки зрения промышленной технологии использование традиционных способов заготовки шлемника опосредует широкий круг проблем. Сокращение биоразнообразия, возможность выращивания *S. baicalensis* в строго определенных климатических зонах [8], обработка гербицидными и инсектицидными токсичными средствами, а также экономически невыгодное расширение производственных площадей ставят под сомнение использование данного вида лекарственного растительного сырья (ЛРС) в промышленной практике.

Для нивелирования существующих недостатков в настоящее время предложено использование междисциплинарных подходов, сочетающих в себе

принципы природосбережения и эффективной организации производственных процессов. Одним из альтернативных методов получения БАВ шлемника байкальского становится клеточная биотехнология, предполагающая выращивание биомассы растительных клеток *in vitro*. Благодаря обеспечению контролируемых условий растительные клетки в виде каллусной культуры приобретают кумулятивные функции и продуцируют большее количество вторичных метаболитов. То есть клеточная биомасса может быть использована в качестве альтернативного растительного сырья для получения ЛС, в том числе фитосубстанций в виде сухих экстрактов [9]. Такой подход, с одной стороны, позволяет извлекать активные вещества *S. baicalensis* без нанесения ущерба окружающей среде, а с другой – способствует сокращению времени наработки необходимого количества растительного материала и повышает эффективность производственных процессов.

Цель. Разработка технологии сухого экстракта на основе биомассы каллусных культур *Scutellaria baicalensis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Объектом исследования являлась биомасса каллусных культур *Scutellaria baicalensis*, предоставленная лабораторией культур растительных клеток кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Методы и оборудование

Для получения сухой биомассы шлемника байкальского клетки каллусной культуры в стационарной фазе роста переносили с поверхности питательной среды на нейлоновый фильтр 0,2 мкм Bottle Top (Corning, США), проводили вакуумную фильтрацию с последующей сушкой в сушильном шкафу ШС-80-01 (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 60 °С в течение 24 часов.

Определение фракционного состава порошка биомассы осуществляли с помощью набора сит (CISA Cedaceria Industrial S.L., Испания) согласно методике статьи 2.1.10.8. «Оценка распределения частиц по размеру методом аналитического просеивания»¹. Для расчета коэффициента Хауснера, числа Карра и внутренней пористости измеряли насыпную плотность порошка до уплотнения (D_a) и после уплотнения (D_c) с помощью тестера насыпной плотности ERWEKA SVM 221 (ERWEKA GmbH, Германия) по методике ста-

2.1.10.3. «Насыпная плотность и плотность после уплотнения»².

Коэффициент Хауснера (ИН) представляет собой косвенную характеристику сыпучести порошкообразного материала, размера и формы частиц и вычисляется в соответствии с формулой (1):

$$ИН = \frac{D_c}{D_a} \quad (1)$$

Индекс Карра (IC) характеризует сжимаемость частиц порошка, рассчитывается по формуле (2):

$$IC = 100 \cdot \frac{D_c - D_a}{D_c} \quad (2)$$

Для определения внутренней пористости (пространства между частицами порошка) использовали расчет по формуле (3):

$$I_e = \frac{D_c - D_a}{D_c \cdot D_a} \quad (3)$$

Сыпучесть биомассы *S. baicalensis* и экстрактов на ее основе определяли на тестере сыпучести порошков ERWEKA GTD-63150 (ERWEKA GmbH, Германия) по методике Фармакопеи ЕАЭС³.

Экстракцию материала проводили по следующей методике: 3 г измельченной биомассы (размер частиц 1–1,5 мм) помещали в круглодонную колбу со шлифом и заливали соответствующим количеством 70%-го спирта этилового. Проводили настаивание в течение 24 часов. Экстракцию осуществляли кипячением на водяной бане с обратным холодильником в течение заданного времени. Для оценки эффективности экстракции рассматривали варианты гидромодулей 1:10, 1:15, 1:30, 1:50 и 1:100 и длительности процесса в течение 30, 45, 60 и 90 минут. Полученные извлечения охлаждали при комнатной температуре и проводили вакуумное фильтрование. Отгон спирта осуществляли в вакуумно-роторном испарителе Hei-VAP Advantage (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия). Концентрированное извлечение центрифугировали MPW-380 (MPW Med. Instruments, Польша), осадок отбрасывали, супернатант собирали и трехкратно промывали гексаном (АО «ВЕКТОН», Россия) для удаления неполярных соединений. После очищенный экстракт выпаривали на водяной бане до сухого остатка при температуре 50 °С, а затем помещали в лиофильную сушилку FreeZone 2,5L (Lab-conco, США) на 24 часа.

²Статья 2.1.10.3. Насыпная плотность и плотность после уплотнения. Фармакопея ЕАЭС. Том 2. С. 133–136. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Ссылка активна на 07.11.2023.

³Статья 2.1.10.1. Фармакопея ЕАЭС. Том 2. Сыпучесть. С. 127–132. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Ссылка активна на 07.11.2023.

¹Статья 2.1.10.8. Оценка распределения частиц по размеру методом аналитического просеивания. Фармакопея ЕАЭС. Том 2. С. 152–157. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Ссылка активна на 07.11.2023.

Аналитическое исследование экстрактов биомассы *S. baicalensis* проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Prominence поколения LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония) с колонкой Supelcosil C18 (250 × 4,6, 5 мкм), оснащенном диодно-матричным детектором SPD-M20A, в градиентном режиме (условия приведены в таблице 1). Подвижная фаза А представлена 0,1 % об. трифторуксусной кислотой (Chemical Line, Россия) в сверхчистой деионизированной воде; подвижная фаза В – 0,1 % об. ТФУ в ацетонитриле (HPLC for UV/Gradient Grade, J.T. Baker, США), скорость подвижной фазы – 1 мл/мин. В качестве контроля использован экстракт на основе корней *S. baicalensis*, полученный по аналогичной методике.

Таблица 1. Условия проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиентном режиме

Table 1. Conditions of highperformance liquid chromatography in gradient mode

Состав подвижной фазы, %В Mobile phase composition, %B	5	5	100	100	5	5
Время, мин Time, min	0	5	45,75	50	60	65

Для спектрофотометрического анализа отбирали аликвоты экстракта в количестве 500 мкл, центрифугировали в течение 5 минут при скорости 13000 об/мин. Собирали супернатант, готовили спиртовое разведение (соотношение 1:250) и снимали спектры при аналитической длине волны 275 нм на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр», Россия). Количественное определение флавоноидов в пересчете на скутелларин и байкалин проводили по методике [8].

Сухой экстракт шлемника байкальского биомассы проверялся на соответствие показателям качества по методикам, описанными в статьях 2.5.1.37. «Экстракты»¹, 2.1.8.16. «Потеря в массе при высушивании»². Оценку содержания макро- и микроэлементов, в том числе тяжелых металлов, а также остаточных органических растворителей проводили в рамках договора Центра коллективного пользования СПХФУ посредством атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой и газовой хроматографии соответственно. Методики разработаны Центром контроля качества лекарственных средств СПХФУ.

¹ Статья 2.5.1.37. Экстракты. Фармакопея ЕАЭС. Том 2. С. 411–413. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Ссылка активна на 07.11.2023.

² Статья 2.1.8.16. Потеря в массе при высушивании экстрактов. Фармакопея ЕАЭС. Том 1. С. 411–413. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Ссылка активна на 07.11.2023.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с помощью программного обеспечения R-Studio (R Foundation for Statistical Computing, Австрия) в соответствии с требованиями Фармакопеи ЕАЭС³.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биомасса шлемника байкальского представляет порошок с крупнодисперсными частицами среднего размера, обладающий хорошими свойствами сыпучести (таблица 2). Рассчитанные значения сыпучести, коэффициентов Хауснера и индекса Карра подтверждают возможность использования биомассы в качестве пористого растительного материала с достаточной для экстракции площадью поверхности частиц.

Таблица 2. Характеристики порошкообразного материала биомассы шлемника байкальского

Table 2. Characteristics of *S. baicalensis* biomass powdered material

Показатель Parameter	Единица измерения Unit of measurement	Значение Value	
		Размер отверстий сита, мм Sieve openings size, mm	Массовая доля порошка, % Powder mass fraction, %
Фракционный состав Particle size fraction		< 0,25	4,67
		0,25	9,82
		0,5	4,52
		0,8	0,64
		1	15,23
		1,5	60,14
Насыпная плотность до уплотнения (D ₁) Bulk density (D ₁)	г/см ³ g/cm ³	0,612 ± 0,001	
Насыпная плотность после уплотнения (D ₂) Tapped density (D ₂)	г/см ³ g/cm ³	0,669 ± 0,001	
Сыпучесть (t ^{fl}) Flowability (t ^{fl})	г/с g/sec	4,12 ± 0,32	
Индекс Карра (IC) Carr Index (IC)	–	9,31	
Коэффициент Хауснера (IH) Hausner ratio (IH)	–	1,09	
Пористость Porosity	–	0,14	
Потеря в массе при высушивании Loss on drying	%	0,99 ± 0,01	
Гигроскопичность Hygroscopicity	%	3,15 ± 0,08	

³ Статья 2.3.13.0. Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний. Фармакопея ЕАЭС. Том 2. С. 213–235. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/9de/2-chast-1-toma-Farmakopei-Soyuza-_s-vozmozhnostyu-poiska_.pdf. Ссылка активна на 07.11.2023.

При разработке технологии сухого экстракта биомассы шлемника использован метод интенсификации классического варианта мацерации – кипячение на водяной бане с обратным холодильником. Выбор в качестве экстрагента спирта этилового 70%-го связан с высокой извлекающей способностью в отношении флавоноидов [10]. Изучение кинетики экстракции для каждого варианта соотношения сырья и экстрагента осуществляли посредством отбора проб в установленные временные контрольные точки и снятия спектров водно-спиртовых извлечений (рисунок 1). Самые низкие значения оптической плотности характерны для варианта гидро модуля 1:10 ($0,3045 \pm 0,0813$). Это может быть связано с небольшой скоростью диффузии экстрагента через микропористую структуру биомассы недифференцированных клеток. Наибольшая оптическая плотность ($0,6653 \pm 0,0047$) отмечена для образца с гидро модулем 1:50, который выбран для дальнейшей разработки технологии.

Эффективным временем экстракции для всех образцов является контрольная точка – 60 минут. Исходя из полученных значений, для извлечения БАВ полифенольной природы 70%-м этанолом предлагается использовать следующий набор параметров: гидро модуль 1:50 и длительность процесса 1 час.

Для подтверждения пригодности подобранных параметров проведен фитохимический скрининг экстракта биомассы методом аналитической ВЭЖХ на предмет качественного обнаружения БАВ. Известно, что флавоны байкалин и его агликон – байкалеин преобладают по количественному содержанию в интактном растении [6, 8]. Согласно данным хроматограмм, высота пиков указанных соединений значительно больше прочих, что косвенно подтверждает мажорность байкалина и его агликона в экстрактах корней *S. baicalensis* и каллусной биомассы (рисунок 2, табли-

ца 3). Высота пика байкалеина (312,5 мкВ) в экстракте биомассы значительно превышает высоту пика этого соединения (75 мкВ) в экстракте корней интактного растения. Предположительно, для биомассы клеток *S. baicalensis* характерно большее количество агликона в сравнении с подземными органами растения. Согласно данным [11], байкалеин лучше абсорбируется клетками кишечника при пероральном приеме, чем байкалин. Поэтому разработка технологии фитосубстанции, обогащенной данным агликоном, представляется перспективной для создания эффективных ЛС.

Таблица 3. Обнаруженные БАВ экстракта биомассы шлемника байкальского [8–10, 12, 13]

Table 3. Detected BAS in the *S. baicalensis* biomass extract [8–10, 12, 13]

Детектируемое вещество Detected substance	Стандарты Standards	Экстракт биомассы <i>S. baicalensis</i> Extract of <i>S. baicalensis</i> biomass
		Время удержания (t_r), с Retention time (t_r), s
Скутелларин Scutellarin	18,85	18,21
Лютеолин Luteolin	19,81	19,45
Салицилловая кислота Salicylic acid	20,04	20,06
Кверцетин Quercetin	21,60	21,32
Байкалин Baicalin	22,72	22,54
Кемпферол Kaempferol	23,48	23,43
Апигенин Apigenin	24,56	24,67
Байкалеин Baicalein	27,30	27,14

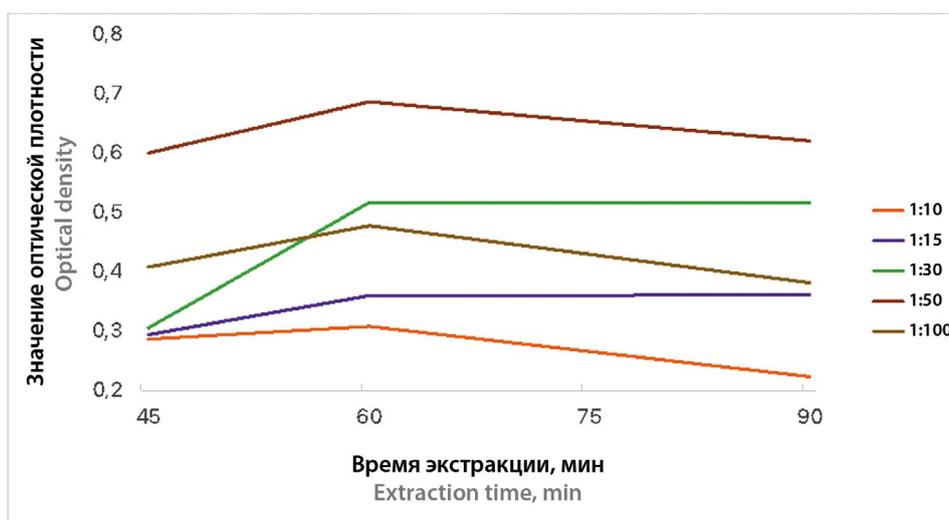


Рисунок 1. Изучение кинетики экстракции биомассы шлемника байкальского 70%-м спиртом этиловым

Figure 1. Study of extraction kinetics of *S. baicalensis* biomass with 70 % ethyl alcohol

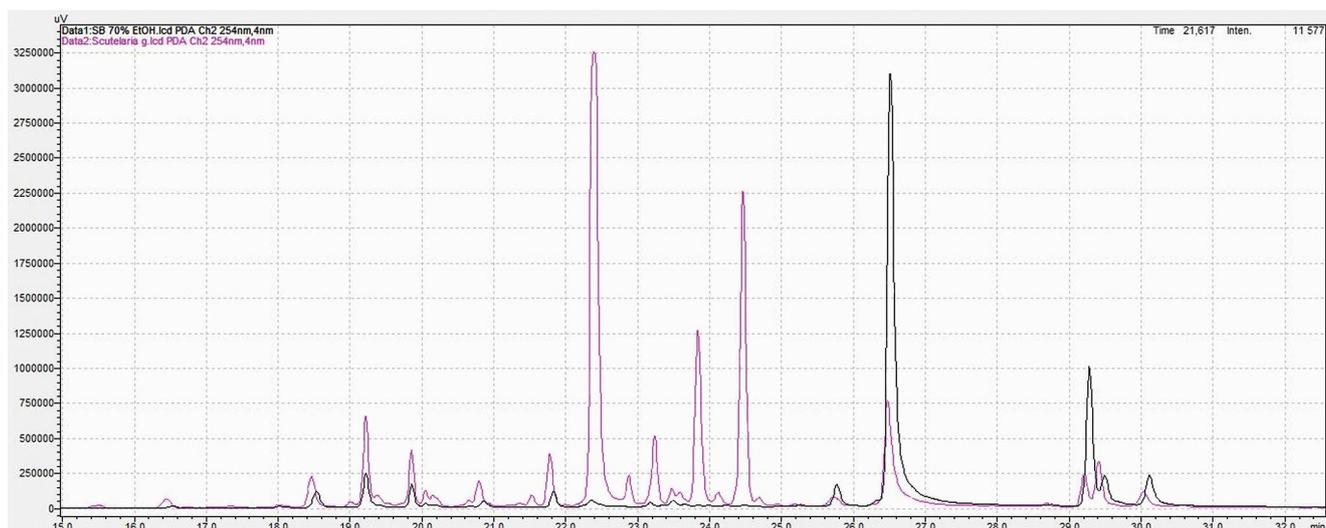


Рисунок 2. Результаты аналитической ВЭЖХ для извлечений на основе биомассы (черная линия) и корней *S. baicalensis* (розовая линия)

Figure 2. Analytical HPLC results for extracts based on the biomass (black line) and roots of *S. baicalensis* (pink line)

Сухой экстракт биомассы *S. baicalensis* представляет собой мелкодисперсный порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета с характерным запахом, обладающий свойствами гигроскопичности.

Содержание флавоноидов в сухом экстракте биомассы составило ($2,77 \pm 0,334$) % в пересчете на скутеллярин, ($4,56 \pm 0,348$) % в пересчете на байкалин (метрологические характеристики – таблицы 4, 5). Относительная ошибка определения не превышает 5 %, то есть находится в диапазоне случайной ошибки методики.

Таблица 4. Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов сухого экстракта биомассы *S. baicalensis* в пересчете на скутеллярин

Table 4. Metrological characteristics of the determination of the flavonoid sum calculated with reference to scutellarin in the dry extract of *S. baicalensis* biomass

Образец Sample	X, %	S ²	S _x	±Δx, %	E, %
Сухой экстракт биомассы <i>S. baicalensis</i> Dry extract of <i>S. baicalensis</i> biomass	2,77	0,219	0,148	0,33	1,12

В качестве нормативных показателей качества установлено содержание флавоноидов в пересчете на скутеллярин не менее 2 %, в пересчете на байкалин – не менее 4 %.

Проведены испытания готового продукта на предмет соответствия фармакопейным требованиям для сухих экстрактов (таблица 6).

Таблица 5. Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов сухого экстракта биомассы *S. baicalensis* в пересчете на байкалин

Table 5. Metrological characteristics of the determination of the flavonoid sum calculated with reference to baicalin in the dry extract of *S. baicalensis* biomass

Образец Sample	X, %	S ²	S _x	±Δx, %	E, %
Сухой экстракт биомассы <i>S. baicalensis</i> Dry extract of <i>S. baicalensis</i> biomass	4,56	0,237	0,154	0,35	1,59

Дополнительно изучены функциональные характеристики полученной фитосубстанции для обоснования возможности ее использования в технологии твердых лекарственных форм. Сухой экстракт биомассы шлемника по технологическим свойствам является мелкодисперсным порошком с удовлетворительной сыпучестью (таблица 7). Основным недостатком фитосубстанции заключается в ее гигроскопичности ($7,92 \pm 0,08$ %). Для нивелирования повышенной склонности к влагопоглощению можно предложить добавление аэросила, лактозы и прочих вспомогательных веществ.

Полученная фитосубстанция соответствует показателям качества и может быть рекомендована для использования в дальнейшей разработке технологии комбинированных ЛС, а также нутрицевтиков.

Таблица 6. Показатели качества сухого экстракта биомассы *S. baicalensis*

Table 6. Quality indicators of *S. baicalensis* biomass dry extract

Показатель качества Quality indicator	Метод контроля Inspection method	Норма Normal value
1	2	3
Описание Description	Органолептический Organoleptic	Порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета, с характерным запахом, гигроскопичный light brown – dark brown hygroscopic powder with typical odor
Потеря в массе при высушивании, % Loss on drying, %	Гравиметрический (Фармакопея ЕАЭС, стр. 296–297, ст. 2.1.8.16) Gravimetric (EAEU Pharmacopoeia, pp. 296–297, art. 2.1.8.16)	2,02 ± 0,17
Тяжелые металлы, % Heavy metals, %	Атомно-эмиссионная спектрометрия (Фармакопея ЕАЭС, стр. 67–68, ст. 2.1.2.22) Atomic emission spectrometry (EAEU Pharmacopoeia, pp. 67–68, art. 2.1.2.22)	Не обнаружены Not found
Остаточные органические растворители, ppm Residual organic solvents, ppm	Газовая хроматография (Фармакопея ЕАЭС, стр. 534–546, ст. 2.3.2.0.) Gas chromatography (EAEU Pharmacopoeia, pp. 534–546, art. 2.3.2.0.)	Не обнаружены Not found
Подлинность, % Identity, %	Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях (Фармакопея ЕАЭС, стр. 76–77, ст. 2.1.2.24) Absorption ultraviolet-visible spectrophotometry (EAEU Pharmacopoeia, pp. 76–77, art. 2.1.2.24)	2,77 ± 0,33 (в пересчете на скутелларин) 4,56 ± 0,35 (в пересчете на байкалин) 2,77 ± 0,33 (equivalent to scutellarin) 4,56 ± 0,35 (equivalent to baicalin)

Таблица 7. Функциональные характеристики сухого экстракта биомассы *S. baicalensis*

Table 7. Functional characteristics of *S. baicalensis* biomass dry extract

Показатель Parameter	Единица измерения Unit of measurement	Значение Value	
		Размер отверстий сита, мм Sieve openings size, mm	Массовая доля порошка, % Powder mass fraction, %
Фракционный состав Particle size fraction		<0,25	2,02
		0,25	6,33
		0,5	6,96
		0,8	79,68
		1	5,01
Насыпная плотность до уплотнения (D_b) Bulk density (D_b)	г/см ³ g/cm ³	1,503 ± 0,31	
Насыпная плотность после уплотнения Tapped density (D_t)	г/см ³ g/cm ³	1,884 ± 0,31	
Сыпучесть (t^{fl}) Flowability (t^{fl})	г/с g/sec	2,87 ± 0,31	
Индекс Карра (IC) Carr Index (IC)		0,21	
Коэффициент Хауснера (IH) Hausner ratio (IH)		1,26	
Пористость Porosity	–	0,13	
Гигроскопичность Hygroscopicity	%	7,92 ± 0,08	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение функциональных характеристик биомассы шлемника байкальского позволяет сделать вывод о возможности и эффективности ее использования в качестве растительного сырья для получения сухого экстракта, обогащенного полифенольными соединениями. Разработанная технология сухого экстракта позволяет получить продукт, соответствующий требованиям качества нормативно-правовой документации. Благодаря фитохимическим исследованиям выявлено наличие в биомассе агликона байкалеина, который накапливается в большем количестве по сравнению с содержанием в подземных органах растения, и доказана перспективность использования экстракта на основе культуры растительных клеток. Проведена количественная оценка содержания флавоноидов, и установлены пределы количественного содержания БАВ в пересчете на скутелларин (не менее 2 %) и байкалин (не менее 4 %). Определены функциональные характеристики сухого экстракта биомассы *S. baicalensis*, и обозначен вектор возможности дальнейшей разработки ЛС комбинированного типа и биологически активных добавок.

ЛИТЕРАТУРА

- Agarwal G., Blanco Carcache P.J., Addo E.M., Kinghorn A.D. Current status and contemporary approaches to the discovery of antitumor agents from higher plants. *Biotechnology Advances*. 2020;38:107337.
- Thomford N.E., Senthebane D.A., Rowe A., Munro D., Seele P., Maroyi A., Dzobo K. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *Inter-*

- national Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(6):1578. DOI: 10.3390/ijms19061578.
- Стругар Й., Орлова А. А., Понкратова А. О., Уэйли А. К., Пovyдыш М. Н. Выделение индивидуальных соединений из травы сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) и установление их структуры спектроскопическими методами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):177–184. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-177-184.
 - Кондратьев М. Н., Скороходова А. Н., Ларикова Ю. С., Евдокимова Д. П. Аллелопатические свойства вторичных соединений лекарственных растений. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018;21(2):12–22. DOI: 10.29296/25877313-2018-02-02.
 - Пovyдыш М. Н., Лужанин В. Г., Ивкин Д. Ю., Белоусов М. В., Яковлев Г. П. Перспективы использования фитотерапевтических средств при нарушениях жирового и углеводного обмена. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3:130–135.
 - Zhao T., Tang H., Xie L., Zheng Y., Ma Z., Sun Q., Li X. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(9):1353–1369. DOI: 10.1111/jphp.13129.
 - Su H., Yao S., Zhao W., Li M., Liu J., Shang W., Xie H., Ke C., Gao M., Yu K., Liu H., Shen J., Tang W., Zhang L., Zuo J., Jiang H., Bai F., Wu Y., Ye Ya., Xu Y. Discovery of baicalin and baicalein as novel, natural product inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease *in vitro*. *BioRxiv*. 2020. 13.038687. DOI: 10.1101/2020.04.13.038687.
 - Маматханова М. А., Эргашева Ш. А., Ботиров Э. Х., Мюлюкин М. А., Халилов Р. М., Маматханов А. У. Количественное определение суммы флавоноидов надземной части *Scutellaria comosa*. *Химия растительного сырья*. 2023;1:239–246. DOI: 10.14258/jcprm.20230111301.
 - Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E. In vitro Callus as a Model System for the Study of Plant Stress-Resistance to Abiotic Factors (on the Example of Cereals). *Biology Bulletin Reviews*. 2018;8(6):518–526. DOI: 10.1134/S2079086418060063.
 - Kim H. Y., Kim J. H. Chemical Influence of *Scutellaria baicalensis*—*Coptis chinensis* Pair on the Extraction Efficiencies of Flavonoids and Alkaloids at Different Extraction Times and Temperatures. *Separations*. 2023;10(2):131. DOI: 10.3390/separations10020131.
 - Huang T., Liu Y., Zhang C. Pharmacokinetics and bioavailability enhancement of baicalin: A review. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2019;44(2):159–168. DOI: 10.1007/s13318-018-0509-3.
 - Исайкина Н. В., Коломиец Н. Э., Абрамцев Н. Ю., Марьин А. А. Исследование травы крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), произрастающей в некоторых районах европейской части России и Сибири. *Химия растительного сырья*. 2022;3:127–138. DOI: 10.14258/jcprm.20220310873.
 - Оленников Д. Н., Кашченко Н. И., Чирикова Н. К. Состав и биологическая активность флавоноидов и гидроксикиннаматов *Urtica cannabina* (Urticaceae). *Химия растительного сырья*. 2022;3:167–175. DOI: 10.14258/jcprm.20220311231.
 - Kondratiev M. N., Skorokhodova A. N., Larikova Ju. S., Evdokimova D. P. The allelopathic properties of secondary connections of medicinal plants. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2018;21(2):12–22. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2018-02-02.
 - 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.)
 - Zhao T., Tang H., Xie L., Zheng Y., Ma Z., Sun Q., Li X. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(9):1353–1369. DOI: 10.1111/jphp.13129.
 - Su H., Yao S., Zhao W., Li M., Liu J., Shang W., Xie H., Ke C., Gao M., Yu K., Liu H., Shen J., Tang W., Zhang L., Zuo J., Jiang H., Bai F., Wu Y., Ye Ya., Xu Y. Discovery of baicalin and baicalein as novel, natural product inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease *in vitro*. *BioRxiv*. 2020. 13.038687. DOI: 10.1101/2020.04.13.038687.
 - Mamatkhanova M. A., Ergasheva S. A., Botirov E. K., Mulyukin M. A., Khalilov R. M., Mamatkhanov A. U. Quantitative determination of the sum of flavonoids of the aboveground part of *Scutellaria comosa*. *Chemistry of plant raw materials*. 2023;1:239–246. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.20230111301.
 - Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E. In vitro Callus as a Model System for the Study of Plant Stress-Resistance to Abiotic Factors (on the Example of Cereals). *Biology Bulletin Reviews*. 2018;8(6):518–526. DOI: 10.1134/S2079086418060063.
 - Kim H. Y., Kim J. H. Chemical Influence of *Scutellaria baicalensis*—*Coptis chinensis* Pair on the Extraction Efficiencies of Flavonoids and Alkaloids at Different Extraction Times and Temperatures. *Separations*. 2023;10(2):131. DOI: 10.3390/separations10020131.
 - Huang T., Liu Y., Zhang C. Pharmacokinetics and bioavailability enhancement of baicalin: A review. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2019;44(2):159–168. DOI: 10.1007/s13318-018-0509-3.
 - Isaikina N. V., Kolomyets N. E., Abramets N. Y., Marin A. A. The study of nettle herb (*Urtica dioica* L.), growing in some areas of the European Russia and Siberia. *Chemistry of plant raw materials*. 2022;3:127–138. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.20220310873.
 - Olennikov D. N., Kashchenko N. I., Chirikova N. K. Composition and biological activity of flavonoids and hydroxycinnamates of *Urtica cannabina* (Urticaceae). *Chemistry of plant raw materials*. 2022;3:167–175. DOI: 10.14258/jcprm.20220311231.

REFERENCES

- Agarwal G., Blanco Carcache P. J., Addo E. M., Kinghorn A. D. Current status and contemporary approaches to the discovery of antitumor agents from higher plants. *Biotechnology Advances*. 2020;38:107337.
- Thomford N. E., Senthane D. A., Rowe A., Munro D., Seele P., Maroyi A., Dzobo K. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(6):1578. DOI: 10.3390/ijms19061578.
- Strugar Y., Orlova A. A., Ponkratova A. A., Whaley A. K., Povydysh M. N. Isolation of Individual Compounds from the Aerial Part of *Comarum palustre* L. and Their Structure Elucidation Using Spectroscopic Methods. *Drug development & registration*. 2022;11(4):177–184. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-177-184.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1598>
УДК 615.45



Оригинальная статья / Research article

Разработка лиофилизатов на основе полимер-лекарственного и интерполиэлектrolитного комплексов: фармакокинетическая оценка

В. Р. Тимергалиева, А. Ю. Ситенков, А. В. Ситенкова (Буховец), Е. С. Елизарова, Д. С. Гордеева, И. И. Семина, Р. И. Мустафин ✉

Институт фармации, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Казанский государственный медицинский университет Минздрава России. 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

✉ Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: В. Р. Тимергалиева – <https://orcid.org/0000-0002-3690-8905>; А. Ю. Ситенков – <https://orcid.org/0000-0002-0192-4585>; А. В. Ситенкова (Буховец) – <https://orcid.org/0000-0001-8179-4516>; Е. С. Елизарова – <https://orcid.org/0000-0001-9264-9576>; Д. С. Гордеева – <https://orcid.org/0009-0000-8591-3121>; И. И. Семина – <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>; Р. И. Мустафин – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Статья поступила: 10.10.2023

Статья принята в печать: 24.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Диспергируемые в ротовой полости лекарственные формы являются одним из новых направлений в области системы доставки лекарств. К такому виду лекарственных форм относятся пероральные лиофилизаты, которые получают методом лиофильной сушки предварительно приготовленной смеси, содержащей активный фармацевтический ингредиент (АФИ), наполнитель и другие вспомогательные вещества. Данная лекарственная форма (ЛФ) обеспечивает немедленное высвобождение АФИ в ротовой полости, используя при этом небольшое количество вспомогательных веществ.

Цель. Фармакокинетическая оценка лиофилизатов с использованием полимер-лекарственного комплекса Eudragit® E PO / ибупрофен (ПЛК ЕРО-ИБ) и интерполиэлектrolитного комплекса (ИПЭК) Carbolol® Ultrez 10 / Eudragit® E PO (ИПЭК С10/ЕРО) с метронидазолом (МТЗ).

Материалы и методы. Были получены лиофилизаты следующих составов: 1) 100 мг МТЗ и 50 мг ИПЭК С10/ЕРО или 2) 100 мг ПЛК ЕРО-ИБ. Готовили дисперсию на основе первого или второго состава в 50%-м сиропе мальтодекстрина, в качестве ПАВ использовали Спан®-80 (1,42 % от общей массы смеси). Полученную дисперсию переносили в блистеры для таблеток, замораживали в лабораторной сушилке FreeZone 1L (Labconco, США) при температуре $-49\text{ }^{\circ}\text{C}$, при давлении 0,350 мбар (время сушки – одни сутки). Для фармакокинетических исследований кроликам породы Советская шиншилла натошак в форме таблетки защежно вводили по одному лиофилизату, содержащему ПЛК ЕРО/ИБ или ИПЭК С10/ЕРО с МТЗ, в качестве сравнения использовали субстанции ИБ (50 мг) и МТЗ (100 мг), приготовленные в виде водной взвеси. Концентрация АФИ определяли в сыворотке крови кроликов. Для этого использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), эксперимент проводили на приборе хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu Corporation, Япония), использовался УФ-детектор. Были рассчитаны параметры фармакокинетики, метод – модельно-независимый. Использовалась программа Thermo Kinetika™ (version 5.0, Build 5.00.11, Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты и обсуждение. Максимальная концентрация ибупрофена из ПЛК ЕРО/ИБ достигается в течение первого часа после перорального введения. Второй пик на профилях показывает всасывание оставшейся доли АФИ в кровь из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) как в случае ПЛК ЕРО/ИБ, так и в случае ИБ из субстанции. Относительная биодоступность ПЛК ЕРО/ИБ составила $F_{rel} = 86,06\%$. Леофилизаты на основе ИПЭК С10/ЕРО обеспечивают максимальную концентрацию МТЗ через 30 минут ($C_{max} = 4,659\text{ мкг/мл}$). Относительная биодоступность составила $F_{rel} = 107,6\%$.

Заключение. Согласно проведенным исследованиям, максимальная концентрация ИБ и МТЗ достигается в течение первого часа после перорального введения лиофилизатов, содержащих ПЛК ЕРО-ИБ и ИПЭК С10/ЕРО. Всасывание лекарственных веществ в полости рта происходит благодаря компонентам, входящим в состав диспергируемой ЛФ, а также наличию сополимера ЕРО, ПЛК и ИПЭК, которые способны задерживаться на слизистой оболочке полости рта ввиду выраженных мукоадгезивных свойств. Таким образом, проведенные фармакокинетические исследования ИБ и МТЗ из полученных лиофилизатов доказывают перспективность полученных форм для систем с немедленным высвобождением.

Ключевые слова: диспергируемые лекарственные формы, лиофилизат, интерполиэлектrolитный комплекс, полимер-лекарственный комплекс (ПЛК), ибупрофен, метронидазол, фармакокинетическая оценка

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

Вклад авторов. В. Р. Тимергалиева проводила планирование эксперимента, получение лиофилизатов, работу с животными в рамках фармакокинетической оценки, интерпретации результатов и написание статьи. А. Ю. Ситенков осуществлял разработку методики хроматографического определения ИБ и МТЗ в плазме крови, проводил хроматографический анализ, расчет фармакокинетических параметров, интерпретировал результаты, участвовал в написании статьи. А. В. Ситенкова (Буховец) проводила работу с животными в рамках фармакокинетической оценки, пробоподготовку в рамках хроматографического анализа, участвовала в написании статьи. Е. С. Елизарова получала лиофилизаты, проводила работу с животными в рамках фармакокинетической оценки. Д. С. Гордеева проводила работу с животными в рамках фармакокинетической оценки, участвовала в написании статьи. И. И. Семина проводила руководство и планирование экспериментов на животных. Р. И. Мустафин проводил концептуализацию и методологию исследования, а также корректировку статьи.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 23-15-00263).

© Тимергалиева В. Р., Ситенков А. Ю., Ситенкова (Буховец) А. В., Елизарова Е. С., Гордеева Д. С., Семина И. И., Мустафин Р. И., 2023

© Timergaliev V. R., Sitenkov A. Yu., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Elizarova E. S., Gordeeva D. S., Semina I. I., Moustafine R. I., 2023

Для цитирования: Тимергалиева В. Р., Ситенков А. Ю., Ситенкова (Буховец) А. В., Елизарова Е. С., Гордеева Д. С., Семина И. И., Мустафин Р. И. Разработка лиофилизатов на основе полимер-лекарственного и интерполиэлектролитного комплексов: фармакокинетическая оценка. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):181–188. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1598>

Development of Lyophilisates Based on Polymer-drug and Interpolyelectrolyte Complexes: Pharmacokinetic Assessment

Venera R. Timergalievа, Alexander Yu. Sitenkov, Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets), Elizabeth S. Elizarova, Daria S. Gordeeva, Irina I. Semina, Rouslan I. Moustafine✉

Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

✉ **Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Venera R. Timergalievа – <https://orcid.org/0000-0002-3690-8905>; Alexander Yu. Sitenkov – <https://orcid.org/0000-0002-0192-4585>;

Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets) – <https://orcid.org/0000-0001-8179-4516>; Elizabeth S. Elizarova – <https://orcid.org/0000-0001-9264-9576>;

Daria S. Gordeeva – <https://orcid.org/0009-0000-8591-3121>; Irina I. Semina – <https://orcid.org/0000-0003-3515-0845>; Rouslan I. Moustafine – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Received: 10.10.2023

Revised: 24.11.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Orally dispersible dosage forms are one of the new trends in the field of drug delivery systems. One type of such dosage forms is oral lyophilisates that are obtained by freeze-drying a pre-prepared mixture containing the active pharmaceutical ingredient (API) and excipients. This dosage form provides immediate release of the active pharmaceutical ingredient in the oral cavity using a less amount of excipients.

Aim. Pharmacokinetic studies of previously obtained lyophilisates based on the polymer-drug complex Eudragit® E PO / ibuprofen (PDC EPO-IB) and the interpolyelectrolyte complex (IPEC) Carbopol® Ultrez 10 / Eudragit® E PO (IPEC C10/EPO) and metronidazole.

Materials and methods. Lyophilisates of the following compositions were obtained: 1) 100 mg of metronidazole and 50 mg of IPEC C10/EPO or 2) 100 mg of PDC EPO-IB, the first or second composition of the carrier with API was dispersed in 50 % maltodextrin syrup, Span®80 was added – 1.42 % from the total mass of the mixture. The mixture was poured into blisters for tablets, frozen in a FreeZone 1L laboratory dryer (Labconco, USA) for 24 hours at a temperature of –49 °C, and the main drying was carried out at a pressure of 0.350 mbar. Soviet Chinchilla rabbits were administered one lyophilisate containing PDC EPO/IB or IPEC C10/EPO with metronidazole; the substances ibuprofen (50 mg) and metronidazole (100 mg) were used as reference drugs. The concentration of API was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) on an LC-20 Prominence chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan) with UV detection. Pharmacokinetic parameters were calculated using a model-independent method using the Thermo Kinetika™ (version 5.0, Build 5.00.11, Thermo Fisher Scientific, USA) program.

Results and discussion. According to the obtained pharmacokinetic profiles, the maximum concentration of ibuprofen from EPO/IB PDC is achieved within the first hour after oral administration. The second peak in the profiles shows the absorption of the remaining portion of the API into the blood from the gastrointestinal tract (GIT), both in the case of EPO/IB PDC and in the case of ibuprofen from the substance. The relative bioavailability of EPO/IB PDC was $F_{rel} = 86.06\%$. Lyophilisates based on IPEC C10/EPO provide the maximum concentration of metronidazole after 30 minutes ($C_{max} = 4.659 \mu\text{g/ml}$). Relative bioavailability was $F_{rel} = 107.6\%$.

Conclusion. According to studies, the maximum concentration of ibuprofen and metronidazole is achieved within the first hour after oral administration of lyophilisates containing PDC EPO-IB and IPEC C10/EPO. Absorption of medicinal substances in the oral cavity occurs due to the components included in the dispersible dosage form, as well as due to the presence of a EPO copolymer, PDC and an IPEC, which are able to linger on the oral mucosa due to the presence of mucoadhesive properties. Thus, the pharmacokinetic studies of ibuprofen and metronidazole from the obtained lyophilisates prove the suitability of the obtained forms for immediate release systems.

Keywords: orodispersible dosage forms, lyophilisate, interpolyelectrolyte complex, polymer-drug complex, ibuprofen, metronidazole, pharmacokinetic 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. Venera R. Timergalievа carried out the planning of the experiment, obtaining lyophilisates, working with animals as part of the pharmacokinetic assessment, interpreting the results and writing the article. Alexander Yu. Sitenkov developed a method for the chromatographic determination of active pharmaceutical ingredients in blood plasma, carried out chromatographic analysis, calculated pharmacokinetic parameters, interpreted the results, participated in writing the article. Aleksandra V. Sitenkova (Bukhovets) carried out work with animals as part of pharmacokinetic assessment, sample preparation as part of chromatographic analysis, participated in writing the article. Elizabeth S. Elizarova received lyophilisates, carried out work with animals as part of pharmacokinetic evaluation. Daria S. Gordeeva carried out work with animals as part of a pharmacokinetic assessment, participated in writing the article. Irina I. Semina supervised and planned animal experiments. Rouslan I. Moustafine carried out the conceptualization and methodology of the study, as well as proofreading the article.

Acknowledgment. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF) in the framework of research project No 23-15-00263.

For citation: Timergalievа V. R., Sitenkov A. Yu., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Elizarova E. S., Gordeeva D. S., Semina I. I., Moustafine R. I. Development of lyophilisates based on polymer-drug and interpolyelectrolyte complexes: pharmacokinetic assessment. *Drug development & registration*. 2023;12(4):181–188. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1598>

ВВЕДЕНИЕ

Диспергируемые в ротовой полости ЛФ являются одним из новых направлений в области создания систем доставки лекарств [1–5]. Данный тип ЛФ имеет

большую востребованность у детей, пожилых пациентов и др. [4, 5]. Диспергируемые ЛФ могут быть в виде таблеток, пленок, твердых дисперсий и других форм [6–19], кроме того, различны также и способы получения этих ЛФ: лиофильная сушка, сублимация,

экструзия, прямое прессование и другие [7, 9, 13, 19, 20]. Одним из видов таких ЛФ являются пероральные лиофилизаты – ЛФ, полученные методом лиофильной сушки предварительно приготовленной смеси, содержащей АФИ, наполнитель и другие вспомогательные вещества. Данная ЛФ позволяет ввести АФИ для немедленного высвобождения в ротовой полости, используя при этом небольшое количество вспомогательных веществ. Такая ЛФ удобна в применении для пациентов. Исследования по получению и изучению лиофилизатов были описаны в предыдущих работах [13, 21, 22]. Поскольку данные ЛФ обладают преимуществами перед пероральными формами из-за отсутствия «эффекта первого прохождения через печень», разрушительного влияния пищеварительных ферментов ЖКТ, интересно было разработать лиофилизаты и исследовать их фармакокинетические параметры. Ранее нами были получены пероральные лиофилизаты на основе ПЛК Eudragit® E PO / ибупрофен [21] и ИПЭК Carbopol® Ultrez 10 / Eudragit® E PO и метронидазола [22], проведена оценка высвобождения АФИ из данных форм. Учитывая различный способ введения двух различающихся АФИ в состав лиофилизатов (в случае ИБ – в виде связанного ионными связями ПЛК ИБ/ЕРО, а в случае МТЗ – в виде физической смеси АФИ и ИПЭК С10/ЕРО), было бы интересно сравнить эти два подхода, применив фармакокинетическую оценку для выявления преимуществ и возможных различий.

Целью данной работы была сравнительная фармакокинетическая оценка лиофилизатов на основе ПЛК Eudragit® E PO / ибупрофен и ИПЭК Carbopol® Ultrez 10 / Eudragit® E PO (С10/ЕРО) с метронидазолом (МТЗ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован Eudragit® E PO (ЕРО) – терполимер *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата (ДМАЭМА) с метилметакрилатом (ММА) и бутилметакрилатом (BuMA), (ПДМАЭМА-co-MMA-co-BuMA при молярном соотношении 2:1:1, ММ 150 кДа) в качестве катионного сополимера (Evonik Industries AG, Германия). Предварительно полимер был высушен в течение двух суток при температуре 40 °С в вакуумном сушильном шкафу VD 23 (BINDER GmbH, Германия). В качестве АФИ использовали ибупрофен (Sigma-Aldrich, США), который также выполнял роль аниона. Для получения лиофилизатов использовали мальтодекстрин (ДЭ 16,5–19,5) и Спан®-80 (ТМ 80, 1000–2000 МПа) производства Merck (Sigma-Aldrich, США). Синтез ПЛК Eudragit® E PO / ибупрофена (ЕРО-ИБ), его физико-химическая оценка и оценка высвобождения описаны в предыдущей работе [21]. Кроме того, в работе в качестве полианиона был использован Carbopol® Ultrez 10, представляющий собой сополимер акриловой кислоты (Lubrizol Advanced Materials, США), а в качестве поликатиона был использован

Eudragit® E PO, на основе которых и был получен ИПЭК Carbopol® Ultrez 10 / Eudragit® E PO (С10/ЕРО). Методика получения, а также физико-химическая оценка данного ИПЭК представлена в предыдущей работе [23], также была проведена оценка кинетики высвобождения МТЗ из полученной системы доставки [22].

В качестве модельных АФИ были выбраны МТЗ, который относится по биофармацевтической классификационной системе (БКС) к первому классу (вещества с высокой проникаемостью и высокой растворимостью), и ИБ, относящийся ко второму классу веществ (с низкой растворимостью и высокой проникаемостью) [24]. Было интересно рассмотреть влияние этих свойств на результаты сравнительной фармакокинетики.

Несмотря на разные подходы к введению АФИ в состав диспергируемой ЛФ (в составе ПЛК или смешение с ИПЭК), использовали единую технологическую схему получения лиофилизатов, содержащих: 1) 100 мг МТЗ производства Merck (Sigma-Aldrich, США) и 50 мг ИПЭК С10/ЕРО или 2) 100 мг ПЛК ЕРО-ИБ. Готовили дисперсию на основе первого или второго состава в 50 % сиропе мальтодекстрина, в качестве поверхностно-активного вещества (ПАВ) использовали Спан®-80 (1,42 % от общей массы смеси). Полученную дисперсию переносили в блистеры для таблеток, замораживали в лабораторной сушилке FreeZone 1L (Labconco, США) при температуре –49 °С, при давлении 0,350 мбар (время сушки – одни сутки). Выход процесса приготовления лиофилизатов составил 95 % (схема получения представлена на рисунке 1).

Для проведения исследований фармакокинетики были отобраны кролики (12 самцов, порода – Советская шиншилла), средний вес которых составил 3,00 кг, эксперимент проводился после 12-часового голодания животных. Кролики были получены из биопитомника «Стезар» (Владимирская обл., п. Красногвардейский), их содержание соответствовало ГОСТ Р 50258-92, а эксперименты проводились с соблюдением ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96 и международных рекомендаций Европейской конвенции (1997). Исследования проведены при одобрении локального этического комитета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол заседания № 5 от 28.05.2012).

Каждому кролику защежно было введено по одному, приготовленному в виде таблетки лиофилизату, содержащему ПЛК ЕРО/ИБ, для сравнения была использована субстанция ИБ в виде водной суспензии в дозировке 50 мг, равной его содержанию в ПЛК.

В случае другого образца каждому кролику также защежно было введено по одному, приготовленному в виде таблетки лиофилизату, содержащему ИПЭК С10/ЕРО с МТЗ, в качестве препарата сравнения применялась водная суспензия субстанции МТЗ в аналогичной дозировке 100 мг.

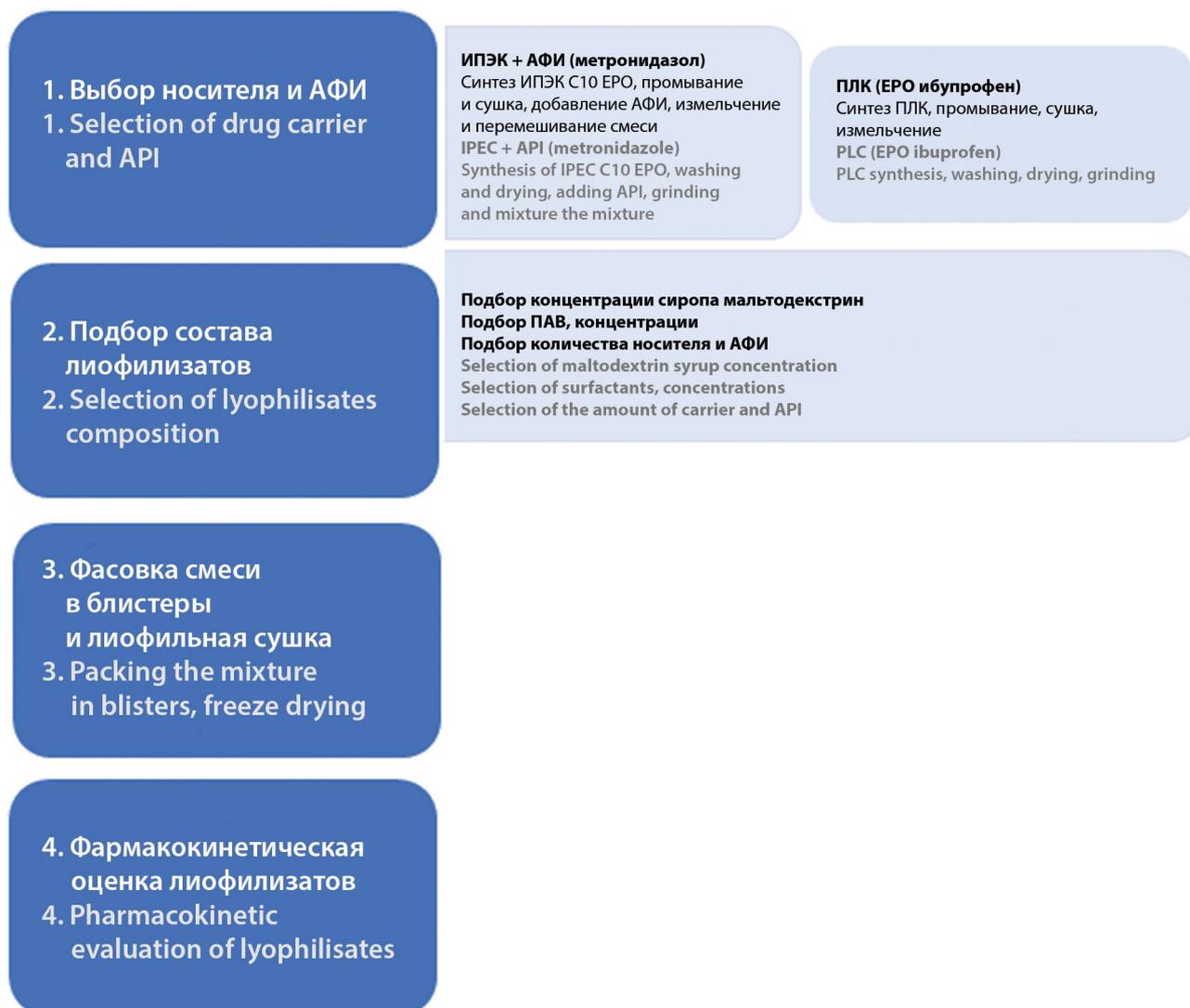


Рисунок 1. Схема получения лиофилизатов

Figure 1. Scheme of lyophilisates preparing

Через определенные интервалы времени – 30 мин; 1 ч; 1,5 ч; 2 ч; 3 ч, 4 ч и 5 ч с момента введения образцов – из ушной вены кроликов забирали по 0,5–0,7 мл крови, путем центрифугирования при 2000 об/мин в течение 20 минут получали сыворотку крови. Образцы сыворотки замораживались при -25°C .

Экстракцию ИБ из сыворотки крови проводили по следующей методике: к образцу сыворотки объемом 500 мкл добавляли равный объем ацетонитрила с целью осаждения белков. Полученную суспензию перемешивали на приборе Vortex 3 (IKA, Германия), а затем на мультитротаторе Multi Bio RS-24 (Biosan, Латвия) по две минуты. Полученные осадки центрифугировали при 10 000 об/мин на микроцентрифуге (Eppendorf Mini-Spin, Германия) в течение 10 минут [25]. Концентрацию ИБ в супернатанте определяли методом ВЭЖХ. Хроматографический

анализ проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu Corporation, Япония) с использованием хроматографической колонки с привитой фазой Supelco analytical C-18 (длина 150 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, зернение сорбента 5 мкм) при температуре 40°C , в качестве элюента использовали смесь 0,01 М фосфатного буферного раствора с $\text{pH} = 2,5$ и ацетонитрила в соотношении 40:60. Объем пробы – 20 мкл. Использовали изократический режим, скорость подачи элюента – 1 мл/мин. Время появления хроматографического пика составляло 5,9 мин. Детекцию осуществляли на двухволновом УФ-детекторе при 220 нм и 254 нм. Концентрацию ИБ рассчитывали по методу абсолютной калибровки ($r^2 = 0,9995$).

Экстракцию МТЗ проводили по следующей методике: к 200 мкл плазмы крови добавляли 50 мкл

10%-го раствора цинка сульфата. Полученную суспензию перемешивали с использованием Vortex 3 (IKA, Германия), затем на мультиротаторе Multi Bio RS-24 (Biosan, Латвия) по две минуты, после чего охлаждали в холодильнике (4–8 °C) в течение 15 минут и центрифугировали на микроцентрифуге (Eppendorf Mini-Spin, Германия) 10 минут при 10 000 об/мин. Концентрацию МТЗ в супернатанте определяли методом ВЭЖХ [26]. Хроматографический анализ проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu Corporation, Япония) с использованием хроматографической колонки, аналогичной той, что применяли для анализа ИБ из ПЛК ЕРО-ИБ, при той же температуре 40 °C, в качестве элюента использовали смесь 0,01 М фосфатного буферного раствора с pH = 4,5 и ацетонитрила в соотношении 90:10. Объем пробы – 20 мкл. Использовали изократический режим, скорость подачи элюента – 1 мл/мин. Время появления хроматографического пика составляло 4,5 мин. Детекцию осуществляли на двухволновом УФ-детекторе при 280 нм и 320 нм. Концентрацию метронидазола рассчитывали по методу абсолютной калибровки ($r^2 = 0,9931$).

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программы Thermo Kinetika™ (version 5.0, Build 5.00.11, Thermo Fisher Scientific, США), метод – модельно-независимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Лиофилизаты представляют собой системы медленного высвобождения, предназначенные для всасывания основной доли АФИ из ротовой полости,

тем самым минимизируется влияние пищеварительных ферментов, не теряется часть АФИ из-за трансформации в печени [1, 2]. Так как растворение ЛФ происходит в течение нескольких минут в ротовой полости, всасывание в кровь основной части АФИ также должно происходить в течение первого часа от момента введения. ПЛК ЕРО/ИБ представляет собой ионный комплекс, являющийся продуктом взаимодействия молекул ИБ и макромолекул Eudragit® ЕРО, предназначенный для контролируемого высвобождения включенного АФИ из диспергируемой в полости рта ЛФ.

Согласно полученным фармакокинетическим профилям максимальная концентрация ИБ из ПЛК ЕРО/ИБ достигается в течение первого часа после введения (0,9578 мкг/мл) по сравнению с субстанцией ИБ (0,2689 мкг/мл) (рисунок 2). Это связано с тем, что основная доля АФИ попадает в кровь благодаря всасыванию из ротовой полости, что наблюдается в системе ПЛК ЕРО/ИБ, но отсутствует в случае субстанции ИБ. Таким образом, лиофилизаты, содержащие ПЛК ЕРО/ИБ, обеспечивают всасывание АФИ в полости рта, с одной стороны, благодаря компонентам, входящим в состав диспергируемой ЛФ, таким как мальтодекстрин и спан-80, а с другой стороны, благодаря наличию полимера (ЕРО), который способен задерживаться на слизистой оболочке ротовой полости ввиду наличия мукоадгезивных свойств, причем как самого сополимера, так и ПЛК [23]. Так как субстанция ИБ введена в виде суспензии без использования вспомогательных ве-

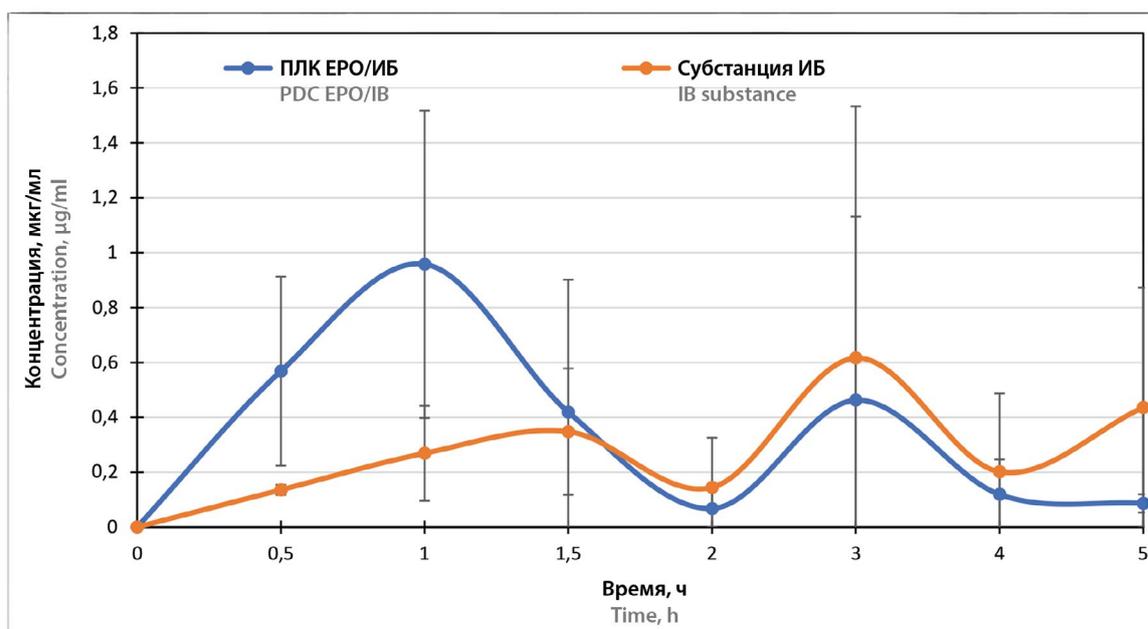


Рисунок 2. Фармакокинетические профили ибупрофена из лиофилизатов на основе ПЛК ЕРО/ИБ в сравнении с субстанцией ибупрофена

Figure 2. Pharmacokinetic profiles of ibuprofen from lyophilisates based on EPO/IB PLC in comparison with ibuprofen substance

шество, все количество АФИ всасывается из ЖКТ и постепенно нарастает к третьему часу от момента введения до 0,515 мкг/мл, то есть суспензия не задерживается на слизистых оболочках ротовой полости, в связи с чем нет пика концентрации в течение первого часа, как в случае ПЛК. Второй пик на профилях характеризует всасывание части оставшейся доли АФИ в кровь из ЖКТ как в случае ПЛК ЕРО/ИБ, так и в случае ИБ из субстанции. Были также рассчитаны фармакокинетические параметры (таблица 1). Относительная биодоступность ПЛК ЕРО/ИБ составила $F_{rel} = 86,06\%$. При сравнении показателей $AUC_{0-5ч}$ можно отметить, что значения этого параметра близки для ПЛК и субстанции ИБ, то есть суммарные концентрации АФИ в плазме крови в течение времени наблюдения схожи, но значения среднего времени удерживания MRT значительно отличаются (для ПЛК – 1,83 ч, для ИБ – 4,737 ч). То есть АФИ из ПЛК всасывается быстрее и концентрация его снижается быстрее, а ИБ из субстанции дольше находится в крови, максимальная концентрация достигается постепенно. Таким образом, полученные лиофилизаты на основе ПЛК ЕРО/ИБ показывают перспективность в качестве систем доставки с немедленным высвобождением. Кроме того, полученные фармакокинетические профили также хорошо согласуются с проведенными ранее исследованиями по высвобождению ИБ из аналогичных исследуемых образцов ПЛК ЕРО/ИБ [21].

Таблица 1. Фармакокинетические параметры разрабатываемых систем

Table 1. Pharmacokinetic parameters of developing systems

№ п/п No.	Образец Sample	C_{max} , мкг/мл C_{max} , µg/ml	T_{max} , ч T_{max} , h	$AUC_{0-5ч}$, мкг × ч/мл $AUC_{0-5ч}$, µg × h/ml	MRT, ч/ MRT, h	F_{rel} , % F_{rel} , %
1	ПЛК ЕРО/ИБ PDC EPO/IB	0,596	1	0,914	1,83	86,06
2	ИБ IB	0,515	3	1,062	4,737	-
3	ИПЭК + МТЗ IPEC + MZ	4,659	0,5	8,760	7,188	107,06
4	МТЗ MZ	2,137	0,5	5,797	6,714	-

Лиофилизаты на основе ИПЭК С10/ЕРО и МТЗ показывают максимальную концентрацию через 30 минут после введения ($C_{max} = 4,659$ мкг/мл) по сравнению с введенной его субстанцией ($C_{max} = 2,137$ мкг/мл), ИПЭК с МТЗ показывают достоверно большую $AUC_{0-5ч} = 8,760$ мкг × ч/мл, $MRT = 7,188$ ч (рисунок 3). Относительная биодоступность составила $F_{rel} = 107,6\%$. Стоит отметить, что ИПЭК в составе лиофилизатов химически не связан с МТЗ (в отличие от ПЛК с ИБ), максимальная концентрация достигается в первые полчаса после введения ЛФ. Кроме того, стоит отметить, что МТЗ относится к первому классу согласно БКС, то есть это АФИ с высокой растворимостью (во всех диапазонах pH на протяжении ЖКТ)

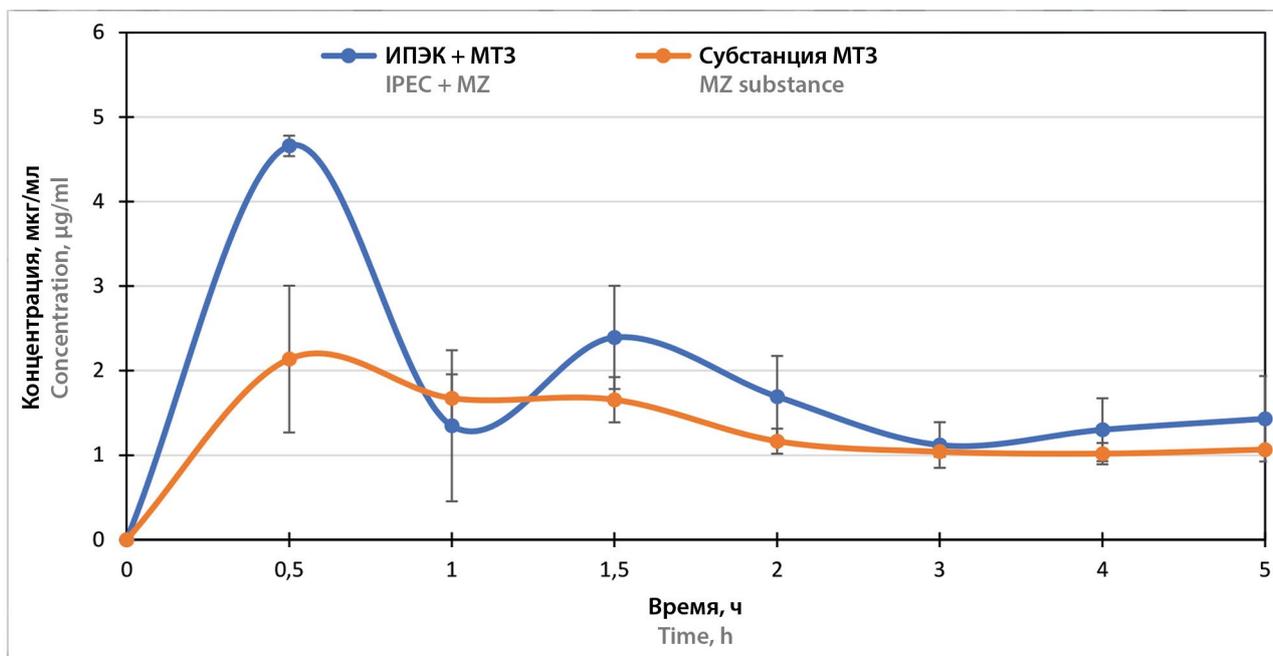


Рисунок 3. Фармакокинетические профили метронидазола из лиофилизатов на основе Carbopol® 10 / Eudragit® EPO в сравнении с субстанцией метронидазола

Figure 3. Pharmacokinetic profiles of metronidazole from lyophilisates based on Carbopol® 10 / Eudragit® EPO compared with metronidazole substance

и высокой проницаемостью. Благодаря этим свойствам достигается высокая концентрация уже через 30 минут после введения. Таким образом, основная доля АФИ из диспергируемых таблеток поступает в кровь в первые полчаса от момента введения, затем концентрация метронидазола в крови резко снижается. Так же, как и в случае ИБ, метронидазол из субстанции всасывается постепенно, то есть нет высокого скачка концентрации, как в случае лиофилизатов на основе того же АФИ, концентрация в течение всего времени эксперимента находится на постоянном уровне. АФИ из лиофилизатов всасывается быстрее, таким образом, полученные системы на основе ИПЭК С10/ЕРО и МТЗ показывают перспективность для систем с немедленным высвобождением.

При сравнении двух систем на основе ПЛК ЕРО/ИБ и ИПЭК С10/ЕРО и МТЗ стоит отметить, что всасывание из лиофилизатов на основе ИПЭК С10/ЕРО и МТЗ значительно выше (C_{\max} (ПЛК ЕРО/ИБ) = 0,596 мкг/мл, C_{\max} (ИПЭК С10/ЕРО и МТЗ) = 4,659 мкг/мл), что, скорее всего, связано с тем, что ИБ – это вещество с низкой растворимостью и высокой проницаемостью, тогда как МТЗ обладает высокой проницаемостью и высокой растворимостью, кроме того, ИБ связан ионной связью с ЕРО, а МТЗ и ИПЭК С10/ЕРО представляют собой физическую смесь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно изученным фармакокинетическим профилям лиофилизаты, содержащие ПЛК Eudragit® ЕРО/ИБ, обеспечивают всасывание ибупрофена в полости рта благодаря компонентам, входящим в состав диспергируемой лекарственной формы, а также наличию мукоадгезивного сополимера и ПЛК с его участием, что увеличивает время достижения C_{\max} до 1 часа. Максимальная концентрация метронидазола после перорального введения лиофилизатов с выраженными мукоадгезивными свойствами образующих ИПЭК полимеров (Carbopol Ultrez 10 / Eudragit® ЕРО) достигается через 30 минут, а основная доля АФИ поступает в кровь в течение первого часа от момента введения. Таким образом, проведенные фармакокинетические исследования ибупрофена (в составе ПЛК) и метронидазола (в составе ИПЭК) из полученных лиофилизатов доказывают перспективность полученных ЛФ для использования в системах доставки с немедленным высвобождением АФИ. При этом более быстрый эффект достигается в случае получения лиофилизатов с использованием ИПЭК, тогда как более длительный – с применением ПЛК.

ЛИТЕРАТУРА

- Sharma S., Singh K. Oral Disintegrating Tablets – An Updated Patent Perspective. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2020;14:166–190. DOI: 10.2174/1872211314999201123202930.
- Jassem N. A. Orodispersible Tablets: A Review on Recent Trends in Drug Delivery. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2022;12:432–436. DOI: 10.25258/ijddt.12.1.77.
- Kumar R., Sheela M. A., Sachdeva M. Formulation and Evaluation of Orodispersible Tablets Containing CoCrystals of Modafinil. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2022;12:82–89. DOI: 10.22270/jddt.v12i5-S.5634.
- Wiedey R., Kokott M., Breitreutz J. Orodispersible Tablets for Pediatric Drug Delivery: Current Challenges and Recent Advances. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2021;18:1873–1890. DOI: 10.1080/17425247.2021.2011856.
- Slavkova M., Breitreutz J. Orodispersible drug formulations for children and elderly. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;75:2–9. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.02.015.
- Mohana M., Vijayalakshmi S. Development and characterization of solid dispersion-based orodispersible tablets of cilnidipine. *Beni Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2022;11:83. DOI: 10.1186/s43088-022-00259-3.
- Mhetre L. R., Kadam P. S., Gadhire P. H. Formulation and Evaluation of Naproxen Orodispersible Tablets. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2022;15:6055–6060. DOI: 10.37285/ijpsn.2022.15.4.5.
- Van Nguyen K., Dang T. K., Vu L. T., Ha N. T., Truong H. D., Tran T. H. Orodispersible film incorporating nanoparticulate loratadine for an enhanced oral bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2023;53:417–426. DOI:10.1007/s40005-023-00613-2.
- Oliveira L. J., Veiga A., Stofella N. C. F., Cunha A. C., Graça M., Toledo T., Andreazza I. F., Murakami F. S. Development and Evaluation of Orodispersible Tablets Containing Ketoprofen. *Current Drug Delivery*. 2020;17:348–360. DOI: 10.2174/1567201817666200317122807.
- Lew M. F. Selegiline Orally Disintegrating Tablets for the Treatment of Parkinson's Disease. *Expert Review. Neurotherapeutics*. 2005;5:705–712. DOI: 10.1586/14737175.5.6.705.
- Hua S. Advances in Nanoparticulate Drug Delivery Approaches for Sublingual and Buccal Administration (mini-review). *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:1328. DOI:10.3389/fphar.2019.01328.
- Watchorn J., Clasky A. J., Prakash G., Johnston I. A. E., Chen P. Z., Gu F. X. Untangling Mucosal Drug Delivery: Engineering, Designing, and Testing Nanoparticles to Overcome the Mucus Barrier. *ACS Biomaterial Sciences and Engineering*. 2022;8:1396–1426. DOI: 10.1021/acsbmaterials.2c00047.
- Mehanna M. M., Mneimneh A. T., Domiati S., Allam, A. N. Tadalafil-Loaded Limonene-Based Orodispersible Tablets: Formulation, in vitro Characterization and in vivo Appraisal of Gastroprotective Activity. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:10099–10112. DOI: 10.2147/IJN.S288552.
- Russo E., Selmin F., Baldassari S., Gennari C. G. M., Caviglioli G., Cilirzo F., Minghetti P., Parodi B. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *Journal of Drug Delivery Sciences and Technology*. 2016;32:113–125. DOI: 10.1016/j.jddt.2015.06.016.
- Desai N., Redfearn A., MacLeod G., Tuleu C., Hanson B., Orlu M. How Do Orodispersible Tablets Behave in an In Vitro Oral Cavity Model: A Pilot Study. *Pharmaceutics*. 2020;12:651. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070651.
- Guhmann M., Preis M., Gerber F., Pöllinger N., Breitreutz J., Weitschies W. Design, Development and in-Vitro Evaluation of Diclofenac Taste-Masked Orodispersible Tablet Formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41:540–551. DOI: 10.3109/03639045.2014.884122.
- Wasilewska K., Winnicka K. How to Assess Orodispersible Film Quality? A Review of Applied Methods and Their Modifications. *Acta Pharmaceutica*. 2019;69:155–176. DOI: 10.2478/acph-2019-0018.
- Perioli L., Ambrogi V., Rubini D., Giovagnoli S., Ricci M., Blasi P., Rosi C. Novel Mucoadhesive Buccal Formulation Containing Metronidazole for the Treatment of Periodontal Disease. *Journal of Controlled Release*. 2004;95:521–533. DOI: 10.1016/j.jconrel.2003.12.018.
- Sander C., Madsen K. D., Hyrup B., Nielsen H. M., Rantanen J., Jacobsen J. Characterization of spray dried bioadhesive metformin microparticles for oromucosal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;85:682–688. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.05.017.

20. Мустафин Р. И., Гарипова В. Р., Селмин Ф., Цикурзо Ф. Диспергируемые в ротовой полости лекарственные формы (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;4(13):34–38.
21. Тимергалиева В. Р., Хуснутдинов Р. Р., Мусина Р. Р., Елизарова Е. С., Алсынбаев Р. Р., Насибуллин Ш. Ф., Мустафин Р. И. Разработка диспергируемых в полости рта таблеток ибупрофена на основе полимер-лекарственного комплекса. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):113–120. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-113-120.
22. Timergalieva V. R., Gennari C. G. M., Cilurzo F., Selmin F., Moustafine R. I. Comparative Evaluation of Metformin and Metronidazole Release from Oral Lyophilisates with Different Methods. *Scientia Pharmaceutica*. 2023;91:23. DOI:10.3390/scipharm91020023.
23. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018;10:85. DOI: 10.3390/polym10010085.
24. Amidon G. L., Lennernas H., Shah V. P., Crison J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability, *Pharm Res. The AAPS Journal*. 2014;12:413–420. DOI: 10.1208/s12248-014-9620-9.
25. Rustum A. M. Assay of Ibuprofen in Human Plasma by Rapid and Sensitive Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Application to a Single Dose Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatographic Sciences*. 1991;29:16–20. DOI: 10.1093/chromsci/29.1.16.
26. Emami J., Ghassami N., Hamishehkar H. A rapid and sensitive HPLC method for the analysis of metronidazole in human plasma: Application to single dose pharmacokinetic and bioequivalence studies. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;14(1):15–21.
11. Hua S. Advances in Nanoparticulate Drug Delivery Approaches for Sublingual and Buccal Administration (mini-review). *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10:1328. DOI:10.3389/fphar.2019.01328.
12. Watchorn J., Clasky A. J., Prakash G., Johnston I. A. E., Chen P. Z., Gu F. X. Untangling Mucosal Drug Delivery: Engineering, Designing, and Testing Nanoparticles to Overcome the Mucus Barrier. *ACS Biomaterial Sciences and Engineering*. 2022;8:1396–1426. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.2c00047.
13. Mehanna M. M., Mneimneh A. T., Domiati S., Allam, A. N. Tadalafil-Loaded Limonene-Based Orodispersible Tablets: Formulation, in vitro Characterization and in vivo Appraisal of Gastroprotective Activity. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:10099–10112. DOI: 10.2147/IJN.S288552.
14. Russo E., Selmin F., Baldassari S., Gennari C. G. M., Caviglioli G., Cilurzo F., Minghetti P., Parodi B. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *Journal of Drug Delivery Sciences and Technology*. 2016;32:113–125. DOI: 10.1016/j.jddst.2015.06.016.
15. Desai N., Redfearn A., MacLeod G., Tuleu C., Hanson B., Orlu M. How Do Orodispersible Tablets Behave in an In Vitro Oral Cavity Model: A Pilot Study. *Pharmaceutics*. 2020;12:651. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070651.
16. Guhmann M., Preis M., Gerber F., Pöllinger N., Breitzkreutz J., Weitschies W. Design, Development and in-Vitro Evaluation of Diclofenac Taste-Masked Orodispersible Tablet Formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41:540–551. DOI: 10.3109/03639045.2014.884122.
17. Wasilewska K., Winnicka K. How to Assess Orodispersible Film Quality? A Review of Applied Methods and Their Modifications. *Acta Pharmaceutica*. 2019;69:155–176. DOI: 10.2478/acph-2019-0018.
18. Perioli L., Ambrogi V., Rubini D., Giovagnoli S., Ricci M., Blasi P., Rosci C. Novel Mucoadhesive Buccal Formulation Containing Metronidazole for the Treatment of Periodontal Disease. *Journal of Controlled Release*. 2004;95:521–533. DOI: 10.1016/j.jconrel.2003.12.018.
19. Sander C., Madsen K. D., Hyrup B., Nielsen H. M., Rantanen J., Jacobsen J. Characterization of spray dried bioadhesive metformin microparticles for oromucosal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;85:682–688. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.05.017.
20. Moustafine R. I., Garipova V. R., Selmin F., Cilurzo F. Orally dispersible dosage forms (review). *Drug development & registration*. 2015;4(13):34–38. (In Russ.)
21. Timergalieva V. R., Khusnutdinov R. R., Musina R. R., Eizarova E. S., Alsynbaev R. R., Nasibullin Sh. F., Moustafine R. I. Development of orodispersible ibuprofen tablets based on a polymer-drug complex. *Drug development & registration*. 2022;11(3):113–120. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-113-120.
22. Timergalieva V. R., Gennari C. G. M., Cilurzo F., Selmin F., Moustafine R. I. Comparative Evaluation of Metformin and Metronidazole Release from Oral Lyophilisates with Different Methods. *Scientia Pharmaceutica*. 2023;91:23. DOI:10.3390/scipharm91020023.
23. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018;10:85. DOI: 10.3390/polym10010085.
24. Amidon G. L., Lennernas H., Shah V. P., Crison J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability, *Pharm Res. The AAPS Journal*. 2014;12:413–420. DOI: 10.1208/s12248-014-9620-9.
25. Rustum A. M. Assay of Ibuprofen in Human Plasma by Rapid and Sensitive Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Application to a Single Dose Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatographic Sciences*. 1991;29:16–20. DOI: 10.1093/chromsci/29.1.16.
26. Emami J., Ghassami N., Hamishehkar H. A rapid and sensitive HPLC method for the analysis of metronidazole in human plasma: Application to single dose pharmacokinetic and bioequivalence studies. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;14(1):15–21.

REFERENCES

1. Sharma S., Singh K. Oral Disintegrating Tablets – An Updated Patent Perspective. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2020;14:166–190. DOI: 10.2174/1872211314999201123202930.
2. Jassem N. A. Orodispersible Tablets: A Review on Recent Trends in Drug Delivery. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2022;12:432–436. DOI: 10.25258/ijddt.12.1.77.
3. Kumar R., Sheela M. A., Sachdeva M. Formulation and Evaluation of Orodispersible Tablets Containing CoCrystals of Modafinil. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2022;12:82–89. DOI: 10.22270/jddt.v12i5-S.5634.
4. Wiedey R., Kokott M., Breitzkreutz J. Orodispersible Tablets for Pediatric Drug Delivery: Current Challenges and Recent Advances. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2021;18:1873–1890. DOI: 10.1080/17425247.2021.2011856.
5. Slavkova M., Breitzkreutz J. Orodispersible drug formulations for children and elderly. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;75:2–9. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.02.015.
6. Mohana M., Vijayalakshmi S. Development and characterization of solid dispersion-based orodispersible tablets of cilnidipine. *Beni Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2022;11:83. DOI: 10.1186/s43088-022-00259-3.
7. Mhetre L. R., Kadam P. S., Gadhire P. H. Formulation and Evaluation of Naproxen Orodispersible Tablets. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2022;15:6055–6060. DOI: 10.37285/ijpsn.2022.15.4.5.
8. Van Nguyen K., Dang T. K., Vu L. T., Ha N. T., Truong H. D., Tran T. H. Orodispersible film incorporating nanoparticulate loratadine for an enhanced oral bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2023;53:417–426. DOI:10.1007/s40005-023-00613-2.
9. Oliveira L. J., Veiga A., Stofella N. C. F., Cunha A. C., Graça M., Toledo T., Andrezza I. F., Murakami F. S. Development and Evaluation of Orodispersible Tablets Containing Ketoprofen. *Current Drug Delivery*. 2020;17:348–360. DOI: 10.2174/1567201817666200317122807.
10. Lew M. F. Selegiline Orally Disintegrating Tablets for the Treatment of Parkinson's Disease. *Expert Review. Neurotherapeutics*. 2005;5:705–712. DOI: 10.1586/1473175.5.6.705.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1517>
УДК 615.453.64



Оригинальная статья / Research article

Разработка состава таблетированной лекарственной формы индуктора монооксигеназной системы гепатоцитов на основе 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина

А. И. Петраков✉, В. В. Шейкин, С. В. Кривощёков, Е. А. Безверхняя,
А. М. Гурьев, М. В. Белоусов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ Контактное лицо: Петраков Александр Игоревич. E-mail: aipp19@yandex.ru

ORCID: А. И. Петраков – <https://orcid.org/0009-0001-9625-0498>; В. В. Шейкин – <https://orcid.org/0000-0002-0600-5764>;
С. В. Кривощёков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; Е. А. Безверхняя – <https://orcid.org/0000-0001-7699-5719>;
А. М. Гурьев – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>; М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 06.07.2023

Статья принята в печать: 23.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Депрессия цитохромов P450 является одной из причин низкой эффективности терапии гепатитов. В ряде исследований подтверждена необходимость применения индукторов монооксигеназной системы гепатоцитов (МСГ) для повышения эффективности лечения хронических гепатитов и цирроза различного генеза. Перспективным веществом-индуктором МСГ является 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантин (ДПДТК), обладающий детоксицирующей и цитопротективной активностью на моделях острой гипобарической гипоксии, ишемии печени, неконъюгированной гипербилирубинемии, токсическом гепатите. Для разработки лекарственной формы 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина необходимо изучить его технологические свойства.

Цель. Разработка таблетированной лекарственной формы 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина методом прямого прессования.

Материалы и методы. Исследовали субстанцию 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина (серия DPDX270216001). Лактозы моногидрат (ЛМ) (200-559-2, ООО «Нефтегазхимкомплект», Россия), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) (100-32-2, Silverline chemicals Ltd., Индия), крахмал картофельный, гидроксипропилцеллюлоза (ZW180113, Fengchen Group Co., Ltd., Китай), тальк (ООО «Агат-Мед», Россия) и магнеия стеарат (209-150-3, Ataman Chemicals) были рассмотрены в качестве вспомогательных веществ. Исследование субстанции проводили по показателям: описание, потеря в массе при высушивании, фракционный состав, сыпучесть, насыпная плотность, пористость, прессуемость, сила выталкивания таблетки из матрицы. Таблеточные массы оценивали по показателям: сыпучесть, насыпная плотность, прессуемость, сила выталкивания таблетки из матрицы. Анализ получаемых таблеток проводили по параметрам: средняя масса, прочность на раздавливание, распадаемость. Испытания проводились в соответствии с Государственной фармакопеей (ГФ) РФ.

Результаты и обсуждение. Выявлено, что субстанция ДПДТК имеет плохую прессуемость, низкую сыпучесть, малую насыпную массу и высокую пористость. Добавление ЛМ и МКЦ улучшило показатель прессуемости, но увеличило силу выталкивания таблетки из матрицы. Последующее добавление магнеия стеарата снизило силу выталкивания таблетки из матрицы в 5 раз. Сыпучесть таблеточной массы возросла до 3,5–4,0 г/с, как и время распадаемости таблеток (13–14 мин). Введение 10 % дезинтеграторов улучшило показатель распадаемости (11–12 мин).

Заключение. На основе изученных свойств субстанции разработан оптимизированный состав таблетлируемой массы. Показана возможность получения лекарственной формы – таблетки ДПДТК методом прямого прессования.

Ключевые слова: монооксигеназная система гепатоцитов, цитохром P450, прямое прессование, индуктор МСГ, таблетки

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

Вклад авторов. М. В. Белоусов, А. М. Гурьев являлись руководителями исследования. В. В. Шейкин, А. И. Петраков проводили исследование. А. И. Петраков, С. В. Кривощёков, Е. А. Безверхняя написали текст статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении.

Благодарность. Коллектив авторов выражает благодарность профессору кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии БГМУ (г. Уфа) Халиуллину Феркату Адельзяновичу и заведующей кафедрой фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии БГМУ (г. Уфа) Клен Елене Эдмудовне за синтезирование и предоставление субстанции 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина.

Для цитирования: Петраков А. И., Шейкин В. В., Кривощёков С. В., Безверхняя Е. А., Гурьев А. М., Белоусов М. В. Разработка состава таблетированной лекарственной формы индуктора монооксигеназной системы гепатоцитов на основе 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):189–196. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1517>

© Петраков А. И., Шейкин В. В., Кривощёков С. В., Безверхняя Е. А., Гурьев А. М., Белоусов М. В., 2023

© Petrakov A. I., Sheikin V. V., Krivoshchekov S. V., Bezverkhniia E. A., Guryev A. M., Belousov M. V., 2023

Development of the Tablet Dosage Form Composition for the Inductor of Hepatocytes Monoxygenase System Based on 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine

Aleksandr I. Petrakov✉, Vladimir V. Sheikin, Sergei V. Krivoshchekov, Ekaterina A. Bezverkhniaia, Artem M. Guryev, Mikhail V. Belousov

Siberian State Medical University, SSMU, 2, Moscow tract, Tomsk, 634050, Russia

✉ Corresponding author: Aleksandr I. Petrakov. E-mail: aipp19@yandex.ru

ORCID: Aleksandr I. Petrakov – <https://orcid.org/0009-0001-9625-0498>; Vladimir V. Sheikin – <https://orcid.org/0000-0002-0600-5764>; Sergei V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>; Ekaterina A. Bezverkhniaia – <https://orcid.org/0000-0001-7699-5719>; Artem M. Guryev – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>; Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 06.07.2023 Revised: 23.11.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Cytochromes P450 depression is the reason for the low effectiveness of etiotropic and pathogenetic therapy of hepatitis. Recent experimental and clinical studies demonstrated the need for use of inducers of hepatocytes monoxygenase system to increase the effectiveness of treatment of chronic hepatitis and cirrhosis. 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine is a promising inducer of hepatocytes monoxygenase system with detoxifying and cytoprotective activity demonstrated in models of acute hypobaric hypoxia, liver ischemia, unconjugated hyperbilirubinemia, toxic hepatitis. Development of a dosage form for 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine requires evaluation of its technological properties which was the aim of the present study.

Aim. Preparation of a tablet dosage form for 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine by direct pressing.

Materials and methods. The object of the study was the substance of 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine (DPDX270216001 series). Lactose monohydrate (200-559-2, LLC "Neftegazkhimkomplekt", Russia), microcrystalline cellulose (100-32-2, Silverline chemicals Ltd., India), potato starch, hydroxypropyl cellulose (ZW180113, Fengchen Group Co., Ltd., Китай), talc (LLC "Agat-Med", Russia), magnesium stearate (209-150-3, Ataman Chemicals) were used as excipients. Evaluation of the substance properties was carried out according to the following indicators: appearance, loss on drying, fractional composition, flowability, bulk density, porosity, tablet compression (cohesion), ejection force of the tablet from matrix. Tablet masses were evaluated according to the following indicators: flowability, bulk density, tablet compression (cohesion), ejection force of the tablet from matrix. The tablets were obtained by the method of direct pressing. The analysis of obtained tablets were carried out according to the following parameters: average weight, crushing strength, disintegration. The tests were carried out in accordance with the Russian Federation State Pharmacopoeia.

Results and discussion. The substance demonstrated poor compression (cohesion), low flowability, low bulk density and high porosity. The addition of lactose monohydrate and microcrystalline cellulose improved the cohesion (compression) parameter, but increased the ejection force of the tablet from matrix. The subsequent addition of magnesium stearate reduced the ejection force of the tablet from matrix by 5 times. The flowability of the tablet mass increased to 3,5–4,0 g/s, the disintegration time of the tablets increased (13–14 min). The introduction of 10% disintegrators into the mold improved the disintegration rates.

Conclusion. Based on the studied properties of the substance, was developed the optimal ratio of tablet mass. The possibility of obtaining a dosage form – tablets of 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine by direct pressing was show.

Keywords: monoxygenase system of hepatocytes, cytochrome P450, direct tablet pressing, inducer of the monoxygenase system of hepatocytes, 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. Mikhail V. Belousov, Artem M. Guryev were supervisors of this work. Vladimir V. Sheikin, Aleksandr I. Petrakov conducted the study. Aleksandr I. Petrakov, Sergei V. Krivoshchekov, Ekaterina A. Bezverkhniaia prepared the text of the article. All the authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The authors express their acknowledgment to Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry with courses of analytical and toxicological chemistry of BSMU Khaliullin Ferkat Adelzyanovich and Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry with courses of analytical and toxicological chemistry of BSMU Klen Elena Edmudovna for the synthesis and provision of the substance 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine.

For citation: Petrakov A. I., Sheikin V. V., Krivoshchekov S. V., Bezverkhniaia E. A., Guryev A. M., Belousov M. V. Development of the tablet dosage form composition for the inductor of hepatocytes monoxygenase system based on 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-f]xanthine. *Drug development & registration*. 2023;12(4):189–196. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1517>

ВВЕДЕНИЕ

Для осуществления детоксицирующей функции печени необходимо нормальное функционирование цитохром-Р450-зависимой монооксигеназной системы гепатоцитов (МСГ), осуществляющей катаболизм эндогенных токсинов и ксенобиотиков (в том числе лекарственных средств) и являющейся одним из ключевых механизмов детоксикации организма.

Как правило, на фоне хронических гепатитов и циррозов функция МСГ резко снижена, что в ряде случаев является причиной перехода гепатита в цирроз печени и летального исхода заболевания [1]. Существует множество хронических диффузных заболеваний печени, снижающих ее функцию. Пациенты с неалкогольной жировой болезнью печени подвергаются повышенному риску ее лекарственного пораже-

ния [2]. Лекарственные поражения печени, также зависящие от нормального функционирования системы цитохрома P450, становятся глобальной проблемой и могут привести к печеночной недостаточности, смерти или необходимости трансплантации [3]. Также в группу риска нарушения функции системы цитохрома попадают люди с алкогольным поражением печени, их число согласно исследованиям составляет до 4,8 % населения Земли [4].

Система цитохрома P450 также отвечает за образование из арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот эйкозаноидов, играющих важную роль в защите печени от множественных воспалительных процессов [5].

В медицинской практике существует ряд лекарственных препаратов, обладающих свойствами индукторов монооксигеназной системы печени, способных повышать активность изоформ P450, идентичных по характеристикам фенобарбиталиндуцируемым («Фенобарбитал», «Бензонал»): «Нифедипин», «Фенитоин», кордиамин, «Карбамазепин», «Бензобамил», «Перфтордекалин», «Лоратадин», «Мидазолам», «Дилтиазем», «Верапамил», «Исрадипин», «Никардипин», «Сквалестатин», «Флувастатин», «Аторвастатин», «Симвастатин» и др. [6, 7]. Однако в силу нестабильности эффекта (малой продолжительности, инверсии с изменением дозы) они не перспективны в качестве специфических ферментиндуцирующих средств.

Описан относительно успешный опыт клинического использования некоторых препаратов в качестве средств активации МОС. К ним относятся фенобарбитал, бензонал, кордиамин, рифампицин. Однако все названные лекарственные препараты имеют серьезные побочные эффекты, существенно ограничивающие их применение в клинической практике. К числу таковых у барбитуратов относятся выраженные ЦНС-депрессорные эффекты, риск развития возможных нарушений обмена веществ, тератогенных эффектов, аллергических реакций, развития атеросклероза. Кордиамин обладает выраженным центральным действием и весьма умеренной активностью, для проявления которой требуются большие дозы препарата. Использование рифампицина ограничено его основными фармакологическими свойствами и гепатотоксичностью [8].

В качестве объекта фармацевтической разработки выбрано соединение из группы пиперидинометилтиазолоксантина – 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантин (ДПДТК), обеспечивающий нормализацию детоксицирующей функции печени при хронических гепатитах. В отличие от лекарственных препаратов, приводимых выше и опосредованно влияющих на систему монооксигеназ гепатоцитов, ДПДТК избирательно и селективно воздействует на монооксигеназную систему, вызывая индукцию цитохрома P450 [9, 10], приводя к активации детоксицирующей функции печени при токсическом повреждении, обеспечивая защитные реакции клетки на окислительный стресс.

Перечисленные преимущества делают ДПДТК перспективным кандидатом для создания лекарственного препарата на его основе. Для этого необходимо разработать оптимальную лекарственную форму перспективного препарата. При выборе оптимальной лекарственной формы, предназначенной для перорального применения, необходимо учитывать, что наиболее удобной, технологичной и экономически привлекательной для производителей является таблетированная лекарственная форма.

Цель. Получение таблетированной лекарственной формы 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина методом прямого пресования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе изучалась субстанция ДПДТК (серия № DPDX270216001 в количестве 5,1 г), применялись лактозы моногидрат (200-559-2, ООО «Нефтегазхимкомплект», Россия), микрокристаллическая целлюлоза (100-32-2, Silverline chemicals Ltd., Индия), крахмал картофельный, гидроксипропилцеллюлоза (ZW180113, Fengchen Group Co., Ltd., Китай), тальк (ООО «Агат-Мед», Россия), магния стеарат (209-150-3, Ataman Chemicals), вода очищенная (ФС.2.2.0020.15, Комплекс водоочистительный KB-02-1 ВО, Steripore).

В настоящем исследовании использовалось следующее оборудование: весы аналитические HR-200 (AND, Япония), влагомер MS-70 (AND, Япония), мельница лабораторная IKA A11 basic (IKA, Германия), тестер SVM 101 (ERWEKA GmbH, Германия), набор плетеных сит (Россия), сушильный шкаф ШС-80 (Россия), порционные весы HL-200 (AND, Япония), тестер сыпучести серии ERWEKA GTL со сменными насадками с диаметрами отверстий 10 мм (насадка № 1), 15 мм (насадка № 2), 25 мм (насадка № 3) (ERWEKA GmbH, Германия), тестер прочности ТВН 125 (ERWEKA GmbH, Германия), пресс-станок EP-1 (ERWEKA GmbH, Германия), ситовой анализатор RP 200N (CISA, Испания) в комплекте с 8 ситами Ø200 × 50 мм, ламинарный шкаф АНА-145-ВВ-А, прибор определения распадаемости таблеток и капсул ZT 222 (ERWEKA GmbH, Германия).

Для измерения параметров взята одна серия в 5 повторностях. Результаты измерений представлены в формате среднего и линейного отклонения ($\bar{X} + \Delta X$), $\alpha = 0,90$.

Изучение технологических свойств субстанции 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина. Исследование технологических параметров субстанции ДПДТК проводили по показателям: описание, потеря в массе при высушивании, фракционный состав (ОФС.1.2.1.0016.15), сыпучесть (ОФС.1.4.2.0016.15), насыпная масса (ОФС.1.4.2.0016.15), пористость (ОФС.1.4.2.0016.15), прессуемость, сила выталкивания таблетки из матрицы.

Определение показателя «потеря в массе при высушивании» провели на приборе для определения влажности MS-70 (AND, Япония). Точную навеску 5,0 г порошка субстанции 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина помещали на чашечку влагомера, доведенную до постоянной массы, и высушивали при температуре 100–105 °С до постоянной массы.

Фракционный состав определяли методом ситового анализа согласно ОФС.1.1.0015.15. Масса пробы – 100 г.

С помощью тестера сыпучести ERWEKA GTL проводили измерение сыпучести порошка согласно ОФС.1.4.2.0016.15: определение сыпучести и определение угла естественного откоса с применением сменных насадок с диаметрами отверстий 10 мм (насадка № 1), 15 мм (насадка № 2) и 25 мм (насадка № 3).

С помощью тестера насыпной плотности ERWEKA SVM 101 проводили изучение насыпной плотности. Брали навеску массой 50 г. Измерение проводили согласно ОФС.1.4.2.0016.15: определение насыпного объема.

Методом вытеснения проводили определение пористости порошка субстанции. После завершения измерения насыпной массы измеряли объем порошка после уплотнения (V_1), добавляли равный объем жидкости (V_2), в которой изучаемое вещество нерастворимо (глицерин). Воздух удаляли под вакуумом, измеряли суммарный объем порошка и глицерина (V_3).

$$\Pi = \frac{[(V_1 + V_2) - V_3]}{V_1} \cdot 100 \%,$$

где V_3 – суммарный объем порошка и глицерина после удаления воздуха; V_2 – объем глицерина; V_1 – объем порошка с уплотнением.

В качестве основной формы выбраны облонги длиной 14 мм, шириной 5 мм, такая форма предполагает, что оптимальная масса таблетки будет в пределах 0,34 г.

Прессуемость изучали на промышленном эксцентриковом пресс-станке EP-1 (ERWEKA GmbH, Германия), пресс-станок снабжен манометром. 0,5 г субстанции помещали в матрицу заданной формы и повышали давление до образования таблетки, обладающей хорошей прочностью на раздавливание: для облонгов в пределах 180–220 Н [11].

Силу выталкивания таблетки из матрицы определяли путем измерения давления, затрачиваемого на выталкивание таблетки из матрицы, по Маххамову [12] по формуле:

$$P_{\text{МПа/Выт.}} = P_{\text{затр.}} \times 26,4/S_{\text{бок'}}$$

где $P_{\text{затр.}}$ – давление, затрачиваемое на выталкивание, МПа; $S_{\text{бок'}}$ – боковая поверхность таблетки, м².

Изучение технологических параметров таблеточных масс и таблеток. Для исследования влияния вспомогательных веществ на свойства лекарствен-

ной формы для получения таблеточной массы порошки просеивали через сито с размером ячейки 0,25 мм, при необходимости порошки измельчали с использованием лабораторной мельницы IKA A11 basic (IKA, Германия), также в лабораторной мельнице смешивали необходимое количество ингредиентов до образования равномерной массы. Для проведения анализа было использовано 50,0 г таблеточной массы. Полученную массу оценивали по показателям: сыпучесть, насыпная масса, прессуемость и сила выталкивания таблетки из матрицы.

Таблеточные массы подвергались прямому прессованию (пресс-станок ERWEKA EP-1). Полученные таблетки изучали по параметрам: средняя масса, прочность на раздавливание, распадаемость. Изучение распадаемости проводили согласно ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул». Интерпретацию результатов проводили согласно ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки» (таблетки без оболочки). Изучение прочности на раздавливание проводили согласно ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования технологических и физико-химических параметров субстанции ДПДТК представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что в исследуемой субстанции в большом количестве содержится фракция с размером частиц от 0,25 до 0,125 мм, при этом субстанция не обладает естественной сыпучестью (порошок одномоментно высыпался из насадки № 3 с диаметром 25 мм), поэтому для определения показателя сыпучести исследовали угол естественного откоса, который указывает на неудовлетворительную степень сыпучести (от 47 до 55° согласно Государственной фармакопее). Субстанция обладает малой насыпной плотностью и высокой пористостью. Для образования прочной таблетки (180–220 Н на раздавливание) понадобилось давление 400 МПа. Например, по методике Маххамова нормальным давлением изучения прессуемости таблеточных масс является 130 МПа [12]. Давление прессования изучаемой субстанции объективно выше. Полученные данные свидетельствуют о нежелательности таблетирования субстанции 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина методом прямого прессования в чистом виде. Поэтому следующим этапом работы стало исследование влияния введения вспомогательных веществ (ВВ) с целью оптимизации характеристик технологической смеси (ТС).

Для оптимизации технологических свойств субстанции 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина были выбраны группы ВВ: наполнители, дезинтеграторы (разрыхлители), склеивающие и скользящие вещества. Содержание ВВ ограничивает выбор формы и размера таблетки.

Таблица 1. Технологические и физико-химические параметры субстанции 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина

Table 1. Technological and physical and chemical parameters of the substance 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine

Параметры Parameters	Результаты испытания Results
Внешний вид / описание Appearance / Description	Белая или бело-серая аморфная субстанция White or white-grey and amorphous substance
Потеря в массе при высушивании (HR), % Loss on drying (HR), %	1,3 ± 0,5
Фракционный состав, мм – % Fractional composition, mm – %	<0,125 – 4,6% 0,125–0,25 – 93,6 % 0,25–0,5 – 1,8 % 0,5–1 – 0 % >1 – 0 %
Сыпучесть (V_c), г/с Flowability (V_c), g/s	Субстанция не обладает естественной сыпучестью Substance does not have a natural flowability
Угол естественного откоса (α), ° Angle of repose (α), °	47
Насыпная плотность (ρ), г/см ³ Bulk density (ρ), g/cm ³	0,363 ± 0,04
Пористость, % Porosity, %	62 ± 7
Давление прессования до образования прочной таблетки (P), МПа Tablet compression (cohesion) (P), МПа	450 ± 38
Прочность на раздавливание таблетки (G), Н Crushing strength (G), N	190 ± 10
Сила выталкивания таблетки из матрицы ($P_{\text{МПа/Выт.}}$), МПа Ejection force of the tablet from matrix ($P_{\text{МПа/Еject.}}$), МПа	1,4 ± 0,2

Исследование влияния веществ-наполнителей на свойства таблетуемой массы. Выбор наполнителя обусловлен в первую очередь возможностью улучшения показателя прессуемости ТС. Для этого в качестве наполнителей использованы лактозы моногидрат и микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ). Для успешного прессования данных веществ не требуется высокое давление. В составы таблеток с 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантином введены различные соотношения лактозы моногидрата и микрокристаллической целлюлозы – 1:1; 1:2; 2:1, поэтому было разработано 5 прописей, представленных в таблице 2. Результаты анализа таблеток представлены в таблице 3.

Как видно из полученных данных, введение наполнителей позволило уменьшить давление прессования 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина, однако остальные технологические свойства улучшились незначительно (по результатам исследования угла естественного откоса

смесь получила удовлетворительную сыпучесть) или, наоборот, ухудшились (сила выталкивания таблетки из матрицы увеличилась).

Таблица 2. Состав прописей с лактозой и целлюлозой на одну таблетку

Table 2. Composition of prescriptions with lactose and cellulose per one tablet

Субстанция Substance	Номер прописи Prescription number				
	1	2	3	4	5
6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантин, г 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine, g	0,100				
Лактозы моногидрат, г lactose monohydrate, g	0,24	–	0,16	0,08	0,12
Микрокристаллическая целлюлоза, г microcrystalline cellulose, g	–	0,24	0,08	0,16	0,12
Общая масса, г Total weight, g	0,34				

Анализ таблеток показал, что при введении в состав лактозы таблетки обладали низкой прочностью и быстро разрушались. В то время как введение в состав большого количества микрокристаллической целлюлозы, наоборот, повышало прочность, и таблетки не распадались за 15 минут, что не соответствует ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул». Кроме того, ни одна из прописей не соответствовала показателю «средняя масса»: отклонение в массе превышало 10 %, также наблюдалось расслоение таблеток и образование сколов на поверхности. Отклонение в массе может быть связано с тем, что таблеточная масса, используемая для получения данной таблетированной формы, имеет удовлетворительную, но недостаточную сыпучесть, что может отразиться на однородности дозирования и скоростях процесса при использовании автоматических систем, особенно при использовании роторных таблеточных прессов [13].

Оптимальные результаты показали прописи № 3 и 5, где использовалась смесь лактозы и микрокристаллической целлюлозы в соотношении 2:1 и соответственно 1:1. Такие таблетки имели приемлемые показатели и в отличие от других прописей проходили испытания на распадаемость и прочность на раздавливание. Поэтому для дальнейших исследований за основу взяты эти прописи.

Изучение влияния скользящих веществ на свойства таблетуемой массы. Для повышения сыпучести и уменьшения силы выталкивания в производстве таблеток используется группа скользящих веществ. В качестве скользящих веществ использовали тальк и магния стеарат. Их содержание в таблетках до конкретных величин ограничивает ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки»: талька не более 3 %, магния стеарата не более 1 %. Состав прописей представлен в таблице 4.

Таблица 3. Зависимость технологических свойств субстанции 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина от наполнителей лактозы и целлюлозы ($X \pm x$)

Table 3. Dependence of the technological properties of the substance 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine on lactose and cellulose excipients ($X \pm x$)

Параметры Parameters	Номер прописи Prescription number				
	1	2	3	4	5
Параметры таблеточной массы Tablet mass parameters					
$V_{ст}$, г/с $V_{ст}$, g/s	1,8 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3
α , °	44	40	41	40	42
ρ , г/см ³ ρ , g/sm ³	0,43 ± 0,02	0,54 ± 0,05	0,41 ± 0,01	0,47 ± 0,04	0,49 ± 0,04
P , МПа P , MPa	240 ± 16	260 ± 5	230 ± 7	250 ± 15	240 ± 8
$P_{МПа/Выт.}$, МПа $P_{МПа/Екст.}$, МПа	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Параметры таблеток Tablet parameters					
$m_{средн.}$, г $m_{average}$, g	0,281 ± 0,045	0,314 ± 0,064	0,298 ± 0,029	0,323 ± 0,053	0,305 ± 0,039
G , Н G , N	54 ± 6	213 ± 17	136 ± 8	196 ± 21	154 ± 12
Распадаемость, с Disintegration, s	140 ± 30	Таблетки не распались за 900 секунд Tablet did not disintegrate in 900 s	820 ± 60	Таблетки не распались за 900 секунд Tablet did not disintegrate in 900 s	840 ± 120

Таблица 4. Состав прописей на одну таблетку

Table 4. Composition of prescriptions with gliding agent per one tablet

Субстанция Substance	Номер прописи Prescription number			
	6	7	8	9
6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантин, г 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine, g	0,100			
Лактозы моногидрат, г Lactose monohydrate, g	0,16	0,12	0,16	0,12
Микрокристаллическая целлюлоза, г Microcrystalline cellulose, g	0,08	0,12	0,08	0,12
Тальк, г Talc, g	0,01	0,01		
Магния стеарат, г Magnesium stearate, g			0,0034	0,0034

Прописи изучали по параметрам сыпучести и силы выталкивания, результаты представлены на рисунках 1 и 2.

Из диаграмм видно, что введение в состав прописи скользящих веществ позволило значительно снизить силу выталкивания таблетки из матриц (в 5 раз), при этом сыпучесть таблеточной массы в среднем выросла с 2,3 г/с до 3,5–4 г/с. Наилучшие результаты продемонстрировала пропись № 8 с добавлением магния стеарата.

Изучение влияния дезинтеграторов на свойства таблетуемой массы и таблеток. В ходе пре-

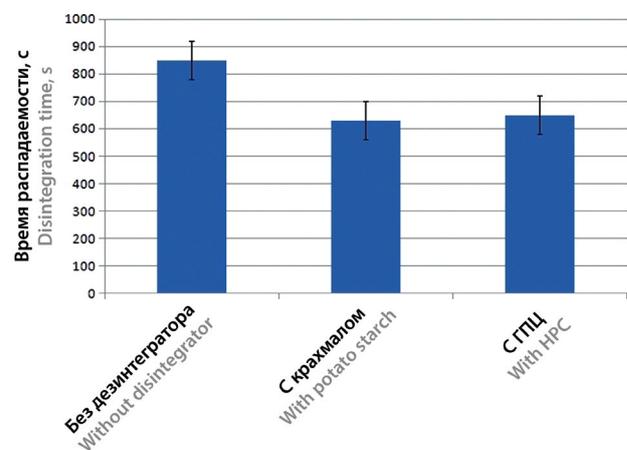


Рисунок 1. Сыпучесть таблеточной массы в зависимости от скользящих веществ

Figure 1. Flowability of the tablet mass depending on gliding agents

дыщего эксперимента распадаемость таблеток выбранных прописей была в границах допустимых, но приближалась к критическому времени (не более 15 минут согласно ГФ РФ XIV, ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки»), поэтому для улучшения распадаемости в состав таблеток вводили дезинтеграторы. В качестве дезинтеграторов были выбраны крахмал картофельный и гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ). В производственных условиях количество дезинтеграторов

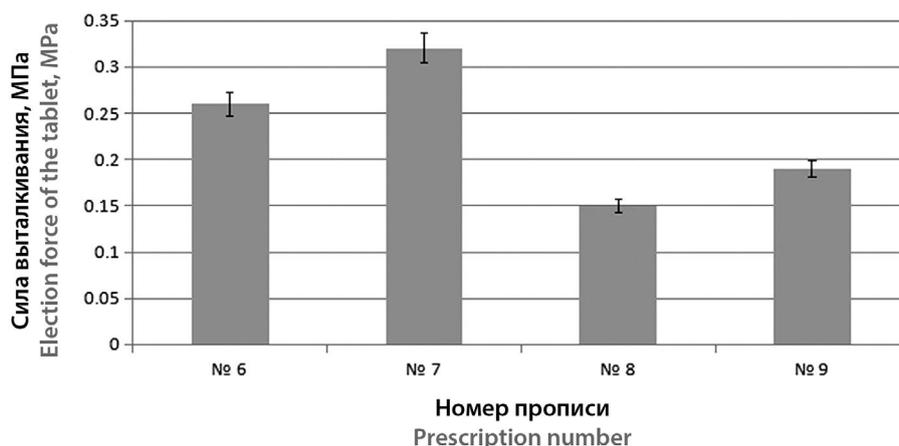


Рисунок 2. Сила выталкивания таблеток из матрицы в зависимости от скользящих веществ

Figure 2. Ejection force of the tablet depending on gliding agent

зачастую не превышает 10 % от количества вспомогательных веществ, поэтому в эксперименте их количество было ограничено данной цифрой. В качестве основы была взята пропись № 8 (см. таблицу 4), как показавшая наиболее оптимальные результаты. Количество лактозы и микрокристаллической целлюлозы было пропорционально уменьшено на 5 %, и введено нужное количество дезинтегратора. Из полученной таблеточной массы прессовали таблетки и оценивали время распадаемости.

Влияние дезинтеграторов на распадаемость таблеток 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидро-тиазоло[2,3-F]ксантина представлено на рисунке 3.

Таким образом, добавление дезинтеграторов позволило снизить время распадаемости до 11–12 минут. При этом статистической разницы между добавлением крахмала и гидроксипропилцеллюлозы не

наблюдалось, поэтому в прописи таблеток ДПДТК решено использовать крахмал, как наиболее доступный компонент.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана технологическая возможность получения таблетированной формы на основе 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидро-тиазоло[2,3-F]ксантина, удовлетворяющей требованиям ГФ РФ. Предложен оптимальный состав прописи таблетированной лекарственной формы – облонги длиной 14 мм, шириной 5 мм, со средней массой 0,34 г. Изучены технологические свойства полученных составов (прессуемость, сыпучесть, прочность на раздавливание, распадаемость и др.), и на основе полученных данных разработан первичный состав на одну таблетку, представленный в таблице 5.

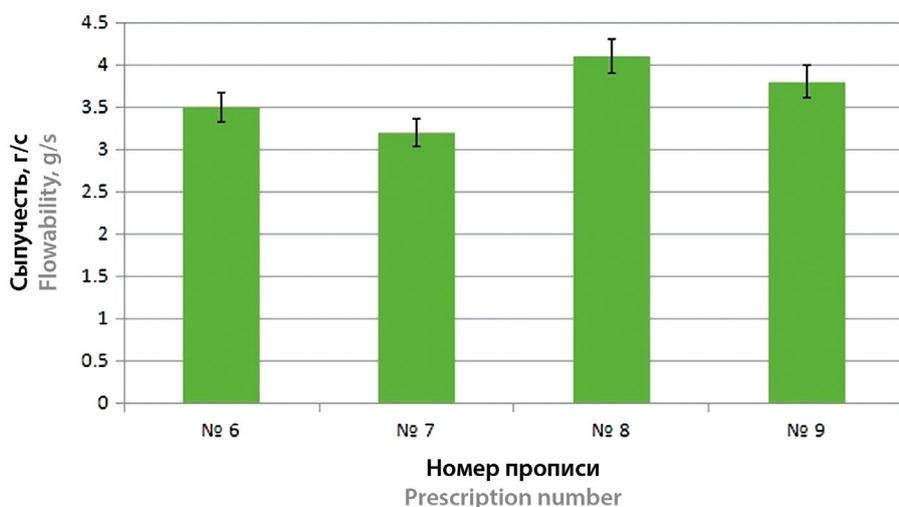


Рисунок 3. Распадаемость таблеток в зависимости от дезинтеграторов

Figure 3. Disintegration of tablets depending on disintegrators

Таблица 5. Первичный состав таблеток 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина

Table 5. Composition first composition of 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine tablets

Субстанция 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина, г Substance 6,8-dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine, g	0,100
Лактозы моногидрат, г Lactose monohydrate, g	0,144
Микрокристаллическая целлюлоза, г Microcrystalline cellulose, g	0,072
Крахмал картофельный, г Potato starch, g	0,024
Магния стеарат, г Magnesium stearate, g	0,0034
Общая расчетная масса, г Total weight, g	0,343

В дальнейшем рассматривается применение сухой или влажной грануляции для улучшения технологических характеристик таблеточной массы, в частности сыпучести. Улучшение показателя сыпучести необходимо для оптимизации технологии получения таблеток на основе 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-F]ксантина, так как определяет скорость процесса, качество дозирования и прессования.

ЛИТЕРАТУРА

- Новожеева Т.П., Смагина М.И., Черевко Н.А., Фатеева С.Н. Бензонал и фторбензобарбитал – индукторы фенобарбиталового типа монооксигеназной системы печени. *Бюллетень сибирской медицины*. 2011;10(5):78–81. DOI: 10.20538/1682-0363-2011-5-78-81.
- Lammert C., Imler T., Teal E., Chalasani N. Patients With Chronic Liver Disease Suggestive of Nonalcoholic Fatty Liver Disease May Be at Higher Risk for Drug-Induced Liver Injury. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(13):2814–2815. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.12.013.
- Ma J., Ghabril M., Chalasani N. Drug-Induced Acute-on-Chronic Liver Failure: Challenges and Future Directions. *Clinics in Liver Disease*. 2023;27(3):631–648. DOI: 10.1016/j.cld.2023.03.007.
- Han S., Yang Z., Zhang T., Ma J., Chandler K., Liangpunsakul S. Epidemiology of Alcohol-Associated Liver Disease. *Clinics in Liver Disease*. 2021;25(3):483–492. DOI: 10.1016/j.cld.2021.03.009.
- Shoieb S.M., El-Ghiaty M.A., Alqahtani M.A., El-Kadi A.O.S. Cytochrome P450-derived eicosanoids and inflammation in liver diseases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2020;147:106400. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2019.106400.
- Nishimura Y., Kurata N., Sakurai E., Yasuhara H. Inhibitory Effect of Antituberculosis Drugs on Human Cytochrome P450-Mediated Activities. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004;96(3):293–300. DOI: 10.1254/jphs.fp0040296.
- Sadeghi S.J., Ferrero S., Di Nardo G., Gilardi G. Drug–drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4. *Bioelectrochemistry*. 2012;86:87–91. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2012.02.010.
- Ковалева И.Ю. Побочные эффекты антиэпилептической терапии. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2017;9(1):51–61. DOI: 10.17749/2077-8333.2017.9.1.051-061.
- Газизова И.П., Алехин Е.К. Антитоксические свойства нового индуктора микросомальной ферментной системы гепазана. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2001;5:96–98.

- Никитин Н.А., Халиуллин Ф.А., Алехин Е.К., Токунова Э.Ф., Тюрина О.В., Клен Е.Э., Тюрина Л.А. Зависимости «структура-активность» модуляторов микросомальной ферментной системы. Сообщение II Исследование индукторов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2001;6:46–49.
- Нестеренко В.Г., Болгарин Р.Н., Рудой Б.А., Салахетдинов Д.Х., Казайшвили Ю.Г., Щербакова В.С., Никитина Н.А., Медведев Ю.В., Фишер Е.Н., Малашенко Е.А., Шохин И.Е. Разработка гастроретентивной лекарственной формы нового перспективного противотуберкулезного лекарственного средства макозинон. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):55–69. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-55-69.
- Махкамов С.М. Основы таблеточного производства. Ташкент: Фан; 2004. 148 с.
- Кугач В.В., Костантин Ж., Скулович З.Б., Петров В.В. Применение компактирования в производстве таблеток с рибофлавином. *Вестник фармации*. 2007;3(37):60–68.

REFERENCES

- Novozheyeva T.P., Smagina M.I., Cherevko N.A., Fateyeva S.N. Benzobarbital and fluorbenzobarbital – hepatic monoxygenase system phenobarbital-like inducers. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2011;10(5):78–81. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2011-5-78-81.
- Lammert C., Imler T., Teal E., Chalasani N. Patients With Chronic Liver Disease Suggestive of Nonalcoholic Fatty Liver Disease May Be at Higher Risk for Drug-Induced Liver Injury. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(13):2814–2815. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.12.013.
- Ma J., Ghabril M., Chalasani N. Drug-Induced Acute-on-Chronic Liver Failure: Challenges and Future Directions. *Clinics in Liver Disease*. 2023;27(3):631–648. DOI: 10.1016/j.cld.2023.03.007.
- Han S., Yang Z., Zhang T., Ma J., Chandler K., Liangpunsakul S. Epidemiology of Alcohol-Associated Liver Disease. *Clinics in Liver Disease*. 2021;25(3):483–492. DOI: 10.1016/j.cld.2021.03.009.
- Shoieb S.M., El-Ghiaty M.A., Alqahtani M.A., El-Kadi A.O.S. Cytochrome P450-derived eicosanoids and inflammation in liver diseases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2020;147:106400. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2019.106400.
- Nishimura Y., Kurata N., Sakurai E., Yasuhara H. Inhibitory Effect of Antituberculosis Drugs on Human Cytochrome P450-Mediated Activities. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004;96(3):293–300. DOI: 10.1254/jphs.fp0040296.
- Sadeghi S.J., Ferrero S., Di Nardo G., Gilardi G. Drug–drug interactions and cooperative effects detected in electrochemically driven human cytochrome P450 3A4. *Bioelectrochemistry*. 2012;86:87–91. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2012.02.010.
- Kovaleva I.Yu. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2017;9(1):51–61. (In Russ.) DOI: 10.17749/2077-8333.2017.9.1.051-061.
- Gazizova I.R., Alekhin E.K. Antitoxic properties of the new inducer of the microsomal enzyme system hepazan. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2001;5:96–98. (In Russ.)
- Nikitin N.A., Khaliullin F.A., Alekhin E.K., Tokunova E.F., Tyurina O.V., Klen E.E., Tyurina L.A. Structure-activity relationships of microsomal enzyme modulators systems. Message II Study of inducers. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2001;6:46–49. (In Russ.)
- Nesterenko V.G., Bolgarin R.N., Rudoy B.A., Salakhedinov D.K., Kazayshvili Yu.G., Scherbakova V.S., Nikitina N.A., Medvedev Yu.V., Fisher E.N., Malashenko E.A., Shohin I.E. Development of a Gastro-retentive Dosage Form of a New Promising Anti-tuberculosis Drug Macozinone. *Drug development & registration*. 2021;10(3):55–69. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-55-69.
- Mahkamov S.M. Fundamentals of tablet production. Tashkent: Fan; 2004. 148 p. (In Russ.)
- Kugach V.V., Kostantin Zh., Skulovich Z.B., Petrov V.V. Application of compaction in the production of tablets with riboflavin. *Vestnik farmacii*. 2007;3(37):60–68. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1526>
УДК 615.322:547.5



Оригинальная статья / Research article

Изучение химического состава и биологического действия ароматных вод в сравнительном аспекте

Е. В. Бурцева¹✉, А. М. Кацев¹, Е. В. Кулдыркаева², И. С. Мехоношина¹,
Л. А. Тимашева³, О. А. Пехова³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского». 295007, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, просп. Академика Вернадского, д. 4

² Акционерное общество «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод», 298500, Россия, Республика Крым, г. Алушта, ул. 15-го апреля, д. 37

³ Федеральное государственное бюджетное учреждения науки «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма», 295034, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, д. 150

✉ Контактное лицо: Бурцева Елена Владимировна. E-mail: Burtsevaev2009@yandex.ru

ORCID: Е. В. Бурцева – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>; А. М. Кацев – <https://orcid.org/0000-0002-7762-3818>; Е. В. Кулдыркаева – <https://orcid.org/0000-0003-0864-476X>;
И. С. Мехоношина – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>; Л. А. Тимашева – <https://orcid.org/0000-0001-9230-7664>; О. А. Пехова – <https://orcid.org/0000-0003-1725-9046>.

Статья поступила: 31.07.2023

Статья принята в печать: 19.10.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Все большую популярность приобретают продукты переработки растительного сырья. Особую ценность представляют продукты эфиромасличного производства – ароматные воды, или гидролаты. Гидролаты широко используются в качестве косметических средств, поскольку содержат ряд биологически активных водорастворимых компонентов эфирного масла, но в отличие от последнего имеют более мягкое воздействие на кожу, что позволяет использовать их в чистом виде.

Цель. Изучить химический состав, антибактериальную и антиоксидантную активность гидролатов.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовались гидролаты производства АО «АЭМСЗ», полученные из растений *Lavandula angustifolia*, *Hyssopus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Rosa damascena* × *Rosa gallica*. Анализ состава проводили методами ГЖХ. Антибактериальные свойства гидролатов изучали на морских биолюминесцентных тест-бактериях *Allivibrio fischeri* F1 и рекомбинантных бактериях *Escherichia coli* (pXen7). Изучение антиоксидантного действия проводилось методом Fe³⁺-индуцированного перекисного окисления липидов суспензии яичных липопропротеидов *in vitro*.

Результаты и обсуждение. Было выявлено, что гидролат шалфея содержит α- и β-туйон, β-кариофиллен, α-терпинеол; гидролат лаванды – камфен, линалоол, линалилацетат, гераниол, геранилацетат; гидролат розмарина – камфен, 1,8-цинеол, β-пинен; гидролат розы – фенилэтанол, гераниол, цитронеллол, нерол; гидролат иссопа – пинокамфон, изопинокамфон, спатуленол, β-кариофиллен. Антибактериальные свойства исследуемых гидролатов проявлялись в ингибировании бактериальной люминесценции и роста тест-бактерий. Наибольшей активностью обладали гидролаты иссопа, лаванды и розмарина, меньшим эффектом – розы и шалфея. Показано бактерицидное действие гидролатов иссопа и лаванды. При изучении антиоксидантного действия наблюдалась динамика накопления продуктов свободнорадикального окисления липидов, которая в присутствии гидролатов иссопа и розмарина снизилась на 40 и 36 % соответственно в сравнении с контролем.

Заключение. В результате исследований установлено, что изучаемые гидролаты обладают выраженными антибактериальными свойствами. Также были выявлены антиоксидантные свойства гидролатов *Hyssopus officinalis* и *Rosmarinus officinalis*. Перспективой дальнейших исследований является разработка лекарственных и косметических средств на основе гидролатов вышеуказанных эфиромасличных культур.

Ключевые слова: ароматная вода, антибактериальная активность, антиоксидантная активность

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

Вклад авторов. Е. В. Бурцева, Е. В. Кулдыркаева отвечали за дизайн эксперимента, обработку и интерпретацию полученных данных. Л. А. Тимашева, О. А. Пехова осуществили анализ компонентного состава ароматных вод хроматографическим методом. И. С. Мехоношина, Е. В. Бурцева провели испытания по антиоксидантной активности ароматных вод. А. М. Кацев осуществил анализ антибактериальной активности ароматных вод. Е. В. Бурцева, Е. В. Кулдыркаева и И. С. Мехоношина провели подготовку проекта рукописи, литературный поиск по научному направлению и редакторские правки. Е. В. Бурцевой, А. М. Кацеву принадлежит научная идея и окончательная корректура статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20206, <https://rscf.ru/project/22-25-20206>.

Для цитирования: Бурцева Е. В., Кацев А. М., Кулдыркаева Е. В., Мехоношина И. С., Тимашева Л. А., Пехова О. А. Изучение химического состава и биологического действия ароматных вод в сравнительном аспекте. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):197–208. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1526>

Study of the Chemical Composition and Biological Effects of Aromatic Waters in a Comparative Aspect

Yelena V. Burtseva¹✉, Andrey M. Katsev¹, Ekaterina V. Kuldyrkaeva², Irina S. Mekhonoshina¹,
Lidiya A. Timasheva³, Olga A. Pekhova³

¹ V. I. Vernadsky Crimean Federal University. 4, Akademika Vernadskogo ave., Republic of Crimea, Simferopol, 295007, Russia

² JSC "Alushta essential-oils sovhoz-zavod". 37, April 15th str., Alushta, Republic of Crimea, 298500, Russia

³ Research Institute of Agriculture of Crimea. 150, Kievskaya str., Simferopol, Republic of Crimea, 295043, Russia

✉ Corresponding author: Yelena V. Burtseva. E-mail: Burtsevaev2009@yandex.ru

© Бурцева Е. В., Кацев А. М., Кулдыркаева Е. В., Мехоношина И. С., Тимашева Л. А., Пехова О. А., 2023

© Burtseva Ye. V., Katsev A. M., Kuldyrkaeva E. V., Mekhonoshina I. S., Timasheva L. A., Pekhova O. A., 2023

ORCID: Yelena V. Burtseva – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>; Andrey M. Katsev – <https://orcid.org/0000-0002-7762-3818>;
Ekaterina V. Kuldyrkaeva – <https://orcid.org/0000-0003-0864-476X>; Irina S. Mekhonoshina – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>;
Lidiya A. Timasheva – <https://orcid.org/0000-0001-9230-7664>; Olga A. Pekhova – <https://orcid.org/0000-0003-1725-9046>.

Received: 31.07.2023 Revised: 19.10.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Vegetable raw materials processing products are becoming very popular. Of particular value are the products of essential oil production – aromatic waters or hydrolates. Hydrolates are widely used as cosmetics because they contain a number of biologically active water-soluble components of essential oil, but unlike the latter they have a softer effect on the skin, which allows them to be used in their pure form.

Aim. To study the chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of hydrolates.

Materials and methods. Hydrolates were used as objects of research of production JSC "AEMSZ" derived from plants: *Lavandula angustifolia*, *Hyssopus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Rosa damascena* × *Rosa gallica*. The composition was analyzed by gas-liquid chromatography. Antibacterial properties of hydrolates were studied with the use of bioluminescent marine bacteria *Aliivibrio fischeri* F1 and recombinant test-bacteria *Escherichia coli* MG1655 (pXen7). The study of the antioxidant effect was carried out by the method of Fe³⁺-induced lipid peroxidation of egg lipoprotein suspension *in vitro*.

Results and discussion. It was found that salvia hydrolate contains α- and β-thujone, β-caryophyllene, α-terpineol; lavender hydrolate – camphene, linalool, linalyl acetate, geraniol, geranyl acetate; rosemary hydrolate – camphene, 1,8-cineol, β-pinene; rose hydrolate – phenylethanol, geraniol, citronellol, nerol; hydrolate hyssop – pinocamphone, isopinocamphone, spatulenol, β-caryophyllene. The antibacterial properties of the studied hydrolates were manifested in the inhibition of test bacteria bioluminescence and growth. Hydrolates of hyssop, lavender and rosemary were characterized by the greatest activity, rose and salvia had a lesser effect. It was also shown that hyssop and lavender hydrolates exhibited the bactericidal properties. Through the studying the antioxidant effect, the dynamics of accumulation of products of free-radical oxidation of lipids was observed, which in the presence of hyssop and rosemary hydrolates decreased by 40 and 36 %, respectively, in comparison with the control.

Conclusion. As a result of the research, it was found that the studied hydrolates have pronounced antibacterial properties. Antioxidant properties of *Hyssopus officinalis* and *Rosmarinus officinalis* hydrolates were also revealed. Prospects for further research are the development of medicinal and cosmetic products based on the hydrolates of the above-stated essential oil cultures.

Keywords: aromatic water, antibacterial activity, antioxidant activity, *Lavandula angustifolia*, *Hyssopus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Rosa damascena* × *Rosa gallica*

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. Yelena V. Burtseva, Ekaterina V. Kuldyrkaeva were responsible for the design of the experiment, processing and interpretation of the data obtained. Lidiya A. Timasheva, Olga A. Pekhova analyzed the component composition of aromatic waters by chromatographic method. Irina S. Mekhonoshina, Yelena V. Burtseva conducted tests on the antioxidant activity of aromatic waters. Andrey M. Katsev analyzed the antibacterial activity of aromatic waters. Yelena V. Burtseva, Ekaterina V. Kuldyrkaeva and Irina S. Mekhonoshina conducted the preparation of the draft manuscript, search of scientific literature and editorial edits. Yelena V. Burtseva, Andrey M. Katsev owns the scientific idea and the final proofreading of the article.

Funding. The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Fund № 22-25-20206, <https://rscf.ru/project/22-25-20206>.

For citation: Burtseva Ye. V., Katsev A. M., Kuldyrkaeva E. V., Mekhonoshina I. S., Timasheva L. A., Pekhova O. A. Study of the chemical composition and biological effects of aromatic waters in a comparative aspect. *Drug development & registration*. 2023;12(4):197–208. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1526>

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день все большую популярность приобретают продукты эфиромасличного производства. В РФ, в частности в Крыму, культивация растений, таких как *Lavandula angustifolia*, *Hyssopus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Rosa damascena* × *Rosa gallica*, возрождается и с каждым годом площади сельскохозяйственных угодий увеличиваются. Используют сырье этих растений для получения эфирных масел и ароматных вод.

Согласно Государственной фармакопее РФ XIV издания ароматные воды – это водные или водно-спиртовые растворы, насыщенные компонентами эфирных масел, получаемые несколькими способами: перегонкой эфирномасличного растительного сырья с водяным паром, растворением эфирного масла в воде или разведением концентратов. Полученные раз-

ными способами ароматные воды могут отличаться по составу. Международная организация European Committee for Standardization выделяет понятие «гидролат» (hydrolate) – водный дистиллят, образующийся после дистилляции эфиромасличного сырья и отделения эфирного масла.

По физико-химическим свойствам гидролаты представляют собой прозрачные или слабо опалесцирующие жидкости, содержащие небольшое количество водорастворимых компонентов эфирного масла и имеющие запах и вкус соответствующего эфирного масла. Изучение состава гидролатов позволит предположить, какое действие они оказывают на организм, что даст возможность обоснованно рекомендовать их для использования.

Из литературных данных известно, что эфирное масло лаванды влияет на эмоциональное состояние человека, а именно: улучшает качество сна, на-

строение [1], оказывает противомикробное [2, 3] и антиоксидантное действие [2, 4], проявляет противовоспалительную активность [5]. Было выявлено противомикробное [6, 7], антиоксидантное [8, 9], противовирусное действие [10] масла розы. Биологически активные вещества шалфея и розмарина также оказывают антимикробное, антиоксидантное и противовоспалительное действие [11–14]. Сырье иссопа лекарственного обладает противомикробной [15, 16], антиоксидантной активностью [17].

Известно, что гидролат лаванды обладает наименьшим поверхностным натяжением, что, вероятно, связано с наличием в составе поверхностно-активных веществ и дает возможность производства на его основе пеномоющих средств [18].

Согласно литературным данным, гидролат лаванды, произрастающей в Италии, Тоскана, включает только оксигенированные монотерпены, среди которых основным компонентом является линалоол (42,9 %) [19], в то время как эфирное масло лаванды состоит из монотерпеновых углеводородов и оксигенированных монотерпенов. Гидролаты лаванды, полученные гидродистилляцией и паровой дистилляцией соответственно, содержали наибольшую долю 1,8-цинеола (20,6 и 19,5 %), линалоола фураноксида или линалоола (11,9 и 23,2 %), α -терпинеола (10,4 и 13 %). В гидролате, полученном методом паровой дистилляции, было идентифицировано больше соединений, что связано с превращением путем окислительных реакций, полимеризации и гидролиза некоторых летучих соединений при контакте растительного сырья с кипящей водой на протяжении всей дистилляции при гидродистилляции. Гидролат лаванды выявил значительную противомикробную активность в отношении восьми штаммов аркобактерподобных бактерий и против *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и дрожжей *Candida albicans*, в то время как разведенный гидролат выраженного противомикробного действия не оказывал. В присутствии гидролата также наблюдалось значительно сниженное образование биопленки [20]. Гидролат лаванды крымского происхождения в разведении 1:1 продемонстрировал слабое противогрибковое действие: ингибирование роста грибов рода *Candida* составляло 10–50 %. Разведение гидролата 1:8 не оказывало действия на рост грибов [21].

Известно, что гидролат розмарина обладает поглощением в УФ-области, т. е. оказывает фотопротекторное действие, следовательно, может применяться для производства солнцезащитных средств [18]. Согласно исследованиям [22], гидролат розмарина, произрастающего в Колумбии, не обладал ни потенциальным действием против *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* и *A. niger*, ни антиоксидантными свойствами, в отличие от эфирного масла розмарина. Однако, по данным литературы [19], гидролаты розмарина и шалфея, выращенных в Италии (Тоскана), проявили противогрибковое действие против штаммов дрожжевых грибов и дерматофитов: *Trichophyton*

mentagrophytes, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Arthroderma crocatum*, *Arthroderma quadrifidum*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*. Данную активность авторы расценивают как слабую противогрибковую по сравнению с флуконазолом, гризеофульвином. *Trichophyton erinacei* и *Arthroderma gypseum* были устойчивы к анализируемым гидролатам, в то время как все другие штаммы ингибировались при концентрациях ниже 100 мкл/мл [19]. Гидролат шалфея мускатного, выращенного в Крыму, в разведении 1:1 подавлял рост дрожжеподобных грибов рода *Candida* на величину от 10 до 70 %. Разведение гидролата 1:8 не оказывало действия на рост грибов [21]. Эфирные масла гидролатов розмарина и шалфея содержали оксигенированные монотерпены; 1,8-цинеол (эвкалиптол) являлся наиболее распространенным компонентом и составлял 47,1 % [21] – 56,2 [19] и 42,9 % [21] соответственно, содержание α - и β -туиона в эфирном масле гидролата шалфея – 24,3 и 14,7 % соответственно. В тестах на аллелопатию и летальность ракообразных *Artemia salina* гидролат розмарина оказался более токсичным, чем гидролат шалфея, что, предположительно, связано с присутствием 1,8-цинеола и синергическим действием других компонентов гидролата розмарина [23]. Исследование состава гидролата шалфея лекарственного, собранного в Словацкой Республике, выявило содержание 1,8-цинеола в количестве 19,57 %, линалоола – 4,1 %, α - и β -туиона – 5,57 %, изопулегола – 57,11 %, борнеола – 5,41 %, карвоментенола – 1,12 %. Была выявлена антибактериальная активность гидролата *S. officinalis* в отношении *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter asburiae* и *Bacillus subtilis*. Антиоксидантная активность гидролата шалфея составила (23,25 \pm 0,26) % [24].

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что исследования состава и биологической активности гидролатов проводятся учеными во всем мире и в последние годы приобретают все большую актуальность. Исследования гидролатов лаванды, розмарина, шалфея, иссопа и розы достаточно ограничены и разрозненны. Причиной этому может быть применение разных методов получения гидролатов, использование сырья, выращенного в разных климатогеографических зонах, отличие условий хранения сырья перед проведением испытаний и другие факторы.

Эфиромасличные культуры, а именно: лаванда узколистная, роза эфиромасличная, иссоп лекарственный, шалфей лекарственный, розмарин лекарственный – широко культивируются в Республике Крым, и изучение состава их гидролатов и биологической активности является актуальной задачей фармации.

Цель: изучить химический состав гидролатов *Lavandula angustifolia* Mill., *Hyssopus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Rosa damascena* Mill. \times *Rosa gallica* L. \times *Rosa gallica* L. – *Rosa* spp. и их антибактериальную и антиоксидантную активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были гидролаты лаванды, розмарина, шалфея, иссопа, полученные методом паровой дистилляции в аппарате контейнерного типа; гидролат розы, полученный гидродистилляцией в аппарате периодического действия производства АО «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод». Сырье, из которого получали гидролаты: свежесобранная надземная часть растений в фазу цветения лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill., сорт Рекорд), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis* L.), розы эфиромасличной (сорт Радуга) – гибрида от скрещивания (*Rosa damascena* Mill. × *Rosa gallica* L.) × *Rosa gallica* L. – *Rosa* spp. Заготовка сырья проводилась на плантациях АО «Алуштинский эфиромасличный совхоз-завод» (Россия).

Изучение содержания эфирного масла в гидролатах и его химического состава проводили в отделе переработки и стандартизации эфиромасличного сырья ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в 2018–20 гг. [25]. ГЖХ-анализ образцов гидролатов был проведен на хроматографе «Кристалл 2000М» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия) с пламенно-ионизационным детектором на кварцевой капиллярной колонке длиной 50 м и внутренним диаметром 0,32 мм, неподвижная фаза – ПЭГ-20М (Carbowax 20M). Программирование температуры термостата – от 120 до 180 °С; температура испарителя – 240 °С, температура детектора – 260 °С. Программирование давления на входе в колонку – от 100 кПа до 132,4 кПа с делением потока 1/66, объем пробы – $2 \cdot 10^{-3}$ см³. Газ-носитель – азот. Идентификацию растворенных и частично растворенных компонентов в гидролатах проводили путем сравнения с компонентами соответствующих эфирных масел, определение соотношения компонентов в эфирном масле гидролатов проводили методом внутренней нормализации [25].

Исходя из того, что снижение механической прочности и проницаемости кожи провоцирует ряд метаболических сдвигов как в отдельных клетках, так и в тканях, одну из центральных ролей в генезе многих патологий играет нарушение прооксидантно-антиоксидантного равновесия с последующей активацией свободнорадикальных реакций. Последнее подчеркивает своевременность и актуальность поиска и разработки высокоэффективных средств, способных корректировать окислительно-восстановительный гомеостаз. Поэтому в дальнейшем была изучена антиоксидантная активность ароматных вод. Антиоксидантную активность (АОА) определяли методом неферментативного инициирования перекисного окисления липидов (ПОЛ) в модельной биологической системе желточных липопротеидов (ЖЛП) [26]. В качестве препарата сравнения использовали во-

дорастворимый антиоксидант – раствор кислоты аскорбиновой 50 мг/мл (АОА «Дальхимфарм», Россия).

Спектральные исследования проводили с использованием спектрофотометра СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., США). Рассчитывали среднюю арифметическую (M) и ее среднюю ошибку (m), коэффициент вариации (C) и достоверность разницы (p) по критерию Стьюдента.

Антибактериальную активность гидролатов оценивали с использованием биолюминесцентных тест-бактерий. В работе использовали морские тест-бактерии *Aliivibrio fischeri* F1 из собственной коллекции морских светящихся микроорганизмов, а также рекомбинантные тест-бактерии *E. coli* MG1655 (pXen7) с конститутивным типом люминесценции (любезно предоставленные д. б. н. И. В. Мануховым, заведующим лабораторией молекулярной генетики Московского физико-технического института).

Острую антибактериальную активность гидролатов оценивали по ингибированию интенсивности биолюминесценции бактерий *A. fischeri* F1 и *E. coli* MG1655 (pXen7) в течение 15–60 мин [27, 28]. Измерения биолюминесценции проводили с помощью биолюминометра БЛМ 8801 (СКТБ «Наука», Россия).

Бактерицидное действие гидролатов оценивали визуально по выживаемости биолюминесцентных тест-бактерий [29]. Для этого готовили водные разведения гидролатов 1:10 (0,1), 1:5 (0,2) и 1:2 (0,5), в которые вносили тест-бактерии *A. fischeri* F1 до концентрации $5 \cdot 10^5$ кл/мл. Полученные образцы инкубировали в течение суток при комнатной температуре и затем наносили по 3 мкл на поверхность плотной питательной среды на чашках Петри. Рост и биолюминесценцию бактерий оценивали через 24 ч визуально и фотографически с использованием камеры мобильного телефона. Состав питательных сред и условия культивирования тест-штаммов были описаны ранее [27, 28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В среднем за годы исследований содержание эфирного масла в гидролатах разных растений составило от 0,080 до 0,135 % (таблица 1). Массовая доля эфирного масла в гидролатах колебалась в зависимости от растения, фазы уборки сырья, погодных условий в период его заготовки и соблюдения параметров технологии извлечения эфирного масла по годам. Химический состав гидролатов определялся видом растений и представлен в таблице 1 и на рисунках 1–5. Например, в гидролатах иссопа были определены следующие компоненты: бициклические монотерпеновые кетоны изопинокамфон и пинокамфон; сесквитерпеновый углеводород β-кариофиллен; монотерпеновые углеводороды β-пинен, сабинен и оксид 1,8-цинеол. В разные годы содержание ком-

Таблица 1. Содержание эфирного масла в гидролатах и его компонентный состав

Table 1. The content of essential oils and component composition of hydrolates

Наименование гидролата Name of hydrolates	Содержание эфирного масла в гидролате, % ($M \pm m$) The content of essential oils in hydrolate, % ($M \pm m$)	Химический состав эфирного масла / маркер подлинности Chemical structure / authenticity marker
Гидролат розы эфиромасличной Rose hydrolate	0,100 ± 0,010	линалоол, цитронеллол, нерол, гераниол, β-фенилэтиловый спирт, стеароптены / β-фенилэтиловый спирт linalool, citronellol, nerol, geraniol, β-phenylethyl ethanol, stearoptenes / β-phenylethyl ethanol
Гидролат лаванды узколистной Lavender hydrolate	0,080 ± 0,004	линалоол, терпинен-4-ол, α-терпинеол, лавандуллол/линалоол linalool, terpinene-4-ol, α-terpineol/linalool
Гидролат шалфея лекарственного Salvia hydrolate	0,100 ± 0,010	α-туйон, β-туйон, камфора, лимонен, α-гумулен, β-кариофиллен / α-, β-туйон α-, β-thujone, camphor, limonene, α-humulene; β-caryophyllene / α-, β-thujone
Гидролат иссопа лекарственного Hyssop hydrolate	0,109 ± 0,010	β-пинен, сабинен, 1,8-цинеол, пинокамфон, изопинокамфон, β-кариофиллен/изопинокамфон α-pinene, sabinene, 1,8-cineol, pinocamphone, isopinocampone, β-caryophyllene/isopinocampone
Гидролат розмарина лекарственного Rosemary hydrolate	0,085 ± 0,006	β-пинен, лимонен, 1,8-цинеол, линалоол, α-терпинен/1,8-цинеол β-pinene, limonene, 1,8-cineol, linalool, α-terpinen/1,8-cineol

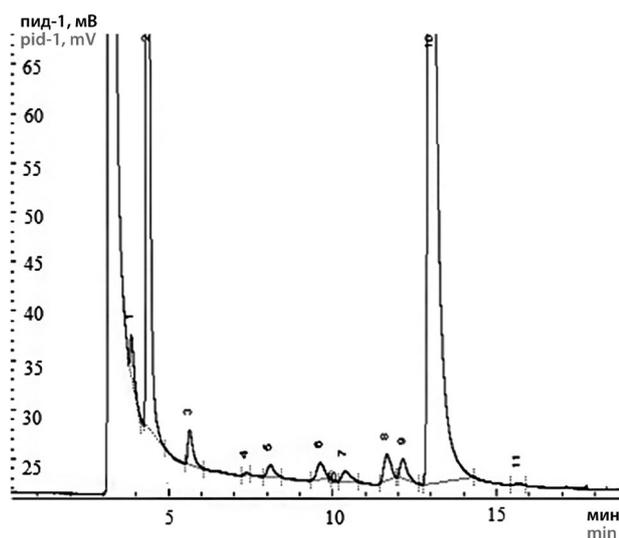


Рисунок 1. Хроматограмма гидролата *Rosa* spp.:

2 – внутренний стандарт; 3 – линалоол; 6 – цитронеллол; 7 – нерол; 8 – гераниол; 9, 11 – стеароптены; 10 – β-ФЭС

Figure 1. Chromatogram of *Rosa* spp. hydrolate:

2 – internal standard; 3 – linalool; 6 – citronellol; 7 – nerol; 8 – geraniol; 9, 11 – stearoptenes; 10 – β-phenylethyl ethanol

пунктов эфирного масла в гидролатах варьировало, но преобладающими были изопинокамфон и пинокамфон. Так, в гидролате, полученном в 2020 г., содержались следующие компоненты: изопинокамфон, пинокамфон; β-кариофиллен; β-пинен; сабинен и 1,8-цинеол (рисунок 4).

Было установлено, что гидролат шалфея лекарственного содержит кетоны: α-туйон и β-туйон, камфору; монотерпеновые углеводороды: лимонен; сескви-

терпеновые углеводороды: α-гумулен, β-кариофиллен; гидролат розы эфиромасличной содержит спирты, а именно: β-фенилэтиловый спирт, гераниол, цитронеллол, нерол, линалоол; в гидролате лаванды узколистной были обнаружены спирты: линалоол, α-терпинеол, терпинен-4-ол; в гидролате розмарина содержатся монотерпеновые углеводороды: β-пинен, лимонен, α-терпинен, оксид 1,8-цинеол – и спирт линалоол.

Сравнительный анализ показал, что гидролаты в основном содержат водорастворимые в разной степени компоненты эфирного масла.

Спектральные исследования образцов в области 200–700 нм выявили полное отсутствие поглощения в видимой области. В УФ-области исследуемые гидролаты обладали различными спектральными характеристиками (рисунок 6, А). Так, гидролаты розмарина и лаванды характеризовались высоким поглощением при 200–300 нм, поэтому для установления спектральных характеристик образцы разбавляли водой в соотношении 1:10. Полученные результаты позволили выявить пик поглощения при 262 нм, характерный только для гидролата розмарина (рисунок 6, Б).

Гидролаты розы, шалфея и иссопа характеризовались более низкой оптической плотностью в УФ-области, а также отсутствием пиков поглощения или наличием незначительных перегибов в спектрах при 260 нм.

При изучении антиоксидантной активности полученные в модельных опытах данные свидетельствуют о том, что уровень ТБК-реактантов в контроле составил 107 нмоль/л через 30 минут с момента внесения ионов Fe²⁺ (таблица 2).

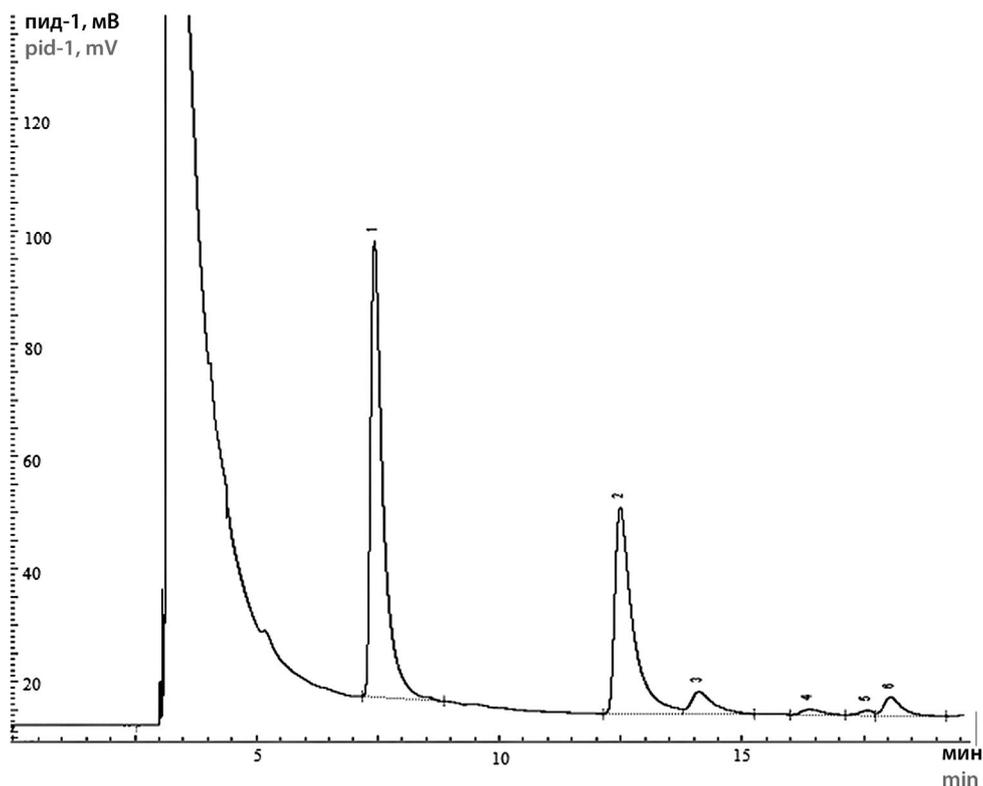


Рисунок 2. Хроматограмма гидролата *L. angustifolia*:

1 – внутренний стандарт; 2 – линалоол; 3 – терпинен-4-ол; 4 – α -терпинеол; 6 – лавандулол

Figure 2. Chromatogram of *L. angustifolia* hydrolate:

1 – internal standard; 2 – linalool; 3 – terpinene-4-ol; 4 – α -terpineol; 6 – lavandulol

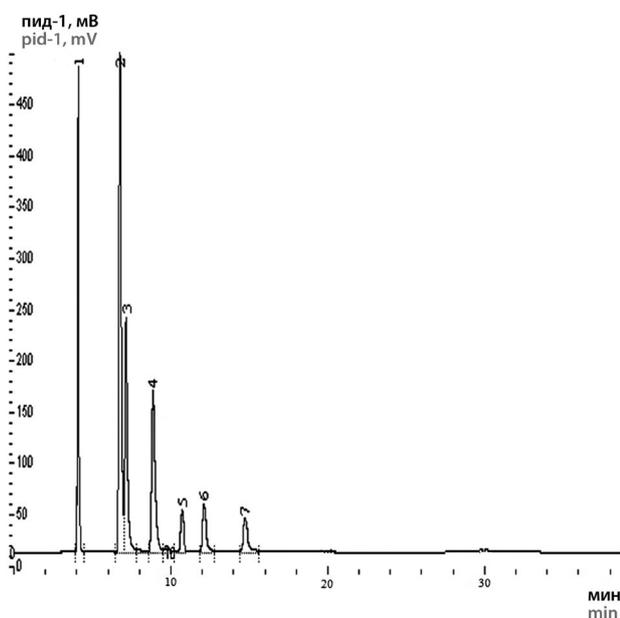


Рисунок 3. Хроматограмма гидролата *S. officinalis*:

1 – внутренний стандарт; 2 – α -туион; 3 – β -туион; 4 – камфора; 5 – лимонен; 6 – α -гумулен; 7 – β -кариофиллен

Figure 3. Chromatogram of *S. officinalis* hydrolate:

1 – internal standard; 2 – α -thujone; 3 – β -thujone; 4 – camphor; 5 – limonene; 6 – α -humulene; 7 – β -caryophyllene

Таблица 2. Антиоксидантная активность гидролата иссопа при Fe^{2+} -инициированном перекисном окислении липидов

Table 2. Antioxidant activity of hyssop hydrolate in Fe^{2+} -initiated lipid peroxidation

Исследуемый образец Test sample	Уровень ТБК*-реактантов, нмоль/л TBA*-reactant levels, nmol/l	АОА, % Antioxidant activity, %
Контроль Control	107,10 \pm 1,40	–
Референтный препарат Reference drug	28,41 \pm 3,55** ($p < 0,001$)	73,47
Гидролат розы Rose hydrolate	106,47 \pm 1,68 ($p > 0,05$)	–
Гидролат лаванды Lavender hydrolate	111,02 \pm 1,11 ($p > 0,05$)	–
Гидролат шалфея Salvia hydrolate	102,87 \pm 2,03 ($p > 0,05$)	–
Гидролат иссопа Hyssop hydrolate	64,82 \pm 3,65* ($p < 0,01$)	39,47
Гидролат розмарина Rosemary hydrolate	68,95 \pm 3,93* ($p < 0,01$)	35,62

Примечание. *ТБК – тиобарбитуровая кислота. Различие с показателями контроля статистически достоверно: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Note. *TBA – thiobarbituric acid. Difference with indicators control statistically significant: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

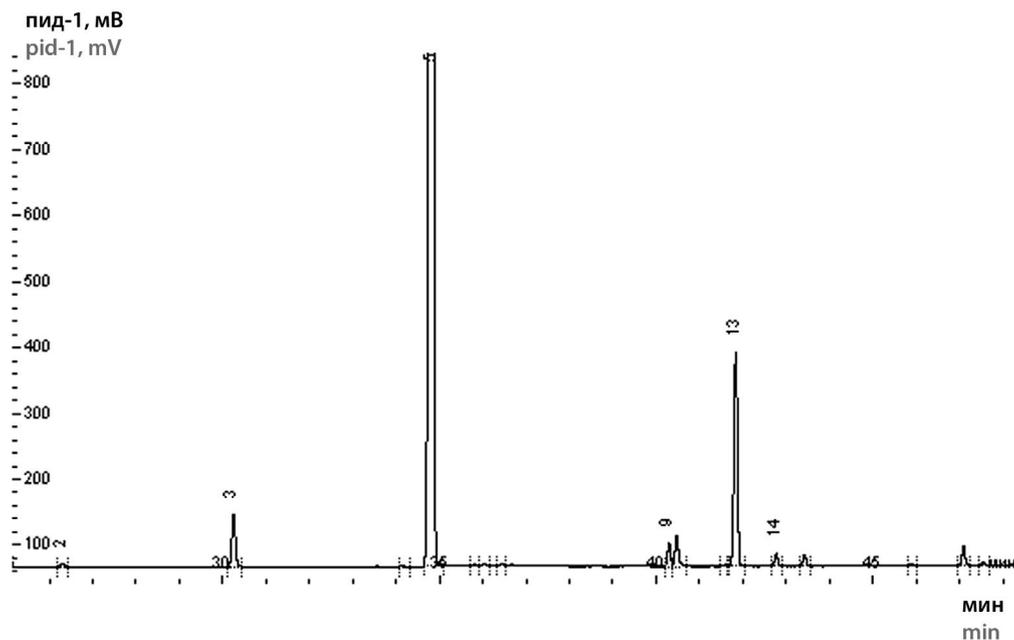


Рисунок 4. Хроматограмма гидролата *H. officinalis*:

2 – β -пинен; 3 – сабинен; 5 – внутренний стандарт; 9 – 1,8-цинеол; 10 – пинокамфон; 13 – изопинокамфон; 14 – β -кариофиллен

Figure 4. Chromatogram of *H. officinalis* hydrolate:

2 – β -pinene; 3 – sabinene; 5 – internal standard; 9 – 1,8-cineole; 10 – pinocamphone; 13 – isopinocampheol; 14 – β -caryophyllene

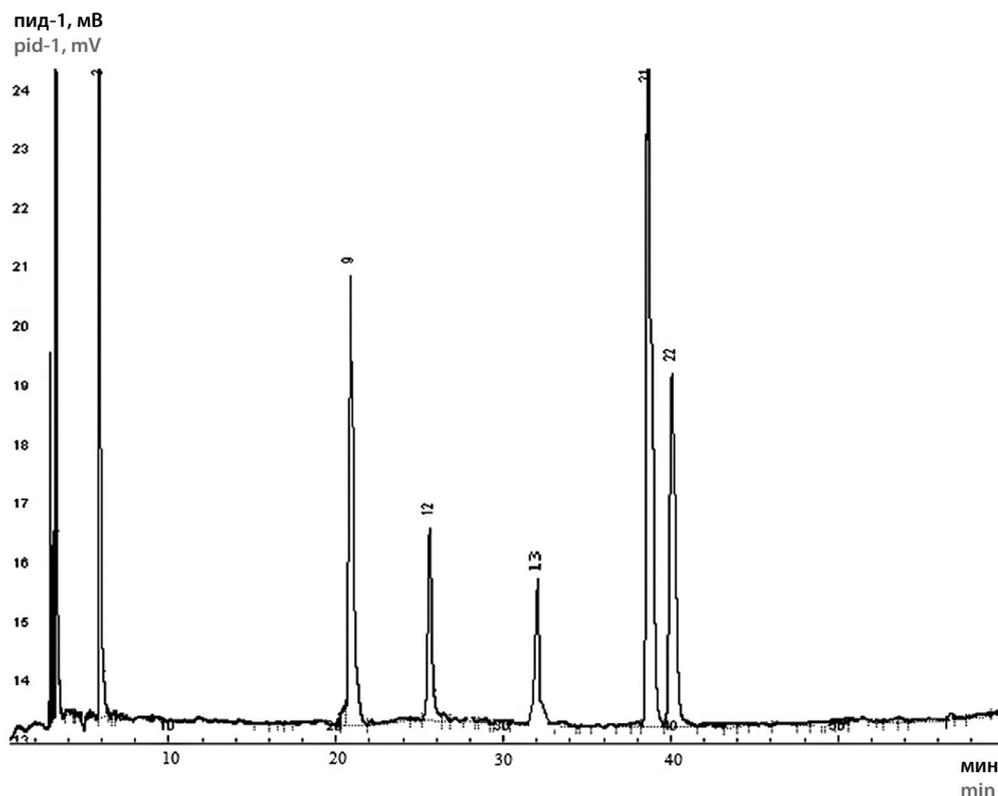


Рисунок 5. Хроматограмма гидролата *R. officinalis*:

3 – β -пинен; 9 – внутренний стандарт; 12 – α -терпинен; 13 – линалоол; 21 – 1,8-цинеол; 22 – лимонен

Figure 5. Chromatogram of *R. officinalis* hydrolate:

3 – β -pinene; 9 – internal standard; 12 – α -terpinene; 13 – linalool; 21 – 1,8-cineol; 22 – limonene

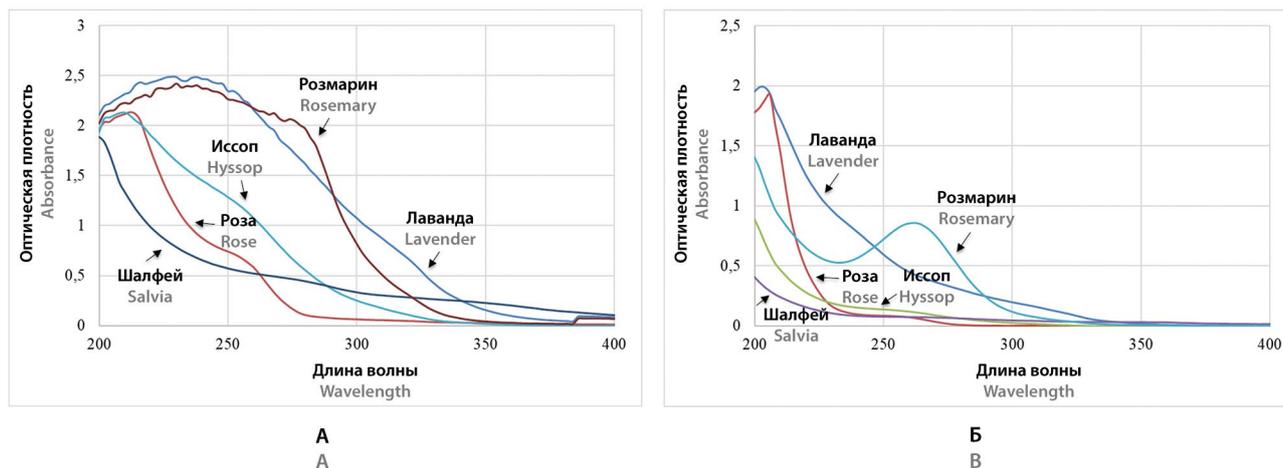


Рисунок 6. Спектры поглощения гидролатов в УФ-области:

А – без разведения; **Б** – при разведении 1 : 10

Figure 6. UV absorbance spectra of the hydrolates:

A – without dilution; **B** – 1 : 10 dilution

Динамика накопления продуктов перекисного окисления липидов в среде инкубации в присутствии аскорбиновой кислоты достоверно ниже контрольной группы (см. таблицу 2), что указывает на выраженную способность препарата подавлять процессы свободнорадикального окисления. Данные относительно влияния гидролатов иссопа и розмарина на интенсивность липопероксидации указывают, что максимальная эффективность проявляется на 30 минуте эксперимента (АОА равна 39, 47 и 35,62% соответственно). Количество ТБК-реактантов в опытных модельных системах составляет 64,82 и 68,95 нмоль/л и уровень статистической значимости различий от показателей в контроле достоверный ($p < 0,01$), что указывает на способность данных гидролатов реализовывать некоторую способность противостоять окислительному стрессу. Накопление продуктов перекисного окисления липидов в присутствии гидролатов шалфея, розы, лаванды не имело достоверных отличий в сравнении с контрольной группой. Следовательно, результаты данного фрагмента исследований позволяют сделать вывод о выраженной способности гидролатов иссопа и розмарина подавлять интенсивность накопления конечных продуктов перекисного окисления липидов в изучаемом биосубстрате при Fe^{2+} -инициации данного процесса, проявляя, таким образом, антиоксидантную активность.

Исследование антибактериальных свойств проводили с использованием морских светящихся тест-бактерий *A. fischeri* F1 и рекомбинантных *E. coli* (pXen7) в качестве тест-объектов. Многочисленные исследования показали, что интенсивность биолюминесценции служит интегральным показателем метаболизма бактериальной клетки и является удобным физико-химическим параметром, который по-

зволяет судить о биологических эффектах различной природы. Таким образом, биолюминесцентные бактерии являются чувствительными биотестами на некоторые виды биологической активности [30].

Изучение действия гидролатов на биолюминесценцию *A. fischeri* F1 показало, что уже через 30 минут все они снижают интенсивность бактериального свечения практически до 0 (острый эффект, рисунок 7). Полученные данные дают возможность предположить наличие антимикробной активности исследуемых гидролатов.

Для установления бактерицидных свойств исследуемых гидролатов их инкубировали с бактериями *A. fischeri* F1 в течение суток, после чего жизнеспособность тест-объектов проверялась высевом на плотную питательную среду [28]. Результаты показали, что все гидролаты, за исключением шалфея, полностью или частично ингибировали бактериальный рост и биолюминесценцию (рисунок 8). Полное подавление роста и свечения *A. fischeri* F1 наблюдалось при разведении гидролатов лаванды и иссопа 0,2 (1:5). Гидролаты розы и розмарина проявляли бактерицидный эффект при разведении 0,5.

Аналогичные эксперименты, проведенные на рекомбинантном тест-штамме *E. coli* (pXen7) с конститутивным типом биолюминесценции, показали сходные результаты. Увеличение концентрации гидролатов приводило к ингибированию свечения тест-бактерий. Наибольшей антибактериальной активностью характеризовались гидролаты иссопа и лаванды, которые полностью подавляли бактериальную люминесценцию. Меньшим действием обладали гидролаты розы, шалфея и розмарина (ингибирование биолюминесценции на 40–80 %, рисунок 9).

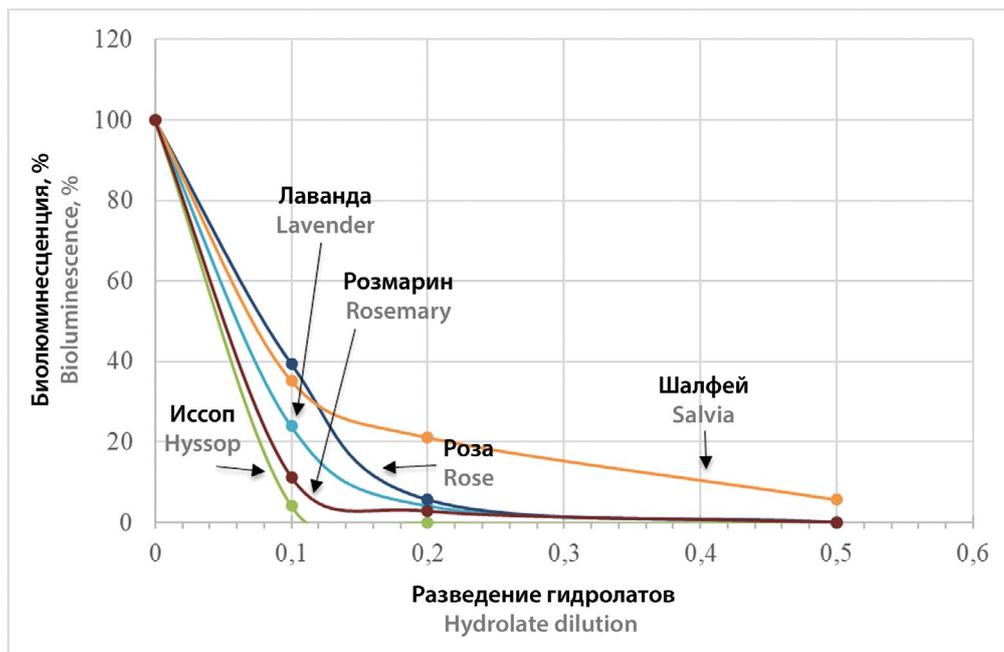


Рисунок 7. Действие гидролатов на биолюминесценцию *A. fischeri* F1

Figure 7. Effect of the hydrolates dilutions on *A. fischeri* F1 bioluminescence

Рост <i>A. fischeri</i> F1 <i>A. fischeri</i> F1 growth				Биолюминесценция <i>A. fischeri</i> F1 Bioluminescence of <i>A. fischeri</i> F1			
Разведения гидролатов Hydrolate dilution							
0	0,1	0,2	0,5	0	0,1	0,2	0,5
Лаванда Lavender							
Роза Rose							
Иссоп Hyssop							
Шалфей Salvia							
Розмарин Rosemary							

Рисунок 8. Действие гидролатов на биолюминесценцию и рост морских бактерий *A. fischeri* F1

Figure 8. Effect of the hydrolates dilutions on growth and bioluminescence of marine test-strain *A. fischeri* F1

Изучение бактерицидного действия гидролатов после суточной инкубации с тест-бактериями и высева на плотную питательную среду выявило только эффекты лаванды и иссопа, которые усиливались с уменьшением разведения (рисунок 10).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучен химический состав гидролатов *Rosa* spp., *Lavandula angustifolia* Mill., *Salvia officinalis* L., *Hyssopus officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., который характерен для конкретного вида растений. Сравнительный анализ химического состава гидролатов показал, что они в основном содержат водорастворимые в разной степени компоненты эфирного масла.
2. Результаты исследований в условиях *in vitro* при Fe^{2+} -инициированном перекисном окислении липидов свидетельствуют о выраженной антиоксидантной активности гидролатов *Hyssopus officinalis* и *Rosmarinus officinalis*. При этом гидролаты *Lavandula angustifolia*, *Salvia officinalis* L., *Rosa damascena* Mill. × *Rosa gallica* L. × *Rosa gallica* L. – *Rosa* spp. не обладали как антиоксидантной, так и прооксидантной активностями.
3. Гидролаты исследуемых эфиромасличных растений обладают антибактериальной активностью как в отношении природных биолюминесцентных тест-бактерий *A. fischeri* F1, так и рекомбинантных бактерий *E. coli* (pXen7).

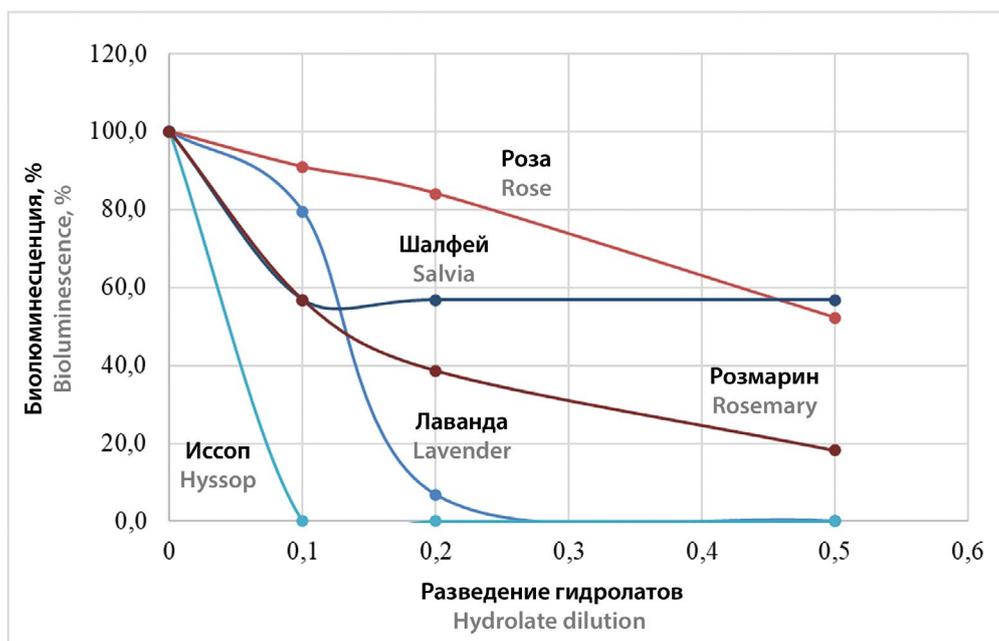


Рисунок 9. Действие гидролатов на билюминесценцию рекомбинантного тест-штамма *E. coli* (pXen7)

Figure 9. Effect of the hydrolates dilutions on bioluminescence of recombinant test-strain *E. coli* (pXen7)



Рисунок 10. Бактерицидное действие гидролатов лаванды и иссопа в отношении *E. coli* (pXen7)

Figure 10. Bactericidal activity of lavender and hyssop hydrolates against *E. coli* (pXen7)

4. Показано бактерицидное действие гидролатов лаванды и иссопа, которые ингибировали рост тест-бактерий *A. fischeri* F1 и *E. coli* (pXen7) при разведениях менее чем 1:5 (0,2). Отсутствие подобного эффекта у гидролатов розмарина, шалфея, розы, в сочетании со способностью ингибировать бактериальную билюминесценцию, может быть результатом их низкой токсичности и быть основанием при выборе компонентов для разработки средств, направленных на сохранения микробиома человека.

В дальнейшем исследования могут быть продолжены и направлены на разработку лекарственных и косметических средств на основе гидролатов исследованных выше эфиромасличных растений.

ЛИТЕРАТУРА

- Nasiri Lari Z., Hajimonfarednejad M., Riasatian M., Abolhassanzadeh Z., Iraj A., Vojoud M., Heydari M., Shams M. Efficacy of inhaled *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil on sleep quality, quality of life and metabolic control in patients with diabetes mellitus type II and insomnia. *Ethnopharmacol.* 2020;251:112560. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112560.
- Bogdan M. A., Bungau S., Tit D. M., Zaha D. C., Nechifor A. C., Behl T., Chambre D., Lupitu A. I., Copolovici L., Copolovici D. M. Chemical profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of essential oils extracted from three different varieties (Moldoveanca 4, Vis Magic 10, and Alba 7) of *Lavandula angustifolia*. *Molecules.* 2021;26(14):4381. DOI: 10.3390/molecules26144381.
- Aboalhaja N. H., Syaj H., Afifi F., Sunoqrot S., Al-Shalabi E., Talib W. Chemical evaluation, in vitro and in vivo anticancer activity of *Lavandula angustifolia* grown in Jordan. *Molecules.* 2022;27(18):5910. DOI: 10.3390/molecules27185910.
- Białoń M., Krzyśko-Łupicka T., Nowakowska-Bogdan E., Wiczorek P. P. Chemical composition of two different lavender essential oils and their effect on facial skin microbiota. *Molecules.* 2019;24(18):3270. DOI: 10.3390/molecules24183270.
- Pandur E., Balatinács A., Micalizzi G., Mondello L., Horváth A., Sipos K., Horváth G. Anti-inflammatory effect of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil prepared during different plant phenophases on THP-1 macrophages. *BMC Complement Med Ther.* 2021;21(1):287. DOI: 10.1186/s12906-021-03461-5.
- Tofighi Z., Molazem M., Doostdar B., Taban P., Shahverdi A. R., Samadi N., Yassa N. Antimicrobial activities of three medicinal plants and investigation of flavonoids of *Tripleurospermum disciforme*. *Iran Pharm Res.* 2015;14(1):225–231.

7. Zu Y., Yu H., Liang L., Fu Y., Efferth T., Liu X., Wu N. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*. 2010;15(5):3200–3210. DOI: 10.3390/molecules15053200.
8. Afsari Sardari, Parmis Badr, Amir Azadi, gh Mosleh. Traditional and recent evidence on five phytopharmaceuticals from *Rosa damascena* Herrm. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2019;6(3):77–84. DOI: 10.22127/rjp.2019.89469.
9. Kumar N., Bhandari P., Singh B., Bari S. S. Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(2):361–367. DOI: 10.1016/j.fct.2008.11.036.
10. Vilhelmova-Ilieva N., Dobрева A., Doynovska R., Krastev D., Mileva M. Antiviral activity of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa alba* L. essential oils against the multiplication of Herpes Simplex Virus type 1 strains sensitive and resistant to acyclovir. *Biology (Basel)*. 2021;10(8):746. DOI: 10.3390/biology10080746.
11. Stefanelli A., Aiello C., Bisio A., Bellese G., Castagnola P. Carnosic acid induces proteasomal degradation of Cyclin B1, RB and SOX2 along with cell growth arrest and apoptosis in GBM cells. *Phyto-medicine*. 2016,23(7):679–685. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.03.007.
12. Choukairi Z., Hazzaz T., José M.F., Fechtali T. The cytotoxic activity of *Salvia officinalis* L. and *Rosmarinus officinalis* L. leaves extracts on human glioblastoma cell line and their antioxidant effect. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2020;17(4). DOI: 10.1515/jcim-2018-0189.
13. Borges R. S., Ortiz B. L. S., Pereira A. C. M., Keita H., Carvalho J. C. T. *Rosmarinus officinalis* essential oil: a review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Ethnopharmacol*. 2019;229:29–45. DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.038.
14. Pieracci Y., Ciccarelli D., Giovanelli S., Pistelli L., Flamini G., Cervelli C., Mancianti F., Nardoni S., Bertelloni F., Ebani V. V. Antimicrobial activity and composition of five *rosmarinus* (Now *Salvia* spp. and Varieties) essential oils. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(9):1090. DOI: 10.3390/antibiotics10091090.
15. Hristova Y., Wanner J., Jirovetz L., Stappen I., Iliev I., Gochev V. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2015;29(3):592–601. DOI: 10.1080/13102818.2015.1020341.
16. Cvijovic V., Djukic D., Mandis L. Composition and antimicrobial activity of essential oils of some medicinal and spice plants. *Chemistry of Natural Compounds*. 2010;46(3):481–482. DOI: 10.1007/s10600-010-9652-z.
17. Svydenko L., Vergun O., Ivanišová E., Brindza J. Antioxidant activity of ethanol extracts of *Hyssopus officinalis* L. Conference: 5th International Scientific Conference Agrobiodiversity for Improving the Nutrition, Health, Quality of Life and Spiritual Human Development. 2021;3:121. DOI: 10.15414/2021.9788055224015.
18. Богданова С. А. Копанева М. С. Коллоидно-химические свойства косметических средств с гидролатами. *Вестник Технологического университета*. 2017;20(10):14–16.
19. Garzoli S., Laghezza Masci V., Franceschi S., Tiezzi A., Giacomello P., Ovidi E. Headspace/GC-MS analysis and investigation of antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of essential oils and hydrolates from *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Miller. *Foods*. 2021;10(8):1768. DOI: 10.3390/foods10081768.
20. Šilha D., Švarcová K., Bajger T., Královce K., Tesařová E., Moučková K., Pejchalová M., Bajgerová P. Chemical composition of natural hydrolates and their antimicrobial activity on Arcobacter-Like cells in comparison with other microorganisms. *Molecules*. 2020;25(23):5654. DOI: 10.3390/molecules25235654.
21. Постникова О. Н., Шевкопляс Л. А., Сатаева Т. П., Куевда Т. А. Действие гидролатов эфирных масел на рост грибов рода *Candida*. *Проблемы медицинской микологии*. 2022;24(2):121.
22. Hay Y. O., Abril-Sierra M. A., Sequeda-Castañeda L. G., Bonnafous C., Raynaud C. Evaluation of combinations of essential oils and essential oils with hydrosols on antimicrobial and antioxidant activities. *Pharm. Pharmacogn. Res*. 2018;6:216–230.
23. Politi M., Ferrante C., Menghini L., Angelini P., Flores G. A., Muscatello B., Braca A., De Leo M. Hydrosols from *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, and *Cupressus sempervirens*: phytochemical analysis and bioactivity evaluation. *Plants (Basel)*. 2022;11(3):349. DOI: 10.3390/plants11030349.
24. Ůrgeová E., Uváčková Ľ., Vaneková M., Maliar T. Antibacterial potential of microwave-assisted extraction prepared hydrolates from different *salvia* species. *Plants (Basel)*. 2023,12(6):1325. DOI: 10.3390/plants12061325.
25. Timasheva L. A., Pekhova O. A., Danilova I. L. On the methodology of quantitative determination of essential oil in herbal distillates. *Taurida herald of the agrarian sciences*. 2019;3(19):122–132. DOI: 10.33952/2542-0720-2019-3-19-122-132.
26. Немятих О. Д. Комплексне дослідження антиоксидантних властивостей дитячого желе з ехінацеєю. *Вісник фармації*. 2010;4:78–82.
27. Carniato F., Gatti G., Vittoni C., Katsev A. M., Guidotti M., Evangelisti C., Bisio Ch. More efficient prussian blue nanoparticles for an improved caesium decontamination from aqueous solutions and biological fluids. *Molecules*. 2020;25(15):3447. DOI: 10.3390/molecules25153447.
28. Каримова Д. Н., Манухов И. В., Гнучих Е. Ю., Каримов И. Ф., Дерябин Д. Г. Действие свободных радикалов кислорода и азота на lux-биосенсоры на основе *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2016;52(3):287–295. DOI 10.7868/S0555109916030077.
29. Suppi S., Kasemets K., Ivask A., Künnis-Beres K., Sihtmäe M., Kurvet I., Aruoja V., Kahru A. A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Hazard Mater*. 2015;286:75–84. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.027.
30. Abbas M., Adil M., Ehtisham-Ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A., Shar G. A., Asif Tahir M., Iqbal M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci Total Environ*. 2018;626:1295–1309. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.066.

REFERENCES

1. Nasiri Lari Z., Hajimonfarednejad M., Riasatian M., Abolhassanzadeh Z., Iraj A., Vojoud M., Heydari M., Shams M. Efficacy of inhaled *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil on sleep quality, quality of life and metabolic control in patients with diabetes mellitus type II and insomnia. *Ethnopharmacol*. 2020;251:112560. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112560.
2. Bogdan M. A., Bungau S., Tit D. M., Zaha D. C., Nechifor A. C., Behl T., Chambre D., Lupitu A. I., Copolovici L., Copolovici D. M. Chemical profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of essential oils extracted from three different varieties (Moldoveanca 4, Vis Magic 10, and Alba 7) of *Lavandula angustifolia*. *Molecules*. 2021;26(14):4381. DOI: 10.3390/molecules26144381.
3. Aboalhaja N. H., Syaj H., Afifi F., Sunoqrot S., Al-Shalabi E., Talib W. Chemical evaluation, in vitro and in vivo anticancer activity of *Lavandula angustifolia* grown in Jordan. *Molecules*. 2022;27(18):5910. DOI: 10.3390/molecules27185910.
4. Białoń M., Krzyśko-Łupicka T., Nowakowska-Bogdan E., Wiczorek P. P. Chemical composition of two different lavender essential oils and their effect on facial skin microbiota. *Molecules*. 2019;24(18):3270. DOI: 10.3390/molecules24183270.
5. Pandur E., Balatináč A., Micalizzi G., Mondello L., Horváth A., Sipos K., Horváth G. Anti-inflammatory effect of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil prepared during different plant phenophases on THP-1 macrophages. *BMC Complement Med Ther*. 2021;21(1):287. DOI: 10.1186/s12906-021-03461-5.
6. Tofighi Z., Molazem M., Doostdar B., Taban P., Shahverdi A. R., Samadi N., Yassa N. Antimicrobial activities of three medicinal plants and investigation of flavonoids of *Tripleurospermum disciforme*. *Iran Pharm Res*. 2015;14(1):225–231.

7. Zu Y., Yu H., Liang L., Fu Y., Efferth T., Liu X., Wu N. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*. 2010;15(5):3200–3210. DOI: 10.3390/molecules15053200.
8. Afsari Sardari, Parmis Badr, Amir Azadi, gh Mosleh. Traditional and recent evidence on five phytopharmaceuticals from *Rosa damascena* Herrm. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2019;6(3):77–84. DOI: 10.22127/rjp.2019.89469.
9. Kumar N., Bhandari P., Singh B., Bari S. S. Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(2):361–367. DOI: 10.1016/j.fct.2008.11.036.
10. Vilhelmova-Ilieva N., Dobрева A., Doynovska R., Krastev D., Mileva M. Antiviral activity of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa alba* L. essential oils against the multiplication of Herpes Simplex Virus type 1 strains sensitive and resistant to acyclovir. *Biology (Basel)*. 2021;10(8):746. DOI: 10.3390/biology10080746.
11. Stefanelli A., Aiello C., Bisio A., Bellese G., Castagnola P. Carnosic acid induces proteasomal degradation of Cyclin B1, RB and SOX2 along with cell growth arrest and apoptosis in GBM cells. *Phyto-medicine*. 2016,23(7):679–685. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.03.007.
12. Choukairi Z., Hazzaz T., José M.F., Fechtali T. The cytotoxic activity of *Salvia officinalis* L. and *Rosmarinus officinalis* L. leaves extracts on human glioblastoma cell line and their antioxidant effect. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2020;17(4). DOI: 10.1515/jcim-2018-0189.
13. Borges R. S., Ortiz B. L. S., Pereira A. C. M., Keita H., Carvalho J. C. T. *Rosmarinus officinalis* essential oil: a review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Ethnopharmacol*. 2019;229:29–45. DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.038.
14. Pieracci Y., Ciccarella D., Giovanelli S., Pistelli L., Flamini G., Cervelli C., Mancianti F., Nardoni S., Bertelloni F., Ebani V. V. Antimicrobial activity and composition of five *rosmarinus* (Now *Salvia* spp. and Varieties) essential oils. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(9):1090. DOI: 10.3390/antibiotics10091090.
15. Hristova Y., Wanner J., Jirovetz L., Stappen I., Iliev I., Gochev V. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2015;29(3):592–601. DOI: 10.1080/13102818.2015.1020341.
16. Cvijovic V., Djukic D., Mandis L. Composition and antimicrobial activity of essential oils of some medicinal and spice plants. *Chemistry of Natural Compounds*. 2010;46(3):481–482. DOI: 10.1007/s10600-010-9652-z.
17. Svydenko L., Vergun O., Ivanišová E., Brindza J. Antioxidant activity of ethanol extracts of *Hyssopus officinalis* L. Conference: 5th International Scientific Conference Agrobiodiversity for Improving the Nutrition, Health, Quality of Life and Spiritual Human Development. 2021;3:121. DOI: 10.15414/2021.9788055224015.
18. Bogdanova S. A. Kopaneva M. S. Colloidal-chemical properties of cosmetics with hydrolates. *Vestnik Tehnologicheskogo universiteta*. 2017;20(10):14–16. (In Russ.)
19. Garzoli S., Laghezza Masci V., Franceschi S., Tiezzi A., Giacomello P., Ovidi E. Headspace/GC-MS analysis and investigation of antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of essential oils and hydrolates from *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Miller. *Foods*. 2021;10(8):1768. DOI: 10.3390/foods10081768.
20. Šilha D., Švarcová K., Bajer T., Královec K., Tesařová E., Moučková K., Pejchalová M., Bajerová P. Chemical composition of natural hydrolates and their antimicrobial activity on *Arcobacter*-Like cells in comparison with other microorganisms. *Molecules*. 2020;25(23):5654. DOI: 10.3390/molecules25235654.
21. Postnikova O. N., ShevkoPljas L. A., Sataeva T. P., Kuevda T. A. The effect of essential oil hydrolates on the growth of *Candida* fungi. *Problemy medicinskoj mikologii*. 2022;24(2):121. (In Russ.)
22. Hay Y. O., Abril-Sierra M. A., Sequeda-Castañeda L. G., Bonnafous C., Raynaud C. Evaluation of combinations of essential oils and essential oils with hydrosols on antimicrobial and antioxidant activities. *Pharm. Pharmacogn. Res*. 2018;6:216–230.
23. Politi M., Ferrante C., Menghini L., Angelini P., Flores G. A., Muscatello B., Braca A., De Leo M. Hydrosols from *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, and *Cupressus sempervirens*: phytochemical analysis and bioactivity evaluation. *Plants (Basel)*. 2022;11(3):349. DOI: 10.3390/plants11030349.
24. Úrgeová E., Uváčková L., Vaneková M., Maliar T. Antibacterial potential of microwave-assisted extraction prepared hydrolates from different *salvia* species. *Plants (Basel)*. 2023,12(6):1325. DOI: 10.3390/plants12061325.
25. Timasheva L. A., Pekhova O. A., Danilova I. L. On the methodology of quantitative determination of essential oil in herbal distillates. *Taurida herald of the agrarian sciences*. 2019;3(19):122–132. DOI: 10.33952/2542-0720-2019-3-19-122-132.
26. Nemyatih O. D. Complex research of antioxidant properties jelly with *Echinacea* for children. *Visnyk farmatsiyi*. 2010;4:78–82. (In Ukr.)
27. Carniato F., Gatti G., Vittoni C., Katsev A. M., Guidotti M., Evangelisti C., Bisio Ch. More efficient prussian blue nanoparticles for an improved caesium decontamination from aqueous solutions and biological fluids. *Molecules*. 2020;25(15):3447. DOI: 10.3390/molecules25153447.
28. Karimova D. N., Manukhov I. V., Gnuchikh E. Y., Karimov I. F., Deryabin D. G. The effect of oxygen and nitrogen free radicals on lux-biosensors based on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016;52(3):287–295. (In Russ.) DOI 10.7868/S0555109916030077.
29. Suppi S., Kasemets K., Ivask A., Künnis-Beres K., Sihtmäe M., Kurvet I., Aruoja V., Kahru A. A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Hazard Mater*. 2015;286:75–84. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.027.
30. Abbas M., Adil M., Ehtisham-Ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A., Shar G. A., Asif Tahir M., Iqbal M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci Total Environ*. 2018;626:1295–1309. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.066.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573>
УДК 615.074



Оригинальная статья / Research article

Сквозная стандартизация оригинальных лекарственных средств при определении родственных примесей

Ю. Э. Генералова✉, И. И. Тернинко, А. Б. Зеленцова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Генералова Юлия Эдуардовна. E-mail: generalova.yuliya@pharminnotech.com

ORCID: Ю. Э. Генералова – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
А. Б. Зеленцова – <https://orcid.org/0009-0006-2750-098X>.

Статья поступила: 20.09.2023

Статья принята в печать: 09.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Для таблеток «Малобен, 60 мг» и «Этмабен, 300 мг» получены разрешения на проведение I фазы клинических испытаний, поэтому для них требовался полный цикл фармацевтической разработки, который включал аналитические исследования и стандартизацию.

Цель. Разработка единой аналитической методики для определения родственных примесей в образцах (СО, АФС, ГЛС) малобена и этмабена.

Материалы и методы. СО получены на кафедре органической химии СПбХФУ, синтез АФС и производство ГЛС проводили в промышленных масштабах на фармацевтических производствах. Исследования были проведены на жидкостном хроматографе Flexar (PerkinElmer, США), снабженном насосом (формирование градиента на стороне низкого давления), автосемплером, термостатом колонок, УФ-детектором и хроматографической колонкой Intersil® ODS-3V, 5 мкм, 100 Å, 250 × 4,6 (Phenomenex, Япония).

Результаты и обсуждение. В ходе работы выбраны единые оптимальные хроматографические условия методом ВЭЖХ для определения РП в СО, АФС и ГЛС малобена и этмабена. Колонка C18, 250 × 4,6 мм, подвижная фаза 0,1%-я фосфорная кислота и ацетонитрил (градиентное элюирование), скорость потока 1 мл/мин, объем пробы 10 мкл, детектор УФ (270 нм). Проведена их валидация по показателям «специфичность», «линейность», «предел обнаружения», «прецизионность», «робастность», «стабильность растворов». Выбраны аналитические уровни концентраций для формирования проектов нормативных документов. С использованием разработанной аналитической методики проведен анализ образцов СО, АФС и таблеток малобена и этмабена, на основании чего установлены нормы содержания РП в них.

Заключение. Проведен полный цикл исследований, разработана аналитическая методика и определены РП в СО, АФС и ГЛС малобена и этмабена.

Ключевые слова: сквозная стандартизация, оригинальные ЛС, родственные примеси, ВЭЖХ, валидация

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

Вклад авторов. Ю. Э. Генералова – планирование эксперимента, постановка задачи, осуществление эксперимента, анализ полученных данных, написание текста статьи. И. И. Тернинко – обсуждение результатов, общее руководство проектом. А. Б. Зеленцовой – анализ полученных данных, обсуждение результатов.

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

Для цитирования: Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Зеленцова А. Б. Сквозная стандартизация оригинальных лекарственных средств при определении родственных примесей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):209–216. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573>

End-to-end Standardization of Original Medicines when Determining Related Impurities

Yulia E. Generalova✉, Inna I. Terninko, Anna B. Zelentsova

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

✉ Corresponding author: Yulia E. Generalova. E-mail: generalova.yuliya@pharminnotech.com

ORCID: Yulia E. Generalova – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
Anna B. Zelentsova – <https://orcid.org/0009-0006-2750-098X>.

Received: 20.09.2023

Revised: 09.11.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. For tablets “Maloben, 60 mg” and “Etmaben, 300 mg”, permission was received to conduct phase I clinical trials, so they required a full cycle of research and standardization.

Aim. Development of a unified analytical procedure for the determination of related impurities in samples (RS, API, FPP) of Maloben and Ethmaben.

Materials and methods. RSs were obtained at the Department of Organic Chemistry of the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University; the synthesis of APIs and the production of FPP were carried out on an industrial scale in pharmaceutical production. The studies were

© Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Зеленцова А. Б., 2023

© Generalova Yu. E., Terninko I. I., Zelentsova A. B., 2023

carried out on a Flexar liquid chromatograph (PerkinElmer, USA), equipped with a pump (formation of a gradient on the low-pressure side), an autosampler, a column thermostat, a UV detector and a chromatographic column Intersil® ODS-3V, 5 µm, 100 Å, 250 × 4, 6 (Phenomenex, Japan).

Results and discussion. In the research, uniform optimal chromatographic conditions were selected using the HPLC method to determine the RP in RS, API and FPP of Maloben and Ethmaben. Column C18 250×4.6 mm, mobile phase 0.1% phosphoric acid and acetonitrile (gradient elution), flow rate 1 ml/min, sample volume 10 µl, UV detector (270 nm). They were validated in terms of specificity, linearity, detection limit, precision, robustness, and solution stability. Analytical concentration levels were selected for the formation of draft regulatory documents. Using the developed analytical technique, samples of RS, API and tablets of maloben and ethmaben were analyzed.

Conclusion. A full cycle of research was carried out, an analytical methodology was developed and related impurities were identified in RS, API and FPP of Maloben and Ethmaben.

Keywords: end-to-end standardization, original drugs, related impurities, HPLC, validation

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

Contribution of the authors. Yulia E. Generalova – planning the experiment, setting the problem, carrying out the experiment, analyzing the data obtained, writing the text of the article. Inna I. Terninko – discussion of results, general project management. Anna B. Zelentsova – analysis of the data obtained, discussion of the results.

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: Generalova Yu. E., Terninko I. I., Zelentsova A. B. End-to-end standardization of original medicines when determining related impurities. *Drug development & registration*. 2023;12(4):209–216. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573>

ВВЕДЕНИЕ

Ключевым моментом при стандартизации лекарственных средств является определение родственных примесей (РП) и установление норм их содержания [1]. Данный показатель имеет важное значение для характеристики безопасности лекарственных средств, поэтому подходы к его определению остаются в фокусе фармацевтической разработки. Новое регуляторное требование, которое нашло отражение в Решении Коллегии ЕЭК от 4.10.2022 № 138 «Об утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей»¹, реализует алгоритм действий (в том числе путем процессного подхода «дерева решений») при составлении нормативных документов на новые и воспроизведенные лекарственные средства при определении примесей.

Особую сложность представляют оригинальные молекулы – потенциальные лекарственные кандидаты – ввиду отсутствия подходов к их анализу в научной литературе: профиль примесей неизвестен, пути деградации не установлены, стабильность (в том числе и фото-) молекулы неизвестна. Все это создает предпосылки для комплексных аналитических исследований.

Первым этапом работ при стандартизации новых ЛС является выбор хроматографических условий, позволяющих разделять родственные примеси и основной компонент, проводят профилирование при-

месей при воздействии на АФС стресс-условий [2]. При этом важно понимать, образование каких продуктов деградации молекулы является вероятным, и минимизировать возможность «потери» примесей на хроматограмме (созлоирование пиков, элюирование пика с «мертвым» временем или длительное удержание вещества на колонке и выход ее после окончания записи хроматограммы). Затем проводят установление структур образовавшихся примесей либо с использованием ВЭЖХ-систем с масс-спектрометрами высокого разрешения [3–6], либо выделением примесей и характеристикой их спектральными методами [7]. Второй подход более предпочтителен, так как, помимо установления структуры, важно доказать безопасность примесей, для чего проводят исследования токсичности.

Ранее в СПХФУ были разработаны оригинальные активные фармацевтические субстанции 4,4'-(пропандиамидо)добензоат натрия (малобен) и 4-(3-оксо-3-этоксипропаноил)аминобензойная кислота (этмабен) для производства на их основе таблеток «Малобен, 60 мг» и «Этмабен, 300 мг», для которых получены разрешения на проведение I фазы клинических испытаний № 717 от 23.12.2022 и № 733 от 28.12.2022 соответственно. Поэтому для новых ЛП требовался полный цикл фармацевтической разработки, включающий разработку аналитических методик, их валидацию, а также установление профиля примесей и их характеристику. Оба препарата являются потенциальными оригинальными лекарственными средствами, имеют запатентованные схемы синтеза [8, 9], отработанные технологии получения ГЛС и положительные результаты доклинических исследований. Для проведения клинических исследований необходимо стандартизовать полученные продукты.

¹ Решение Коллегии ЕЭК от 04.10.2022 № 138 «Об утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей». Доступно по: <https://www.alta.ru/tamdoc/22kr0138/>. Ссылка активна на 26.09.2023.

Современный аналитический подход направлен на оптимизацию стандартизации, в том числе за счет применения принципа сквозной стандартизации, который подразумевает применение единых методов и условий (аналитических процедур) для контроля ряда ключевых параметров (подлинность, родственные примеси, количественное определение и др.)¹. Такое решение направлено на существенную экономию ресурсов – временных, материальных – и способствует унификации стандартизации в рамках одной молекулы. Учитывая, что оригинальные ЛС этмабен и малобен имеют схожую структуру, правильным аналитическим решением является разработка единых условий для определения родственных примесей.

Таким образом, **целью данного исследования** является разработка единой аналитической методики для определения родственных примесей в активных фармацевтических субстанциях (АФС), стандартных образцах (СО) и готовых лекарственных средствах (ГЛС) – таблетках малобена и этмабена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами анализа являются малобен и этмабен – производные *p*-аминобензойной кислоты (ПАБК) и малонового эфира (рисунок 1) в виде АФС, СО и ГЛС (таблеток).

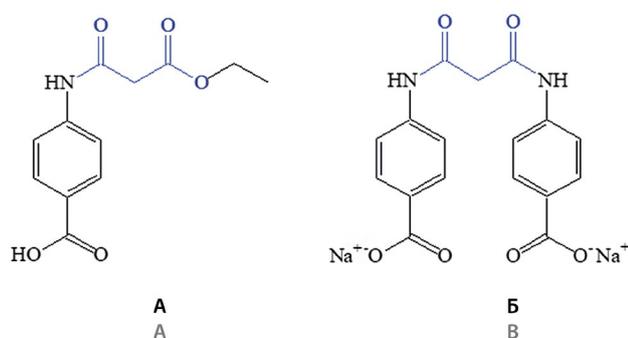


Рисунок 1. Структурные формулы этмабена (а) и малобена (б)

Figure 1. Structural formulas of ethmaben (a) and maloben (b)

СО малобена и этмабена получены на кафедре органической химии СПХФУ, синтез АФС и производство ГЛС (таблетки «Малобен, 60 мг» и таблетки «Этмабен, 300 мг») проводили в промышленных масштабах на фармацевтических производствах.

¹ ICH Topic Q 6 A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf. Accessed: 26.09.2023.

Используемое оборудование и расходные материалы:

- хроматограф жидкостной Flexar (PerkinElmer, США), снабженный насосом (формирование градиента на стороне низкого давления), автосемплером, термостатом колонок, УФ-детектором и хроматографической колонкой Intersil® ODS-3V, 5 мкм, 100 Å, 250 × 4,6 (Phenomenex, Япония);
- хроматограф жидкостной Prominence LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония), снабженный четырьмя насосами (формирование градиента на стороне высокого давления), термостатом колонок, ДМ-детектором и хроматографической колонкой Luna C18, 5 мкм, 100 Å, 250 × 4,6 (Phenomenex, Япония);
- аналитические весы «Сартогосм» CE224-C (ООО «Сартогосм», Россия);
- мембранный нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (PerkinElmer, США).

Стандартные образцы и реактивы:

- 4-аминобензойная кислота, реактив чистотой более 99 %;
- примеси В и С, образцы чистотой более 99 %, получены ФГБОУ ВО СПХФУ;
- ацетонитрил для хроматографии или аналогичного качества;
- вода деионизованная свежеполученная;
- кислота орто-фосфорная, х. ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Малобен и этмабен – близкородственные структуры и имеют одинаковые исходные вещества, в связи с чем можно предположить схожие родственные примеси, содержащиеся в их образцах. ПАБК – исходное вещество в синтезе, и контроль ее содержания обязателен в обоих объектах анализа. Ранее были установлены другие структуры РП малобена [10], одна из которых (4-(3-карбоксо-3-оксипропионамидо)бензойная кислота) позднее синтезирована. Кроме того, предположили возможность образования еще двух побочных продуктов реакции – N-ацетил-4-аминобензойной кислоты (N-ацетил-ПАБК) и этилового эфира 4-аминобензойной кислоты (бензокаин), но последний не был обнаружен в образцах. Характеристики использованных РП приведены в таблице 1.

Используя все доступные образцы РП, выбрали оптимальные хроматографические условия (таблица 2), позволяющие их эффективно разделить.

Наложение хроматограмм растворов индивидуальных образцов примесей (концентрация каждой из них 10 мкг/мл), полученных в выбранных условиях, представлено на рисунке 2.

Выбранные хроматографические условия позволяют эффективно разделять аналиты, что подтверждают хроматографические параметры пиков: асимметрия всех пиков составляет 1,1–1,2; эффективность – более 2×10^4 теоретических тарелок; разрешение – более 5,0.

Таблица 1. Характеристики родственных примесей

Table 1. Characteristics of related impurities

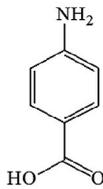
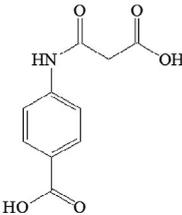
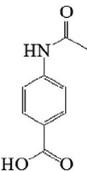
Название Name	Структурная формула Structural formula	Условное название Code name	λ_{\max} , нм λ_{\max} , nm
4-аминобензойная кислота (ПАБК) 4-aminobenzoic acid		Примесь А Impurity A	268
4-[[карбоксиацетил]-амино]бензойная кислота 4-[[carboxyacetyl]-amino]benzoic acid		Примесь В Impurity B	266
N-ацетил-4-аминобензойная кислота N-acetyl-4-aminobenzoic acid		Примесь С Impurity C	268
Этмабен Ethmaben	Рисунок 1, А Figure 1, A	Примесь D в малобене Impurity D in malobene	262
Малобен Maloben	Рисунок 1, Б Figure 1, B	Примесь D в этмабене Impurity D in ethmaben	268

Таблица 2. Оптимальные хроматографические условия для определения родственных примесей в образцах малобена и этмабена

Table 2. Optimal chromatographic conditions for the determination of related impurities in Maloben and Ethmaben samples

Колонка Column	250 × 4,6 мм, 5 мкм; сорбент – силикагель с привитым C ₁₈ -группами 250 × 4.6 mm, 5 μm; sorbent – silica gel grafted with C18 groups		
Подвижная фаза Eluent	0,1%-й раствор H ₃ PO ₄ :ацетонитрил, градиентное элюирование, уравнивание колонки 10 мин 0.1% H ₃ PO ₄ solution: acetonitrile, gradient elution, column equilibration 10 min		
	Время Time	0,1 % р-р H ₃ PO ₄ 0.1 % H ₃ PO ₄ solution	CH ₃ CN
	0 мин 0 min	85 %	15 %
	20 мин 20 min	40 %	60 %
Скорость потока Flow rate	1 мл/мин 1 ml/min		
Температура колонки Temperature of column	40 °С		
Детектор Detector	УФ, 270 нм UV, 270 nm		
Объем пробы Volume injection	10 мкл 10 μl		

Для проведения испытаний по показателю «родственные примеси» рекомендации [11] допускают применение метода сравнения площадей пиков РП с разбавленным раствором испытуемого образца в предельно допустимой концентрации с учетом коэффициентов чувствительности (*k*) примесей по отношению к основному действующему веществу, чтобы избежать использования дорогостоящих и труднодоступных стандартных образцов примесей. Именно такой подход (предел содержания) был выбран для включения в проект нормативного документа, для которого в качестве валидационных критериев достаточно доказать специфичность и установить предел обнаружения. Нами был проведен цикл более показательных валидационных исследований, и процедура валидации выбранных хроматографических условий была проведена по показателям «специфичность», «предел обнаружения» и «предел количественного определения» (для выбора уровня аналитических концентраций), «линейность» (для расчета коэффициентов чувствительности), «прецизионность» (по показателю «сходимость» для установления критериев проверки пригодности хроматографической системы), «робастность» (для проверки воспроизводимости хроматографических условий на аналогичном оборудовании), а также была определена стабильность

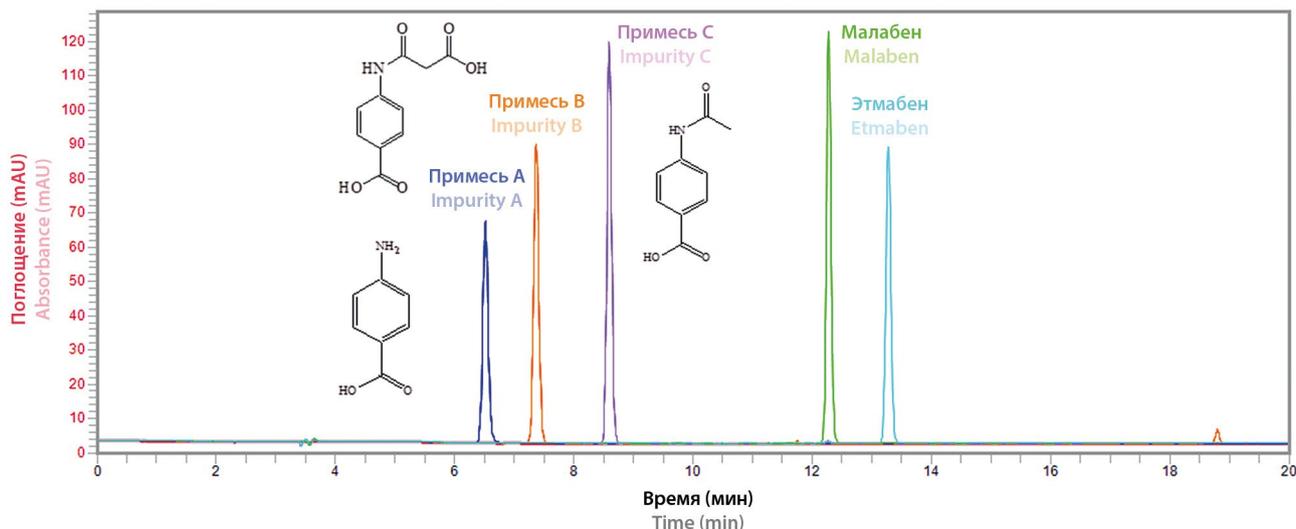


Рисунок 2. Наложение хроматограмм растворов индивидуальных образцов примесей (растворитель – красная; примесь А – синяя; В – оранжевая; С – фиолетовая; малабен – зеленая; этмабен – голубая)

Figure 2. Overlay of chromatograms of solutions of individual impurity samples (solvent – red; impurity A – blue; B – orange; C – violet; Maloben – green; Etmaben – light blue)

анализируемых растворов и установлены их сроки годности.

Специфичность условий анализа продемонстрирована на рисунке 2, где показана возможность селективного и эффективного определения каждого компонента пробы. Для ГЛС проанализированы растворы плацебо, на хроматограммах которых отсутствовали пики. Также приготовлены и проанализированы модельные растворы (раствор плацебо с добавлением АФС), где наблюдали полное совпадение времен удерживания аналитов, что свидетельствует об отсутствии влияния вспомогательных веществ

в таблетках на хроматографический процесс и показывает специфичность валидируемых условий анализа. Хроматограмма испытуемого раствора образца малобена ($C = 0,2$ мг/мл), содержащего все известные примеси, приведена на рисунке 3.

Анализ испытуемого раствора показывает, что увеличение концентрации одного из компонентов пробы не мешает определению других компонентов. В данном случае пики малобена и примеси D (этмабен) являются критической парой и увеличение концентрации малобена в 20 раз по-прежнему позволяет селективно определить пик примеси D.

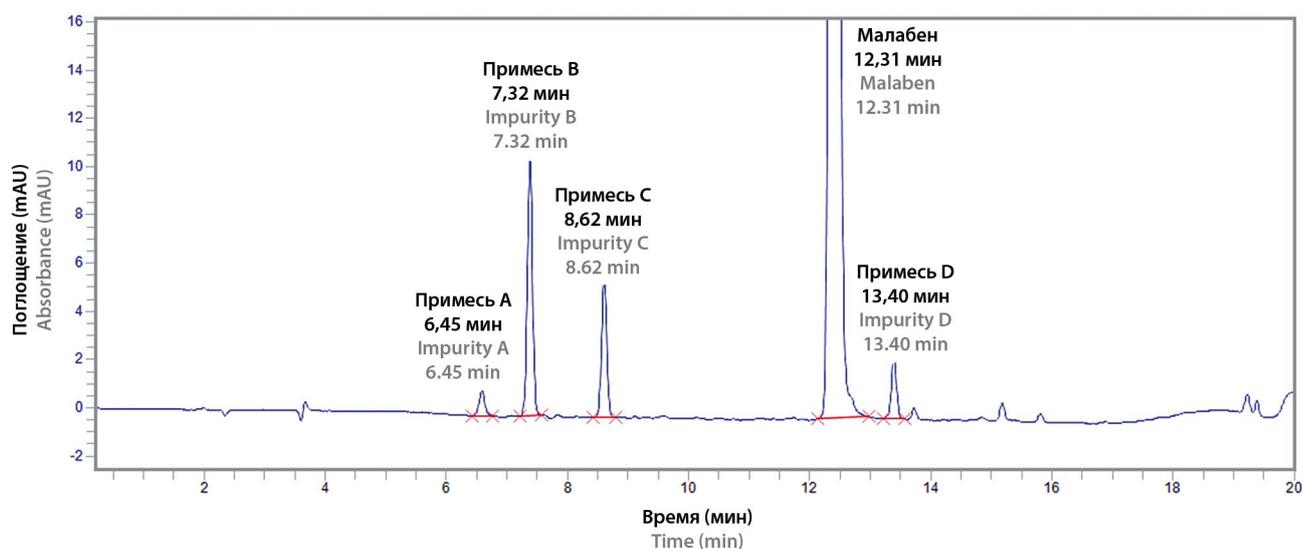


Рисунок 3. Хроматограмма испытуемого раствора малобена

Figure 3. Chromatogram of the test solution of Maloben

Таблица 3. Установление пределов обнаружения и количественного определения ($n = 3$)

Table 3. Establishment of detection and quantitation limits ($n = 3$)

Компонент Component	S/N			
	0,005 мкг/мл 0.005 µg/ml	0,01 мкг/мл 0.01 µg/ml	0,03 мкг/мл 0.03 µg/ml	0,06 мкг/мл 0.06 µg/ml
Примесь А Impurity A	Пики не обнаружены No peaks found	4,5–6,9	10,3–10,8	> 20
Примесь В Impurity B		5,4–7,3	10,3–12,5	> 20
Примесь С Impurity C		6,0–8,6	12,4–18,6	> 20
Малобен Maloben		6,7–9,3	11,5–19,1	> 20
Этмабен Ethmaben		7,4–8,6	12,5–18,2	> 20

ПО и ПКО установлены путем последовательного разбавления смеси растворов РП, малобена и этмабена и оценки соотношения сигнал/шум; результаты определения приведены в таблице 3.

Таким образом, ПО для всех анализов установлен на уровне 0,01 мкг/мл, ПКО – 0,03 мкг/мл. Относительно представленных результатов построены градуировочные зависимости в диапазоне концентраций 0,03–2,0 мкг/мл, что соответствует уровням от ПКО до 200 % нормируемого содержания РП. По уравнениям линейной регрессии рассчитаны коэффициенты чувствительности (k) примесей к основным компонентам проб как отношение тангенсов угла наклона прямых. Так как полученные уравнения линейной регрессии не предполагалось использовать для количественной оценки содержания РП, то полной статической обработки полученных результатов [12] не проводили. Результаты статической обработки полученных данных представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты статической обработки данных при построении градуировочных зависимостей (5 точек, $n = 3$)

Table 4. Results of statistical data processing when constructing calibration dependencies (5 points, $n = 3$)

Компонент Component	Наклон Slope	Отрезок Intercept	r	k к малобену k at maloben	k к этмабену k at ethmaben
Примесь А Impurity A	43973	1001	1,000	1,46	1,18
Примесь В Impurity B	55036	237	1,000	1,17	0,94
Примесь С Impurity C	67530	308	1,000	0,95	0,77
Малобен Maloben	64360	1055	1,000	–	0,81
Этмабен Ethmaben	51871	1164	1,000	1,24	–

Полученные данные показывают наличие линейных зависимостей в выбранном диапазоне концентраций с высокими значениями коэффициентов

корреляции (r), что позволяет использовать их для расчета коэффициентов чувствительности, которые будут включены в проект НД.

Оценку прецизионности (сходимости) проводили во всем диапазоне линейности, для этого рассчитывали значение RSD для времен удерживания и площадей пиков на каждом уровне концентрации. RSD времен удерживания для всех растворов не превышало 1,0 %, а величины RSD площадей пиков представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты статической обработки данных при оценке сходимости полученных результатов ($n = 3$)

Table 5. Results of statistical data processing when assessing the precision of the results obtained ($n = 3$)

Компонент Component	RSD (S), %				
	0,03 мкг/мл 0.03 µg/ml	0,5 мкг/мл 0.5 µg/ml	1,0 мкг/мл 1.0 µg/ml	1,5 мкг/мл 1.5 µg/ml	2,0 мкг/мл 2.0 µg/ml
Примесь А Impurity A	7,3	0,31	1,2	0,51	0,51
Примесь В Impurity B	4,2	0,45	0,59	0,37	0,20
Примесь С Impurity C	6,6	1,0	1,0	1,2	0,26
Малобен Maloben	2,2	0,80	0,20	0,18	0,21
Этмабен Ethmaben	3,9	1,0	0,33	0,40	0,64

RSD площадей пиков на всех уровнях концентраций, кроме уровня ПКО, не превышает 1,5 %.

Все проведенные и представленные выше эксперименты позволяют выбрать и установить уровни концентраций для включения их в проект нормативного документа: концентрация испытуемого раствора – 0,2 мг/мл, раствора сравнения (при норме содержания примесей 0,5 %) – 1 мкг/мл, раствора для проверки чувствительности (при норме контролируемого предела 0,05 %) – 0,1 мкг/мл.

Для проверки устойчивости хроматографических условий эксперимент был проведен на аналогичном оборудовании и колонке (Shimadzu, Prominence LC-20). Критическими параметрами при оценке пригодности системы были отношение сигнал/шум для раствора проверки чувствительности хроматографической системы из-за смены детектора, коэффициент разрешения между пиками основного вещества и примеси D из-за смены типа насоса и замены колонки, сходимость полученных результатов для раствора сравнения из-за изменения типа ввода пробы. Полученные результаты представлены в таблице 6. Так как эксперименты на PerkinElmer проведены много раз, то в таблице 6 приведены самые грубые результаты.

Таблица 6. Результаты проверки устойчивости (робастности) хроматографических условий

Table 6. Results of testing the stability (robustness) of chromatographic conditions

Оборудование (колонка) Equipment (column)	S/N	Rs	RSD (t_R), %	RSD (S), %
PerkinElmer (InterSil)	>40	>6,6	<0,15	<0,98
Shimadzu (Luna)	45	6,1	0,50	1,25
Норма Norm	>10	>3,0	<1,0	<5,0

Полученные данные на исходном и альтернативном оборудовании демонстрируют выполнение критериев пригодности хроматографической системы, что свидетельствует об устойчивости разработанной методики.

Для изучения стабильности указанных растворов они были приготовлены в требуемых концентрациях (согласно проекту НД), проанализированы сразу после приготовления, через 1, 2, 3, 7 дней (растворы хранили при комнатной температуре) и оценено изменение площадей всех обнаруженных на хроматограммах пиков. Результаты эксперимента показывают, что в течение 3 дней изменение площадей не превышает 5 %, на 7-й день изменения превысили указанную величину, следовательно, при комнатной температуре растворы пригодны для анализа в течение 3 дней.

Таким образом, в ходе работы выбраны единые оптимальные хроматографические условия для определения РП в СО, АФС и ГЛС малобена и этмабена, проведена их валидация, выбраны аналитические уровни концентраций для формирования проектов нормативных документов. С использованием разработанной аналитической методики проведен анализ образцов СО, АФС и таблеток малобена и этмабена на содержание РП, результаты определения представлены в таблице 7 (результаты определения РП в ГЛС полностью идентичны результатам для АФС). Содержание примесей рассчитано с учетом коэффициентов чувствительности к основному пику и с помощью калибровочных прямых.

Таблица 7. Результаты определения родственных примесей в СО и АФС малобена и этмабена ($n = 3, u_{с0} = 1,5 \%$)

Table 7. Results of determination of related impurities in CO and API of Maloben and Ethmaben ($n = 3, u_{с0} = 1.5 \%$)

Образец Sample	Способ расчета Method of calculation	W (РП), % W (related impurities), %			
		A	B	C	D
СО малобена RS maloben	Коэффициенты Odds	0,052	0,019	–	0,018
	Калибровка Calibration	0,043	0,018	–	0,009
АФС малобена API maloben	Коэффициенты Odds	–	0,20	–	–
	Калибровка Calibration	–	0,18	–	–
СО этмабена RS Ethmaben	Коэффициенты Odds	–	–	0,10	0,50
	Калибровка Calibration	–	–	0,10	0,48
АФС этмабена API Ethmaben	Коэффициенты Odds	–	0,093	0,069	0,82
	Калибровка Calibration	–	0,090	0,067	0,81

Примечание. *Прочерки в ячейках показывают, что примесь в образце не обнаружена или ее содержание ниже контролируемого предела (0,05 %).

Note. *Dashes in the cells indicate that the impurity was not detected in the sample or its content is below the controlled limit (0.05 %).

В целом результаты расчета двумя способами согласуются между собой, но содержание примеси D для СО малобена значительно отличается. Такую разницу можно объяснить низким содержанием примеси (менее 0,05 %), на которое не рассчитан аналитический диапазон разработанной методики. Таким образом, косвенно доказана правильность получаемых результатов при использовании коэффициентов чувствительности. Следует отметить, что применение прямого определения РП по калибровочным прямым позволяет оценить только известные примеси, тогда как применение метода сравнения позволяет косвенно оценить содержание и неидентифицированных примесей, если допустить, что $k = 1$. На основании полученных данных можно установить нормы содержания РП в образцах. Для всех образцов малобена: единичная примесь – не более 0,5 %, единичная неидентифицированная примесь – не более 0,1 %, сумма примесей – не более 1,0 %. Для всех образцов этмабена: примеси А, В, С – не более 0,5 %, примесь D – не более 1,0 %, единичная неидентифицированная примесь – не более 0,1 %, сумма примесей – не более 1,0 %. Тот факт, что структуры примесей установлены и результаты доклинических исследований свидетельствуют об их безопасности, допустимо установить более мягкие критерии их содержания, тем самым снизить расходы на очистку АФС и СО. Норма содержания примеси D в образцах этмабена на уровне 1,0 % возможна благодаря расширенному диапазону линейности (от ПК0 до 200 % при нормируемом содержании примесей 0,5 %).

Представленные хроматографические условия могут быть использованы для количественного определения действующих веществ в таблетках после небольших вариаций – изменения способа элюирования на изократическое и увеличения доли ацетонитрила в элюенте до 50–60 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведен полный цикл исследований для определения РП в СО, АФС и ГЛС малобена и этмабена с соблюдением принципа сквозной стандартизации, а именно:

- установлены структуры и получены образцы возможных РП;
- разработаны хроматографические условия, позволяющие определять РП во всех объектах анализа;
- проведена валидация хроматографических условий, в ходе которой установлены коэффициенты чувствительности РП по отношению к основному веществу;
- установлены нормы содержания РП и составлены проекты НД;
- проведен анализ реальных образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Graham J. C., Powley M. W., Udovic E., Glowienke S., Nicolette J., Parris P., Kenyon M., White A., Maisey A., Harvey J., Martin E. A., Dowdy E., Masuda-Herrera M., Trejo-Martin A., Bercu J. Calculating qualified non-mutagenic impurity levels: Harmonization of approaches. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105023. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105023.
2. Vanavi P. J., Rajput S. J. Impurity profiling of first line anti-tb drug-terizidone using chromatographic and related techniques. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2021;13(5):83–95. DOI: 10.22159/ijpps.2021v13i5.40918.
3. Swaina D., Singh Yadava A., Sasapua C., Akulab V., Samanthula G. Debasish Swaina. UPLC Separation of forced degradation and process related impurities of Velpatasvir and structure elucidation by online LC-Quadrupole-Time of Flight-Tandem mass Spectrometry. *Microchemical Journal*. 2020;155:104657. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104657.
4. Rajana N., Devi D. R., Kumar Reddy D. N., Babu J. M., Basavaiah K., Balakumaran K. Characterization of five oxidative degradation impurities and one process impurity of suvorexant drug substance by LC-MS/MS, HR-MS and 1D, 2D NMR: validation of suvorexant drug substance and process impurities by HPLC and UPLC. *Journal of Chromatographic Science*. 2020;58(5):433–444. DOI: 10.1093/chromsci/bmaa003
5. Wu P., Ye S., Li M., Li H., Kan Y., Yang Z. Impurity identification and quantification for arginine vasopressin by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2020;34:e8799. DOI: 10.1002/rcm.8799.
6. Gabriele J. W. M., Livia B. P., Camila M. B., Julia F. A. G. Determination of empagliflozin in the presence of its organic impurities and identification of two degradation products using UHPLC-QTOF/MS. *Microchemical Journal*. 2021;161:105795.
7. Huang Y., Lu H., Zhang F., Min C. Identification, isolation, characterization, and UHPLC quantification of potential genotoxic impurities in linagliptin. *Journal of Separation Science*. 2018;41(21):3985–3994.

8. Юсковец В. Н., Чернов Н. М., Яковлев И. П., Наркевич И. А. Способ получения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия. Патент РФ на изобретение № 2624729 С1 от 21.06.2016.
9. Юсковец В. Н., Яковлев И. П., Наркевич И. А. Способ получения 4-[(3-этокси-3-оксoproпаноил)амино]бензойной кислоты. Патент России № 2515245 С1 от 07.02.2013.
10. Generalova Yu., Sipkina N., Alekseeva G. Determination of related impurities in a new active pharmaceutical ingredient – Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate. *Microchemical Journal*. 2021;168:106498. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106498.
11. Миронов А. Н., Бондарев В. П. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К.; 2019. 280 с.
12. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130.

REFERENCES

1. Graham J. C., Powley M. W., Udovic E., Glowienke S., Nicolette J., Parris P., Kenyon M., White A., Maisey A., Harvey J., Martin E. A., Dowdy E., Masuda-Herrera M., Trejo-Martin A., Bercu J. Calculating qualified non-mutagenic impurity levels: Harmonization of approaches. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105023. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105023.
2. Vanavi P. J., Rajput S. J. Impurity profiling of first line anti-tb drug-terizidone using chromatographic and related techniques. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2021;13(5):83–95. DOI: 10.22159/ijpps.2021v13i5.40918.
3. Swaina D., Singh Yadava A., Sasapua C., Akulab V., Samanthula G. Debasish Swaina. UPLC Separation of forced degradation and process related impurities of Velpatasvir and structure elucidation by online LC-Quadrupole-Time of Flight-Tandem mass Spectrometry. *Microchemical Journal*. 2020;155:104657. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104657.
4. Rajana N., Devi D. R., Kumar Reddy D. N., Babu J. M., Basavaiah K., Balakumaran K. Characterization of five oxidative degradation impurities and one process impurity of suvorexant drug substance by LC-MS/MS, HR-MS and 1D, 2D NMR: validation of suvorexant drug substance and process impurities by HPLC and UPLC. *Journal of Chromatographic Science*. 2020;58(5):433–444. DOI: 10.1093/chromsci/bmaa003
5. Wu P., Ye S., Li M., Li H., Kan Y., Yang Z. Impurity identification and quantification for arginine vasopressin by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2020;34:e8799. DOI: 10.1002/rcm.8799.
6. Gabriele J. W. M., Livia B. P., Camila M. B., Julia F. A. G. Determination of empagliflozin in the presence of its organic impurities and identification of two degradation products using UHPLC-QTOF/MS. *Microchemical Journal*. 2021;161:105795.
7. Huang Y., Lu H., Zhang F., Min C. Identification, isolation, characterization, and UHPLC quantification of potential genotoxic impurities in linagliptin. *Journal of Separation Science*. 2018;41(21):3985–3994.
8. Yuskovets V. N., Chernov N. M., Yakovlev I. P., Narkevich I. A. Method for producing sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate. Patent RUS № 2624729 C1 dated 21.06.2016. (In Russ.)
9. Yuskovets V. N., Yakovlev I. P., Narkevich I. A. Method for producing 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino]benzoic acid. Patent RUS № 2515245 C1 dated 02.07.2013. (In Russ.)
10. Generalova Yu., Sipkina N., Alekseeva G. Determination of related impurities in a new active pharmaceutical ingredient – Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate. *Microchemical Journal*. 2021;168:106498. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106498.
11. Mironov A. N., Bondarev V. P. Guidelines for the examination of medicinal products. V. II. Moscow: Grif and K.; 2019. 280 p. (In Russ.)
12. Epshtein N. A. Validation of analytical procedures: graphic and calculated criteria for assessment of methods linearity in practice. *Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1424>
UDC 615.076 + 57.081:576.53



Review article / Обзорная статья

Recommendations for Validation of Automated Viable Cell Counting Methods (Review)

Marina A. Vodyakova✉, Nikita S. Pokrovsky, Ekaterina V. Melnikova, Vadim A. Merkulov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2, Petrovsky Blvd, 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>; Nikita S. Pokrovsky – <http://orcid.org/0000-0002-2355-0879>;
Ekaterina V. Melnikova – <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>; Vadim A. Merkulov – <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>.

Received: 25.01.2023 **Revised:** 15.11.2023 **Published:** 24.11.2023

Abstract

Introduction. The quality of viable cell-based products (such as biomedical cell products and advanced therapy medicinal products) must be maintained during the full production cycle to ensure their safety and efficacy for patients. The minimum required number of viable cells is one of the quality control criteria in the final product release specifications. This study looks into the process of validation of automated viable cell counting methods.

Text. The study reviewed the latest data on specific validation characteristics for automated cell counters as compared to manual counting methods. We identified the main problems with the validation methods. Based on the review of scientific and regulatory literature, we identified the key validation parameters, methods of their evaluation and measurement, and reporting of results. We described the validation algorithm for an automated cell counter, including such steps as the selection of reference standards, selection of the number of experimental points, experimental design, mathematical evaluation of the obtained results, and determination of the acceptance criteria.

Conclusion. Based on the data reviewed, the authors developed recommendations for the validation of automated viable cell counting procedures.

Keywords: validation, cell counter, hemocytometer, viability, cell lines

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 Nikita S. Pokrovsky wrote the text of the article, gathered and reviewed literature data. Ekaterina V. Melnikova proposed the study design. Vadim A. Merkulov reviewed and approved the final version 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., Pokrovsky N. S., Melnikova E. V., Merkulov V. A. Recommendations for validation of automated viable cell counting methods. *Drug development & registration*. 2023;12(4):217–222. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1424>

Рекомендации по валидации методик автоматического подсчета жизнеспособных клеток (обзор)

М. А. Водякова✉, Н. С. Покровский, Е. В. Мельникова, В. А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 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>; Н. С. Покровский – <http://orcid.org/0000-0002-2355-0879>;
Е. В. Мельникова – <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>; В. А. Меркулов – <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>.

Статья поступила: 25.01.2023 **Статья принята в печать:** 15.11.2023 **Статья опубликована:** 24.11.2023

Резюме

Введение. Качество продуктов на основе жизнеспособных клеток (таких, как биомедицинские клеточные продукты и высокотехнологические лекарственные препараты) должно поддерживаться на протяжении всего цикла производства, чтобы гарантировать их эффективность и безопасность при использовании пациентами. Минимально необходимое количество жизнеспособных клеток является одним из критериев контроля качества при выпуске конечного продукта. Исследование посвящено анализу процесса валидации методик автоматического подсчета жизнеспособных клеток.

Текст. В рамках данного исследования были рассмотрены актуальные данные об особенностях валидации автоматических счетчиков клеток относительно ручного подсчета. Были определены основные проблемы при валидации. На основе научных и регуляторных источников были выделены ключевые параметры процесса валидации, методы их оценки, измерения и представления результатов. Был описан алгоритм валидации автоматического счетчика клеток, включающий шаги по подбору стандартных образцов, выбору количества экспериментальных точек, разработке дизайна эксперимента, математической оценке полученных результатов и определению критериев приемлемости.

Заключение. На основании изученных данных в работе представлены результаты в виде рекомендаций по валидации методик автоматического подсчета жизнеспособных клеток.

Ключевые слова: валидация, счетчик клеток, гемоцитометр, жизнеспособность, клеточные линии

© Vodyakova M. A., Pokrovsky N. S., Melnikova E. V., Merkulov V. A., 2023

© Водякова М. А., Покровский Н. С., Мельникова Е. В., Меркулов В. А., 2023

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

Вклад авторов. М. А. Водякова и Н. С. Покровский осуществили написание текста статьи, сбор и обработку литературных данных. Е. В. Мельникова предложила дизайн исследования. В. А. Меркулов утвердил окончательную версию статьи.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Для цитирования: Водякова М. А., Покровский Н. С., Мельникова Е. В., Меркулов В. А. Рекомендации по валидации методик автоматического подсчета жизнеспособных клеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):217–222. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1424>

INTRODUCTION

The monitoring of cell line growth kinetics by counting viable cells is performed during research, development, and manufacturing of viable human cell-based products (such as biomedical cell products and advanced therapy medicinal products) to ensure the selection of an effective therapeutic cell dose. Both the concentration and viability of cells are key parameters for ensuring a standardized manufacturing process. These parameters are important not only for cell passaging at a constant seeding density, for ensuring optimal cell storage conditions, for maintaining maximum viability after thawing, and standardization of cell assays to obtain comparable data, but they also provide useful information for evaluation of cell culture performance [1]. Cell counting in cell cultures is usually performed once a day, which is consistent with the mammalian cell doubling time during the exponential growth phase. This is sufficient for establishing the overall growth profile of the cell line. More frequent counting can be carried out, if necessary, for certain cell cycles [2].

Traditionally, cell viability is assessed by dye exclusion methods, with trypan blue being one of the most common dyes, which selectively stains non-viable cells. Viable cells, on the other hand, have intact cell membranes and therefore cannot take up the dye from the medium [3]. This type of cell viability analysis involves manual staining followed by direct cell counting based on visual inspection under the microscope or using electronic cell counters [2].

The hemocytometer is considered a gold standard for measuring cell concentration and viability because of its low cost and versatility. However, counting with a hemocytometer takes a lot of time, and the results may vary depending on the analyst's skills. This method is also very tedious and not suitable for the development and production of cell products, in which cell characteristics must be evaluated on a daily basis, and parallel analysis of a large number of samples is hampered [1].

To overcome these limitations, automated cell counters that combine trypan blue staining and digital

imagery were developed. There are a few automated cell counters on the market, e.g. Cedex (Roche, Switzerland), Luna (Logos Biosystems, South Korea), TC10 and TC20 (Bio-Red, USA) and others. Automated cell counting devices usually have a digital camera for imaging, and the analysis is performed with specialized software with minimal help from the analyst. The automated counting method also allows counting of a larger number of cells per unit of time, compared to manual counting. Thus, they are characterized by high repeatability and accuracy, because they provide operator-independent results; they also greatly reduce the time of analysis, have improved productivity and performance [1]. Disadvantages of automatic counters are that they do not allow for simultaneous staining with different dyes and may lead to inaccuracies in differentiating some types of cells due to technical restrictions of their hardware and software [4].

The combination of specific features, advantages, and disadvantages of automated cell counters hampers their integration into research, laboratory, and production activities. The accuracy and repeatability of results both depend, to a great extent, on careful setting-up and calibration of the instrument, imaging parameters, as well as thorough sample preparation. Moreover, the use of automated counters during production of cell products requires validation of the counting procedures. Considering the above, the aim of this study was to develop a validation technique for the cell counting procedure using automated counters.

Key parameters of the procedure validation

When validating an automated cell counting procedure, it is important to consider factors that affect the measurements results, such as sample preparation, instrument calibration, as well as parameters and potential errors of the instrument, and the human factor. It is also essential to thoroughly homogenize the cell sample before sampling and perform parallel experiments in manual and automated modes in order to minimize differences in cell viability [4].

According to general monograph OFS.1.1.0012.15 "Validation of analytical procedures" of the Russian Pharmacopoeia, XIV edition¹, an automated cell counting procedure falls under the "quantitative determination of the drug substance and specified components" type. Validation of test procedures of this type requires determination of such parameters as specificity, range, linearity, accuracy, and precision – both for the total number of cells and for viable cells only.

Specificity is an unambiguous identification of cells in a sample, their quantification and differentiation from the surrounding medium and impurities. Specificity can be of two types – positive and negative. To determine positive specificity, one specifically measures the analyte (cells or beads with certain concentration and viability). The presence of some amounts of impurities or degradation products, theoretically, should not affect the measurement results. Negative specificity could be demonstrated by measuring cell medium or buffer and should yield zero viability and concentration.

Range is a scope of a sample's concentration values (or viability values) with a guaranteed acceptable level of accuracy and intermediate precision. Besides, the minimum concentration range is usually determined based on values from 80 % to 120 % of the nominal concentration, or from 80 % of the lower concentration to 120 % of the upper concentration.

The linearity of the test procedure is confirmed by a linear dependence of the number of cells on the sample's concentration within an established range. The result of the linearity measurement is presented as a coefficient of determination (R^2).

Accuracy, just like linearity, is studied within an established range. For quantitative methods, accuracy is determined by comparing the results obtained with the automated counting method with the results obtained with an orthogonal method (a well-studied method which is based on a different measurement principle)² with known accuracy and precision. In the case of cell counting, this would be manual counting on a hemocytometer. The accuracy of the procedure can also be assessed by measuring a well-characterized reference standard. The result of such accuracy assessment is presented as a percentage ratio of the results obtained by the validated and orthogonal procedures (recovery, $\Delta\%$). In addition, the conclusion on the accuracy of the procedure could also be made based on the established precision, specificity, and linearity.

Precision is a parameter reflecting the degree of similarity between several consecutive measurements obtained by the procedure in question. Precision is comprised of repeatability, intermediate precision, and reproducibility. Intermediate precision assesses the influence on the measurements results of such factors

as the analyst, equipment, and environmental factors. Reproducibility is only used in standardization of compendial procedures and establishes their repeatability in different laboratories. The results for this parameter are presented as standard deviation (SD) and coefficient of variation [CV, also known as relative standard deviation (RSD)] [5].

In spite of the fact that cell counters are widely used in the biopharmaceutical industry, there are relatively few papers on the validation of such procedures (Table 1). In addition, some papers discuss non-conventional validation parameters. For example, Bottová et al. [6] validated a counting procedure for dendritic cells in a prostate cancer immunotherapy cell product (DCVAC/PCa) based on their size and shape, for which they used an automated cell counter Vi-CELL XR (Beckman Coulter, USA).

Furthermore, some validation studies use different sets of parameters, e.g., one study [8] compared a hemocytometer, an automated cell counter TC20 (Bio-Rad, USA), and a flow cytometer BD FACSCalibur (BD Biosciences, USA) using such parameters as precision, accuracy, and time of analysis, on HeLa (uterine adenocarcinoma cells) and Jurkat (human T-lymphocytes) cell lines. The counting of polystyrene beads loaded into the hemocytometer was performed 10 times according to an individual plan to calculate CV for a given hemocytometer area. The variability was shown to be affected by the area and sample concentration. The hemocytometer CV between measurements was greater than 10 % most of the time at concentrations lower than 0.1 million/mL, and was related to the area in the concentration range of up to 0.45 million/mL. Seven different analysts performed cell counting on 2 different hemocytometers; inaccuracy was observed from analyst to analyst, and the CV between analysts was 7.1–15.6 %. Next, they compared counting of one chamber with 6 different TC20 devices, and the calculated CV was 2.4 %. The manual counting took about 3 minutes or more depending on the concentration of the test sample, while automated counting took only about 20 to 30 seconds.

Another study [9] analyzed factors that affect the accuracy of measurement on a TC20 automated cell counter (Bio-Rad, USA) in comparison with Goryaev chamber, using human mesenchymal stem cells (MSC) from bone marrow (FetMSC cell line). As was shown in the paper, the presence of protein components of the conditioned medium and trypan blue particles introduced errors in the measurements, therefore a modification of the procedure was proposed. This new procedure removes cells smaller than 10 μm in size from the counting pool and gives more accurate cell counting results.

Due to lack of public information on the topic, the authors of this paper proposed a validation algorithm based on the current knowledge in academic literature [4–9], which consists of several steps, such as selection of reference standards, selection of the number of experimental points, experimental design, mathematical evaluation, and acceptance criteria.

¹ State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition; 2018.

² Q2(R2) Validation of analytical procedures. ICH harmonised guideline (Draft version). International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. 24.03.22.

Table 1. Examples of experimental studies on the validation of automated cell counters

Validated equipment	Cadena-Herrera D. et al. [4]		Huang L. C. et al. [7]
	Countess (Invitrogen, USA)	Vi-CELL XR (Beckman Coulter, USA)	Cedex (Roche, Switzerland)
Reference method	Hemocytometer		–
Tested cell lines	CHO-K1 and U937		CG8711 and CG1940
Standard	ViaCheck™ Control beads (Polysciences, USA) (concentration: 1, 4, 8 million/mL, viability: 0, 50, 75, 90, and 100%)		Certified Cedex calibration beads (Roche, Switzerland) at a concentration of 5.045 million/mL
Range	Measurement parameters		
	Concentration: 5 points (1, 2, 4, 6, 8 million/mL) in triplicate Viability: 5 points (25, 50, 75, 90, 100%) in triplicate		Concentration: 6 points (0.3125 million/mL – 10 million/mL for cells, 0.3125 million/mL – 5 million/mL for beads) Viability: 6 points (0, 50, 70, 80, 90, 100%)
	Result		
	Concentration: from 1 to 8 million/mL Viability: from 0 to 100 %		Concentration: 0.3125 million/mL – 10 million/mL for cells, 0.3125 million/mL – 5 million/mL for beads Viability: from 0 to 100 %
Linearity	Measurement parameters		
	Concentration: 5 points (1, 2, 4, 6, 8 million/mL) in triplicate Viability: 5 points (25, 50, 75, 90, 100%) in triplicate		Concentration: 6 points (0.3125 million/mL – 10 million/mL for cells, 0.3125 million/mL – 5 million/mL for beads) Viability: 6 points (0, 50, 70, 80, 90, 100%)
	Result		
	Concentration: R ² ≥ 0.99 Viability: R ² ≥ 0.98		Concentration: R ² ≥ 0.999 Viability: R ² ≥ 0.995
Accuracy	Measurement parameters		
	Concentration: 5 points (1, 2, 4, 6, 8 million/mL) in triplicate Viability: 5 points (25, 50, 75, 90, 100 %) in triplicate		Concentration: measurement of bead samples with a concentration of 5.045 million/mL Viability: measurement of various proportions of viable and non-viable cells (0, 50, 70, 80, 90, 100 % viable cells)
	Result		
	Concentration: from 99 to 105 % Viability: from 99 to 105 %		Concentration: from 91.3 to 105.1 % Viability: from 95.3 to 106.4 %
Precision	Measurement parameters		
	Concentration 1 million/mL in 6 replicates. All the samples were prepared on the same day by the same analyst		Concentration Repeatability: triplicate analysis by two analysts on three different days. Intermediate precision: three independent analyses in triplicate by two analysts. Additionally, three independent analyses in triplicate on another similar instrument Viability Repeatability: triplicate analysis of samples with 85 % and 75 % viability. Intermediate precision: three independent analyses in triplicate by two analysts. Additionally, three independent analyses in triplicate on another similar instrument
	Result		
	RSD 11,04 – 14,3 %	RSD 2,27 – 5,28 %	Concentration Repeatability: RSD 1.11–5.92 % Intermediate precision: RSD 12.7–15.8 % Viability Repeatability: RSD 0.40–2.11 %
	For hemocytometer: RSD 0.75 – 8.06 %		
Specificity	Measurement parameters		
	Measurement of the cell medium background, bead buffer, impurities		Measurement of the cell medium background, bead buffer, impurities. Measurement of various proportions of viable and non-viable cells (0, 70, 100 % viable cells)
	Result		
	No influence of the medium on the measurement results		The contribution of the medium is less than 0.1 % of the total measurement. The method does not allow to distinguish cells from other particles of the same size

Note. CHO-K1 – Chinese hamster ovary cells; U937 – human cells, histiocytic lymphoma (pleural effusion); CG8711 and CG1940 – prostate adenocarcinoma cells; RSD – relative standard deviation; R² – coefficient of determination.

Validation algorithm

1. Reference standard selection

In addition to cell samples, it is recommended to use certified fluorescent beads with a known concentration for validation of an automated counting procedure. The choice of the reference standard depends on the cell line used: the beads should be as close as possible to the cells in terms of such characteristics as size, roundness, density, and affinity to dyes.

2. Selection of the number of experimental points

In their papers on the validation of automated cell counters, researchers often do not explain the rationale for the choice of experimental points, therefore, the recommendations we offer below are based on the generalization of data presented in the scientific literature and guidelines [4–9]. The summarized data are presented in Table 2 as minimum and recommended numbers of experimental points and replicates.

The recommended values given in Table 2 are not the maximum allowable values, because the selection of more points and replicates will give more accurate results. However, the relevance of using more measurements must be justified.

3. Experimental design

After determining the number of control points, specific values of concentration and viability must be established for each experiment. An example of such experimental design is shown in Table 3 [4–9].

The choice of two points in the specificity experiment makes it possible to assess both positive and negative specificity. In addition, it is also possible to use a larger number of experimental points by diluting the samples. When determining concentration, the samples are diluted with buffer or cell medium, and when determining viability, viable and non-viable cells (e.g., treated with ethanol) are mixed in the proportions necessary to obtain the required viability.

Table 2. Selection of the number of experimental points

	Minimum number of		Recommended number of	
	Experimental points	Replicates per point	Experimental points	Replicates per point
Specificity	1–3	3	3–5	3–5
Linearity	5	3	8	3–5
Precision (repeatability and intermediate precision)*	3	3	3–5	3–6
	or			
	1	6	1–3	6
Accuracy	Determined by comparing the results of the analysis obtained by another reference method			
	3	3	5	3
	or			
	Determined after establishing precision, linearity, and specificity			
Range	Determined by the smallest and the largest values that have been shown to have acceptable precision and linearity			

Note. * Repeatability analysis is performed by one operator on a single day, intermediate precision analysis is performed in parallel by two operators (or by one operator on different days).

If a reference method or a reference standard with well-known concentration and viability characteristics are not used in the test method validation, the accuracy of the test method can be deduced from the analysis of specificity, linearity, and precision (the accuracy in this case is confirmed if the results for specificity, linearity, and precision meet their acceptance criteria). If such a method or reference standard are available, the accuracy can be determined by comparing the measurement results obtained for the sample and the reference standard.

4. Mathematical evaluation of the results

Mathematical evaluation is performed to verify the reliability of the study results and to prove the presence (or absence) of statistical differences in the cell counting results obtained by different methods, instruments, ana-

Table 3. Experimental design for an automated cell counter validation

Experiment	Validated parameter	N	R	O	Control points, % of max. concentration	Control points, % of max. viability	
1	Specificity	2	3	1	0, 100	0, 100	
2	Linearity	8	3	1	15, 30, 45, 60, 75, 90, 100, 120	0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 100	
3	Repeatability	3	6	1	100 (×3)	100 (×3)	
4	Intermediate precision	3	3	2	100 (×3)	100 (×3)	
5	Accuracy	5	3	1	0, 25, 50, 75, 100	0, 25, 50, 75, 100	
		or					
		–	–	–	Determined by the results obtained for specificity, linearity, and precision		
6	Range	–	–	–	Determined by linearity assessment		

Note. N – number of control points; R – number of repeated measurements carried out for each control point; O – number of operators conducting measurements (can be replaced by the number of days on which one operator conducts measurements).

lysts, as well as differences in the results obtained on different days or under different conditions. The comparison of the results of the two methods can be evaluated using the paired Student's t-test or by calculating SD of the results obtained relative to the true value or the value obtained using the reference method.

The linearity results are presented as a linear graph of the observed concentrations and viability values against the expected ones, and as a linear regression equation. The R^2 and CV coefficients for each experimental point are also evaluated for compliance with the acceptance criteria. R^2 can be calculated automatically by most statistical software. It is recommended to represent the graph together with the y-intercept, slope ratio, and the residual sum of squared deviations.

CV is determined by the ratio of SD of a series of measurements to their mean value and is expressed in percent.

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \cdot 100 \% [10], \quad (1)$$

where σ is the standard deviation of a series of concentration or viability measurements, μ is the mean value of a series of concentration or viability measurements.

The recovery parameter ($\Delta\%$) shows the percentage ratio of the two values. In the case of accuracy determination, $\Delta\%$ shows the percentage difference between the mean values of measurement series for the method being validated and the reference method.

$$\Delta\% = \left| \frac{\mu_{\text{exp}} - \mu_{\text{ref}}}{\mu_{\text{ref}}} \right| \cdot 100 \%, \quad (2)$$

where μ_{exp} is the mean value of a series of concentration or viability measurements for the method being validated, μ_{ref} is the mean value of a series of concentration or viability measurements for the reference method.

5. Acceptance criteria

Table 4 provides acceptance criteria for evaluation of validation parameters for an automated cell counting method.

The method is considered validated if all the test parameters meet the acceptance criteria. A deviation in one or more of the parameters must be justified.

CONCLUSION

The development of a cell counting method is one of the key steps in the research, development, and production of cell products. However, the currently recognized reference method of manual counting with a hemocytometer has a number of drawbacks that limit its use in cases where high throughput and counting speed are required. In such cases, an automated counting method using a cell counter can be used as a replacement. However, the introduction of such cell counters for quality control in the production of cell

products requires validation. Validation of automated cell counting methods is a complex procedure that considers many aspects, such as proper selection of validation parameters, standards, and the optimal number of replicates. Careful consideration of these aspects ensures the reliability and accuracy of the validation process. The authors have considered the advantages of automated cell counting in comparison with manual counting, analyzed scientific literature and guidelines on this topic, and described such key parameters of the validation process of an automated cell counting method as specificity, range, linearity, accuracy, and precision. Thus, the authors proposed a general validation algorithm based on the selection of reference standards, the number of experimental points, experimental design, mathematical evaluation of the results, and verification that the results meet the acceptance criteria.

Table 4. Acceptance criteria for the estimated validation parameters

Validation parameter	Acceptance criteria
Specificity	Negative: No influence of the medium or buffer on the measurement results
	Positive: $CV \leq 10 \%$
Linearity	$R^2 \geq 0.95$
	$CV \leq 10 \%$
Precision	$CV \leq 20 \%$
Accuracy	$\Delta\% \leq 20$
	or
	Specificity, linearity, and precision results meet the acceptance criteria
Range	Linearity, precision, and accuracy results meet the acceptance criteria

REFERENCES

- Fagète S., Steimer C., Girod P.A. Comparing two automated high throughput viable-cell counting systems for cell culture applications. *Journal of biotechnology*. 2019;305:23–26. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.08.014.
- Butler M., Spearman M. Cell counting and viability measurements. *Animal Cell Biotechnology*. 2007;205–222. DOI: 10.1007/978-1-59745-399-8_8.
- Louis K.S., Siegel A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in Molecular Biology*. 2011;740:7–12. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6_2.
- Cadena-Herrera D. Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated. *Biotechnology Reports (Amsterdam)*. 2015;7:9–16. DOI: 10.1016/j.btre.2015.04.004.
- Yurgel' N.V., Mladentseva A.L., Bourdain A.V., editors. Guidance on the validation of methods for the analysis of medicinal products. Moscow: Association of Russian Pharmaceutical Manufacturers; 2007. 48 p. (In Russ.)
- Bottová I., Lee L. Validation study of the Vi-CELL XR for dendritic cell counting. *BioProcessing Journal*. 2014;13(3):32–37. DOI: 10.12665/J133.BottovaLee.
- Huang L.C. Validation of cell density and viability assays using Cedex automated cell counter. *Biologicals*. 2010;38(3):393–400. DOI: 10.1016/j.biologicals.2010.01.009.
- Hsiung F. Comparison of Count Reproducibility, Accuracy, and Time to Results between a Hemocytometer and the TC20 Automated Cell Counter. *Bulletin 6003 Rev. B*. 2013:1–4.
- Solov'eva A.M., Aleksandrova S.A. Evaluation of readings of an automated cell counter. *Tsitologiya*. 2020;62(7):522–532. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0041377120070056.
- Glantz A.S. Biomedical statistics. M.: Praktika; 1998. 459 p. (In Russ.)

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1587>
УДК 54.061:54.062:615.322



Оригинальная статья / Research article

Флавоноиды из недотроги железистой (*Impatiens glandulifera*) и их антиоксидантная активность

А. К. Уэйли¹, Р. И. Лукашов², А. О. Уэйли¹✉, Е. В. Жохова¹, Н. С. Гурина², М. Ю. Гончаров¹,
Г. П. Яковлев¹, В. А. Терлецкая²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ). 220116, Республика Беларусь, г. Минск, пр-т Дзержинского, д. 83

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

ORCID: А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Р. И. Лукашов – <https://orcid.org/0000-0001-9547-5372>; А. О. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>;

Е. В. Жохова – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>; Н. С. Гурина – <https://orcid.org/0009-0009-9150-5728>;

М. Ю. Гончаров – <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>; Г. П. Яковлев – <https://orcid.org/0009-0009-4570-2739>; В. А. Терлецкая – <https://orcid.org/0009-0000-8848-4617>.

Статья поступила: 27.06.2023

Статья принята в печать: 11.10.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Род *Impatiens* L. включает около 850 видов, которые встречаются в основном в тропических и субтропических климатических зонах. Коренные народы Пакистана использовали пасты и экстракты *I. glandulifera* для лечения болей в суставах, беспокойства и кожных аллергий. Цветки *I. glandulifera* входят в состав цветочных средств Баха, которые используются для успокоения, расслабления и помогают сбалансировать эмоциональное состояние.

Цель. Выделение и установление структуры 11 фенольных соединений из надземных частей *I. glandulifera* и оценка их антиоксидантной активности.

Материалы и методы. Надземная часть *Impatiens glandulifera* Royle собрана в Ленинградской области вблизи поселка Орехово в 2021 году. Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором. Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами с различной селективностью, а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором. Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами 1D- и 2D-ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия). Для изучения антиоксидантной активности использовали растворы, полученные растворением выделенных веществ в смеси диметилсульфоксида и этанола; водный раствор витамина С и спиртовой раствор тролокса (Sigma-Aldrich, Япония).

Результаты и обсуждение. В результате фитохимического анализа наземной части недотроги железистой (*Impatiens glandulifera* Royle) выделено 11 полифенольных вторичных метаболитов (**1-11**) и установлена их структура, а также проведена оценка антиоксидантной активности всех выделенных соединений.

Заключение. Максимальные значения RAR эриодиктиола (**3**), кемпферола (**1**) и кверцетина (**2**) достоверно ($p = 0,585$) не отличались от таковых у препаратов сравнения: витамина С и тролокса, что указывает на антиоксидантное действие этих трех соединений, сравнимое с действием известных антиоксидантов. Однако полуживые концентрации этих веществ в два и более раза ниже ($p = 2,56 \cdot 10^{-4}$) по сравнению с витамином С.

Ключевые слова: *Impatiens glandulifera*, недотрога железистая, флавоноиды, вторичные метаболиты, антиоксидантная активность

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

Вклад авторов. А. О. Уэйли, Е. В. Жохова, М. Ю. Гончаров выполнили экспериментальную часть по выделению индивидуальных соединений. А. К. Уэйли, Г. П. Яковлев интерпретировали результаты ЯМР-спектроскопии. Р. И. Лукашов, Н. С. Гурина, В. А. Терлецкая выполнили экспериментальную часть по антиоксидантной активности. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

Благодарность. Исследования проводились на оборудовании Центра химического анализа и материаловедения, Центра магнитно-резонансных исследований Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

Для цитирования: Уэйли А. К., Лукашов Р. И., Уэйли А. О., Жохова Е. В., Гурина Н. С., Гончаров М. Ю., Яковлев Г. П., Терлецкая В. А. Флавоноиды из недотроги железистой (*Impatiens glandulifera*) и их антиоксидантная активность. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):223–230. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1587>

Flavonoids from *Impatiens glandulifera* and Their Antioxidant Activity

Andrei K. Whaley¹, Raman I. Lukashov², Anastasiia O. Whaley¹✉, Elena V. Zhokhova¹,
Natalia S. Gurina², Mikhail U. Goncharov¹, Gennadi P. Yakovlev¹, Victoria A. Tsarletskaia²

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² Belarusian State Medical University. 83, Dzerzhinsky avenue, Minsk, 220116, Republic of Belarus

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

© Уэйли А. К., Лукашов Р. И., Уэйли А. О., Жохова Е. В., Гурина Н. С., Гончаров М. Ю., Яковлев Г. П., Терлецкая В. А., 2023

© Whaley A. K., Lukashov R. I., Whaley A. O., Zhokhova E. V., Gurina N. S., Goncharov M. U., Yakovlev G. P., Tsarletskaia V. A., 2023

ORCID: Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Raman I. Lukashov – <https://orcid.org/0000-0001-9547-5372>;
Anastasiia O. Whaley – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Elena V. Zhokhova – <https://orcid.org/0000-0002-9763-096X>;
Natalia S. Gurina – <https://orcid.org/0009-0009-9150-5728>; Mikhail U. Goncharov – <https://orcid.org/0000-0002-9706-9850>;
Gennadi P. Yakovlev – <https://orcid.org/0009-0009-4570-2739>; Victoria A. Tsiarletskaia – <https://orcid.org/0009-0000-8848-4617>.

Received: 27.06.2023 Revised: 11.10.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. The genus *Impatiens* L. includes about 850 species, which are found mainly in tropical and subtropical climate zones. The Indigenous people of Pakistan used pastes and extracts from *I. glandulifera* for the treatment of joint pain, anxiety and skin allergies [6]. Flowers of *I. glandulifera* are used in Bach flower remedies, which are used for sedation, relaxation and helping to balance emotional states.

Aim. Isolation and structural elucidation of 11 phenolic constituents from the aerial parts of *I. glandulifera* and the evaluation of their antioxidant activity.

Materials and methods. The aerial part of *Impatiens glandulifera* Royle was collected in the Leningrad region near the village of Orekhovo in 2021. Fractions were analyzed by analytical high performance liquid chromatography (HPLC) using a Prominence LC-20 (Shimadzu, Japan) equipped with a diode array detector. The isolation of individual compounds was carried out by column chromatography on open glass columns with sorbents of different selectivity, as well as by preparative HPLC using a Smartline (Knauer, Germany) equipped with a spectrophotometric detector. The structure of isolated individual compounds was established by 1D and 2D NMR spectroscopy (Bruker Avance III 400 MHz, Germany). To study the antioxidant activity, we used solutions obtained by dissolving the isolated substances in a mixture of dimethyl sulfoxide and ethanol; an aqueous solution of vitamin C and an alcoholic solution of Trolox (Sigma-Aldrich, Japan).

Result and discussion. Phytochemical analysis of the aerial parts of *Impatiens glandulifera* Royle. resulted in the isolation of 11 polyphenolic secondary metabolites (1-11) and their structures were elucidated. The antioxidant activity of all isolated compounds was evaluated.

Conclusion. The maximum RAP values of eriodyctiol (3), kaempferol (1), and quercetin (2) did not differ significantly ($p = 0.585$) from those of the comparator preparations: vitamin C and Trolox, which indicates that the antioxidant effect of these three isolated compounds is comparable to the well-known antioxidants. However, the semi-effective concentrations of these substances are two or more times lower ($p = 2.56 \cdot 10^{-4}$) compared with vitamin C.

Keywords: *Impatiens glandulifera*, flavonoids, secondary metabolites, antioxidant activity

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. Anastasiia O. Waley, Elena V. Zhokhova, Mikhail U. Goncharov performed the experimental part on the isolation of individual compounds. Sergey N. Smirnov performed the NMR experiment. Andrei K. Whaley, Gennadi P. Yakovlev performed processing of the NMR-experiments. Raman I. Lukashov, Natalia S. Gurina, Victoria A. Terletskaia performed the experimental part on antioxidant activity. All authors participated in the discussion of the results.

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).

Acknowledgment. The studies were carried out using the equipment of the Center for Chemical Analysis and Materials Research, Magnetic Resonance Research Centre of the Research Park of the Saint Petersburg State University.

For citation: Whaley A. K., Lukashov R. I., Whaley A. O., Zhokhova E. V., Gurina N. S., Goncharov M. U., Yakovlev G. P., Tsiarletskaia V. A. Flavonoids from *Impatiens glandulifera* and their antioxidant activity. *Drug development & registration*. 2023;12(4):223–230. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1587>

ВВЕДЕНИЕ

Род *Impatiens* L. включает около 850 видов, которые встречаются в основном в тропических и субтропических климатических зонах, таких как тропическая Африка, Индия, юг Китая, но некоторые виды встречаются также в Европе, России и Северной Америке [1–5]. *Impatiens glandulifera* Royle – однолетнее травянистое растение из семейства *Balsaminaceae* с гладким, обычно полым и членистым стеблем, достигающим 3 м высоты, и зигоморфными цветками, окраска которых варьируется от белой до розово-фиолетовой [6]. *I. glandulifera* произрастает в Западных Гималаях и в настоящее время широко распространена в странах Европы, иногда в виде инвазивного вида, и встречается в различных местообитаниях, особенно на берегах озер и морей, вдоль рек и

ручьев [7–9]. Коренные народы Пакистана использовали пасты и экстракты *I. glandulifera* для лечения болей в суставах, беспокойства и кожных аллергий [10]. Цветки *I. glandulifera* входят в состав цветочных средств Баха, которые используются для успокоения, расслабления и помогают сбалансировать эмоциональное состояние [11]. В предыдущих исследованиях в *I. glandulifera* были идентифицированы и выделены различные типы вторичных метаболитов, в том числе флавоноиды, фенольные кислоты [12, 13], производные нафталина и нафтохинона [14, 15], тритерпеноиды, жирные кислоты и стеролы [16], а также составляющие эфирного масла [1, 17]. Лекарственные растения представляют собой богатый источник биологически активных веществ, в связи с чем их исследование является актуальной задачей [18–20].

Целью настоящего исследования является выделение и установление структуры 11 фенольных соединений (рисунок 1) из надземных частей *I. gildulifera* и оценка их антиоксидантной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования являлась надземная часть *Impatiens glandulifera* Royle, собранная в Ленинградской области вблизи поселка Орехово в августе 2021 года и идентифицированная доцентом кафедры фармакогнозии М. Ю. Гончаровым ВЭЖХ-хроматограммы вместе с УФ-спектрами получали на приборе Prominence LC-20 с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu corp., Япония) с колонкой Supelcosil LC18 (250 × 4,6, 5 мкм). Препаративную ВЭЖХ проводили с использованием системы Knauer Smartline со спектрофотометрическим детектором, снабженным колонкой Kromasil C18 (250 × 30 мм, 5 мкм) для препаративной ВЭЖХ. Для анализа ВЭЖХ и препаративной ВЭЖХ использовали растворители марки J.T. Baker класса ВЭЖХ. Хроматографию на открытых колонках (КК) проводили на сорбентах Sephadex LH-20 (Cytiva, Швеция). Спектры 1D- и 2D-ЯМР получены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III 400 (Bruker, Германия).

500 г высушенного на воздухе растительного материала *I. gildulifera* экстрагировали 96%-м этанолом путем исчерпывающей мацерации при комнатной температуре. После каждого цикла экстракции полученный экстракт фильтровали и концентрировали на

вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph, Германия). Отогнанный растворитель возвращали в растительный материал для дальнейшей мацерации. Этот процесс повторяли несколько раз (×8) до тех пор, пока экстракт, полученный из сырья, не становился бледным по сравнению с экстрактом, полученным в ходе первого цикла экстракции. Полученный концентрированный 96%-й этанольный экстракт объемом 500 мл подвергали исчерпывающей жидкостно-жидкостной экстракции равным объемом *n*-гексана с получением *n*-гексановой фракции. К оставшемуся этанольному экстракту добавляли 200 мл воды, после чего его дополнительно подвергали исчерпывающей жидкостно-жидкостной экстракции дихлорметаном (ДХМ) с получением фракции ДХМ. К оставшейся этанольной фракции дополнительно добавляли 200 мл воды, после чего ее подвергали исчерпывающей жидкостно-жидкостной экстракции *n*-бутанолом с получением *n*-бутанольной фракции и оставшегося водно-этанольного экстракта.

С помощью ВЭЖХ-анализа было обнаружено во фракциях ДХМ и *n*-бутанола наибольшее качественное и количественное содержание вторичных метаболитов. ДХМ и *n*-бутанольную фракции концентрировали на вакуумно-ротационном испарителе до объемов 50 мл и подвергали повторной изократической колоночной хроматографии на сефадексе LH-20 с использованием 96%-го этанола в качестве подвижной фазы. Субфракции собирали из колонок в пробирки объемом до 25 мл, каждую из которых далее анализировали с помощью ТСХ с использова-

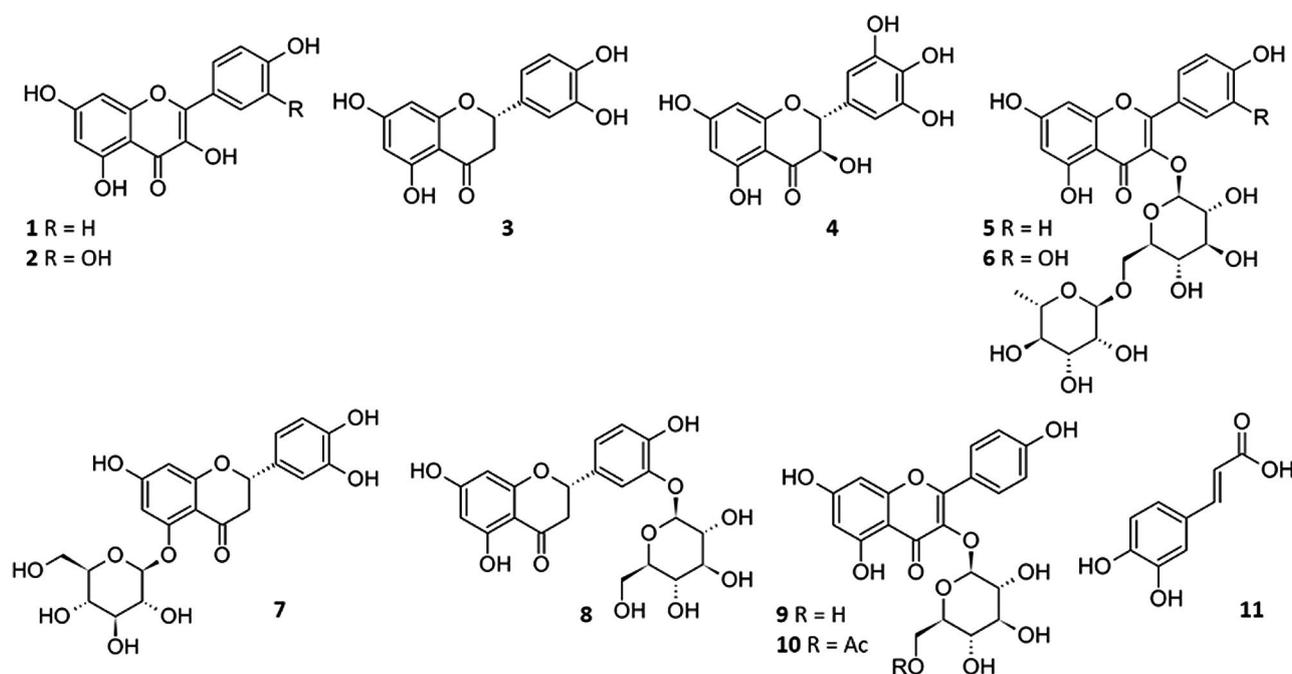


Рисунок 1. Структура соединений 1–11

Figure 1. Structures of compounds 1–11

нием системы подвижной фазы БУВ (*n*-бутанол:уксусная кислота:вода) в соотношении 4:1:2. Подфракции с аналогичными профилями ТСХ далее группировали и концентрировали до 10 мл.

Фракция DCM после первой колонки с Sephadex LH-20 разделялась на субфракции DCM-SbFr-1 1–3. Субфракции DCM-SbFr-1 1 и 2 объединяли и дополнительно подвергали колоночной хроматографии с Sephadex LH-20, получая DCM-SbFr-2 1–10. Полученные DCM-SbFr-2 5 и 6 объединяли и дополнительно подвергали колоночной хроматографии на Sephadex LH-20 с получением DCM-SbFr-3 1–6. Субфракции ДХМ, содержащие хорошо разделенные пики на хроматограммах ВЭЖХ, далее подвергали препаративной ВЭЖХ, в результате которой были выделены кемпферол (**1**), кверцетин (**2**) и эриодиктиол (**3**).

Фракция *n*-бутанола после первой колонки с Sephadex LH-20 разделялась на субфракции BuOH-SbFr-1 1–6. BuOH-SbFr-1 1–3 объединяли и дополнительно подвергали колоночной хроматографии с Sephadex LH-20, получая BuOH-SbFr-2 1–12. Полученные субфракции BuOH-SbFr-2 4–7 объединяли и дополнительно подвергали колоночной хроматографии на Sephadex LH-20 с получением BuOH-SbFr-3 1–7. Полученный BuOH-SbFr-3 3 и 4 снова подвергали колоночной хроматографии на Sephadex LH-20 с получением BuOH-SbFr-4 1–5. Субфракции BuOH, содержащие хорошо разделенные пики на хроматограммах ВЭЖХ, далее подвергали препаративной ВЭЖХ, в результате которой были выделены ампелопсин (**4**), никотифлорин (**5**), рутин (**6**), эриодиктиол-5-О-β-D-глюкопиранозид (**7**), эриодиктиол-3'-О-β-D-глюкопиранозид (**8**), астрагалин (**9**), 6''-ацетиластрагалин (**10**) и кофейная кислота (**11**).

Для изучения антиоксидантной активности использовали растворы, полученные растворением выделенных веществ (**1–11**) в смеси диметилсульфоксида и этанола; водный раствор витамина С и спиртовой раствор тролокса (Sigma-Aldrich, Япония).

Исходный раствор готовили с концентрацией каждого из испытуемых веществ 18,000 μмоль/л; для получения серии разбавленных растворов маточный раствор последовательно дважды разбавляли растворителями.

В качестве препаратов сравнения использовали известный природный антиоксидант витамин С и синтетический аналог витамина Е тролокс.

К 0,6 мл испытуемого раствора добавляли 4,2 мл 0,01%-го раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) (Sigma-Aldrich, Япония), приготовленного в том же растворителе, что и испытуемый раствор. Через 30 мин измеряли оптическую плотность при длине волны 517 нм. Предварительно измеряли оптическую плотность раствора DPPH: к 4,2 мл 0,01%-го раствора DPPH добавляли 0,6 мл растворителя, из которого готовили соответствующий испытуемый раствор. Растворитель использовали в качестве компенсационного раствора.

Процент поглощения радикалов (*X*, %) (RAP) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(A_0 - A_1) \cdot 100}{A_0},$$

где A_0 – оптическая плотность раствора DPPH; A_1 – оптическая плотность раствора DPPH после добавления исследуемого раствора.

Статистическая обработка. Каждое исследование проводили трижды ($n = 3$). Результат представляли в виде среднего значения и полуширины доверительного интервала среднего значения.

Для характеристики антиоксидантной активности использовали максимальное значение RAP и полуэффективную концентрацию (EC_{50}). EC_{50} – концентрация, при которой значение RAP составляло половину от максимального. Его рассчитывали на основе уравнения зависимости значения RAP от концентрации с помощью Microsoft Office Excel 2016.

Для оценки значимости различий между изучаемыми параметрами использовали дисперсионный анализ. Значения различались статистически значимо при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соединение **1** было выделено в виде светло-желтого кристаллического твердого вещества с двумя максимумами УФ-поглощения при $\lambda_{\max} = 265, 365$ нм, характерными для флавонол-агликона кемпферола. $^1\text{H-NMR}$ -спектр соединения **1** состоял из сигналов ароматических протонов Н-6 (6,20 (1H, д, $J = 2,0$ Гц)), Н-8 (6,44 (1H, д, $J = 2,0$ Гц)), Н-2',6' (8,05 (1H, д, $J = 9,0$ Гц)) и Н-3',5' (6,93 (1H, д, $J = 9,0$ Гц)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 3 (9,37 (1H, с)), 5 (12,48 (1H, с)), 7 (10,77 (1H, с)) и 4' (10,10 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **1** представляет собой кемпферол.

Соединение **2** было выделено в виде светло-желтого кристаллического твердого вещества с двумя максимумами УФ-поглощения при $\lambda_{\max} = 254, 369$ нм, характерными для флавонол-агликона кверцетина. $^1\text{H-NMR}$ -спектр соединения **2** состоял из сигналов ароматических протонов Н-6 (6,20 (1H, д, $J = 2,0$ Гц)), Н-8 (6,41 (1H, д, $J = 2,0$ Гц)), Н-2' (7,68 (1H, д, $J = 2,1$ Гц)), Н-5' (6,89 (1H, д, $J = 8,4$ Гц)) и Н-6' (7,54 (1H, дд, $J = 8,4, 2,0$ Гц)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 3 (9,29 (1H, с)), 5 (12,49 (1H, с)), 7 (10,78 (1H, с)), 3' (9,34 (1H, с)) и 4' (9,57 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **2** является кверцетином.

Соединение **3** было выделено в виде белого кристаллического вещества с одним УФ-максимумом поглощения при $\lambda_{\max} = 287$ нм, что характерно для флаванонов. $^1\text{H-NMR}$ -спектр соединения **3** состоял из сигналов алифатических протонов Н-2 (5,38 (1H, дд, $J = 12,4; 2,9$ Гц)), Н-3а (3,18 (1H, дд, $J = 17,2; 12,4$ Гц)) и

H-3b (2,68 (1H, дд, J = 17,2; 2,9)); ароматических протонов H-6 (5,88 (1H, д, J = 2,1 Гц)), H-8 (5,89 (1H, д, J = 2,1 Гц)), H-2',5' (6,75 (2H, м)) и H-6' (6,88 (1H, м)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 5 (12,14 (1H, с)), 7 (10,77 (1H, с)), 3' (9,01 (1H, с)) и 4' (9,07 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **3** представляет собой эриодиктиол. Интересным в ¹H-ЯМР-спектре эриодиктиола является то, что сигналы H-2' и H-5' полностью перекрываются, а сигналы H-6 и H-8 сближены.

Соединение **4** было выделено в виде белого кристаллического вещества с одним УФ-максимумом поглощения при $\lambda_{\max} = 290$ нм, что характерно для флаванонов. ¹H-ЯМР-спектр соединения **4** состоит из сигналов алифатических протонов H-2 (4,90 (1H, д, J = 10,8 Гц)) и H-3 (4,41 (1H, д, J = 10,8 Гц)); ароматических протонов H-6 (5,58 (1H, д, J = 2,0 Гц)), H-8 (5,90 (1H, д, J = 2,0 Гц)), H-2',6' (6,40 (2H, с)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 5 (11,89 (1H, с)), 7 (10,82 (1H, с)), 3'+5' (8,88 (2H, с)) и 4' (8,20 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **4** представляет собой ампелопсин.

Соединение **5** было выделено в виде светло-желтого кристаллического твердого вещества с двумя максимумами УФ-поглощения при $\lambda_{\max} = 265, 347$ нм, характерными для 3-О-флавонолгликозидов кемпферола. ¹H-ЯМР-спектр соединения **5** состоял из сигналов протонов остатка β-D-глюкозы H-1'' (5,32 (1H, д, J = 7,4 Гц)), H-2''-6b'' (3,0–3,44 (5H, м)) и H-6b'' (3,69 (1H, д, J = 9,7 Гц)) и остатка α-L-рамнозы H-1''' (4,38 (1H, шир.с)), H-2'''-5''' (3,0–3,44 (4H, м)) и H-6''' (0,99 (3H, д, J = 6,2)). Дополнительно в спектре присутствовали ароматические протоны H-6 (6,21 (1H, д, J = 2,1 Гц)), H-8 (6,44 (1H, д, J = 2,1 Гц)), H-2',6' (7,99 (1H, д, J = 8,9 Гц)) и H-3',5' (6,88 (1H, д, J = 8,9 Гц)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 5 (12,56 (1H, с)), 7 (10,85 (1H, с)) и 4' (10,12 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **5** представляет собой кемпферол-3-О-рутинозид, или никотифлорин.

Соединение **6** выделено в виде светло-желтого кристаллического вещества с двумя максимумами УФ-поглощения при $\lambda_{\max} = 255, 352$ нм, характерными для 3-О-флавонолгликозидов кверцетина. ¹H-ЯМР-спектр соединения **6** состоял из сигналов протонов остатка β-D-глюкозы H-1'' (5,35 (1H, д, J = 7,2 Гц)), H-2''-6b'' (3,0–3,44 (5H, м)) и H-6b'' (3,71 (1H, д, J = 10,4 Гц)) и остатка α-L-рамнозы H-1''' (4,40 (1H, шир.с)), H-2'''-5''' (3,0–3,44 (4H, м)) и H-6''' (1,0 (3H, д, J = 6,1)). Дополнительно в спектре присутствовали ароматические протоны H-6 (6,20 (1H, д, J = 2,0 Гц)), H-8 (6,39 (1H, д, J = 2,0 Гц)), H-2' (7,54 (1H, м)), H-5' (6,86 (1H, г, J = 8,9 Гц)) и H-6' (7,55 (1H, м)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 5 (12,60 (1H, с)), 7 (10,83 (1H, с)), 3' (9,16 (1H, с)) и 4' (9,65 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **6** представляет собой кверцетин-3-О-рутинозид, или рутин.

Соединение **7** было выделено в виде белого кристаллического вещества с одним УФ-максимумом поглощения при $\lambda_{\max} = 283$ нм, что характерно для флаванонов. ¹H-ЯМР-спектр соединения **7** состоял из сигналов алифатических протонов H-2 (5,31 (1H, дд, J = 12,9; 2,6 Гц)), H-3a (2,98 (1H, дд, J = 17,3; 12,9 Гц)) и H-3b (2,68 (1H, дд, J = 17,3; 2,6)); протонов остатка β-D-глюкозы H-1'' (4,70 (1H, д, J = 6,9 Гц)), H-2''-6b'' (3,16–3,60 (5H, м)) и H-6a'' (3,74 (1H, д, J = 11,5 Гц)); ароматических протонов H-6 (6,09 (1H, д, J = 2,1 Гц)), H-8 (6,40 (1H, д, J = 2,1 Гц)), H-2',5' (6,74 (2H, м)) и H-6' (6,87 (1H, м)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 7 (10,77 (1H, с)), 3' (8,99 (1H, с)) и 4' (9,04 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **7** представляет собой эриодиктиол-5-О-β-D-глюкопиранозид. Интересно, что в ¹H-ЯМР-спектре эриодиктиол-5-О-β-D-глюкопиранозида сигналы H-2' и H-5' полностью перекрываются, а сигналы H-6 и H-8 больше не перекрываются, как в спектре эриодиктиола. Скорее всего, это связано с тем, что остаток глюкопиранозы в 5-м положении кольца А влияет на химические сдвиги ароматических протонов в H-6 и H-8.

Соединение **8** было выделено в виде белого кристаллического вещества с одним УФ-максимумом поглощения при $\lambda_{\max} = 286$ нм, что характерно для флаванонов. ¹H-ЯМР-спектр соединения **8** состоял из сигналов алифатических протонов H-2 (5,45 (1H, дд, J = 12,3; 2,9 Гц)), H-3a (3,20 (1H, м)) и H-3b (2,73 (1H, дд, J = 17,0; 2,9 Гц)); протонов остатка β-D-глюкозы H-1'' (4,71 (1H, д, J = 7,2 Гц)), H-2''-5'' (3,10–3,40 (4H, м)), H-6a'' (3,74 (1H, д, J = 11,5 Гц)) и H-6b'' (3,48 (1H, д, J = 12,0; 5,9 Гц)); ароматических протонов H-6 (5,89 (1H, д, J = 2,1 Гц)), H-8 (5,91 (1H, д, J = 2,1 Гц)), H-2' (6,97 (2H, д, J = 2,0 Гц)), H-5' (7,14 (1H, д, J = 8,4 Гц)) и H-6' (6,87 (1H, д, J = 8,4, 2,0)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 5 (12,12 (1H, с)), 7 (10,80 (1H, шир.с)) и 4' (8,72 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **8** представляет собой эриодиктиол-3'-О-β-D-глюкопиранозид. Интересно, что в ¹H-ЯМР-спектре эриодиктиол-3'-О-β-D-глюкопиранозида сигналы H-2' и H-5' больше не перекрываются, в то время как сигналы H-6 и H-8 снова почти перекрываются, как в эриодиктиоле. Скорее всего, это связано с тем, что остаток глюкопиранозы в 3'-положении кольца В влияет на химические сдвиги ароматических протонов в положениях 2', 5' и 6'.

Соединение **9** было выделено в виде бледно-желтого кристаллического вещества с двумя максимумами УФ-поглощения при $\lambda_{\max} = 265, 346$ нм, характерными для 3-О-флавонолгликозидов кемпферола. ¹H-ЯМР-спектр соединения **9** состоял из сигналов протонов остатка β-D-глюкозы H-1'' (5,45 (1H, д, J = 7,3 Гц)), H-2''-5'' (3,05–3,25 (4H, м)), H-6a'' (3,57 (1H, д, J = 11,5)) и H-6b'' (3,33 (1H, м)). Дополнительно в спектре присутствовали ароматические протоны H-6 (6,21 (1H, д, J = 2,0 Гц)), H-8 (6,44 (1H, д, J = 2,0 Гц)), H-2',6' (8,04

(1H, д, J = 8,9 Гц) и H-3',5' (6,89 (1H, д, J = 8,9 Гц)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 5 (12,62 (1H, с)), 7 (10,87 (1H, с)) и 4' (10,18 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **9** представляет собой кемпферол-3-O-β-D-глюкопиранозид, или астрагалин.

Соединение **10** было выделено в виде бледно-желтого кристаллического твердого вещества с двумя максимумами УФ-поглощения при $\lambda_{max} = 265, 347$ нм, которые характерны для 3-O-флавонолгликозидов кемпферола. ¹H-ЯМР-спектр соединения **10** состоял из сигналов протонов остатка β-D-глюкозы H-1'' (5,39 (1H, д, J = 7,4 Гц)), H-2''-5'' (3,05–3,35 (4H, м)), H-6a'' (4,15 (1H, д, J = 11,7 Гц)) и H-6b'' (3,91 (1H, dd, J = 11,7; 6,6)) вместе с сигналами от ацетильной группы (3,32 (3H, с)). Дополнительно в спектре присутствовали ароматические протоны H-6 (6,21 (1H, д, J = 2,0 Гц)), H-8 (6,44 (1H, д, J = 2,0 Гц)), H-2',6' (8,0 (1H, д, J = 8,9 Гц)) и H-3',5' (6,87 (1H, д, J = 8,9 Гц)) вместе с фенольными гидроксильными группами в положениях 5 (12,57 (1H, с)), 7 (10,86 (1H, с)) и 4' (10,17 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **10** представляет собой кемпферол-3-O-β-D-6''-O-ацетилглюкопиранозид, или 6''-O-ацетиластрагалин. Интерес в ¹H-ЯМР-спектре 6''-O-ацетиластрагалина представляет собой сдвиг в слабое поле сигналов от протонов H-6a'' и H-6b'' по сравнению с астрагалином. Это связано с наличием у ацетоксигруппы большей электроотрицательности по сравнению с гидроксильной группой.

Соединение **11** было выделено в виде желтого кристаллического твердого вещества с одним УФ-максимумом поглощения при $\lambda_{max} = 326$ нм, что характерно для оксикоричных кислот. ¹H-ЯМР-спектр соединения **11** состоял из сигналов ароматических протонов H-2 (7,05 (1H, д, J = 1,8)), H-5 (6,77 (1H, д, J = 8,2)) и H-6 (7,01 (1H, д, J = 8,2, 1,8)) вместе с сигналами олефиновых протонов H-β (6,26 (1H, д, J = 15,8 Гц)) и H-α (7,50 (1H, д, J = 15,8 Гц)). Дополнительно в спектре присутствовали фенольные гидроксигруппы в положениях 3 (9,14 (1H, с)) и 4 (9,59 (1H, с)). Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что соединение **11** представляет собой кофейную кислоту.

При построении зависимостей RAP от концентрации исследуемые соединения были разделены на три группы (рисунки 2–4). В первую группу вошли кемпферол (**1**), кверцетин (**2**), эриодиктиол (**3**), для них RAP в максимальной концентрации составлял более 90 % (рисунок 2); во вторую – ампелопсин (**4**), никотифлорин (**5**), рутин (**6**), эриодиктиол-5-O-β-D-глюкопиранозид (**7**), кофейная кислота (**11**), для них RAP составлял от 80 до 90 % (рисунок 3); в третью группу – эриодиктиол-3'-O-β-D-глюкопиранозид (**8**), астрагалин (**9**), 6''-ацетиластрагалин (**10**), для них RAP был менее 80 % (рисунок 4).

Наблюдалась типичная S-образная зависимость RAP от концентрации кемпферола (**1**), кверцетина (**2**), эриодиктиола (**3**), рутина (**6**) и кофейной кислоты (**11**) с тремя характерными участками на кривой: плато

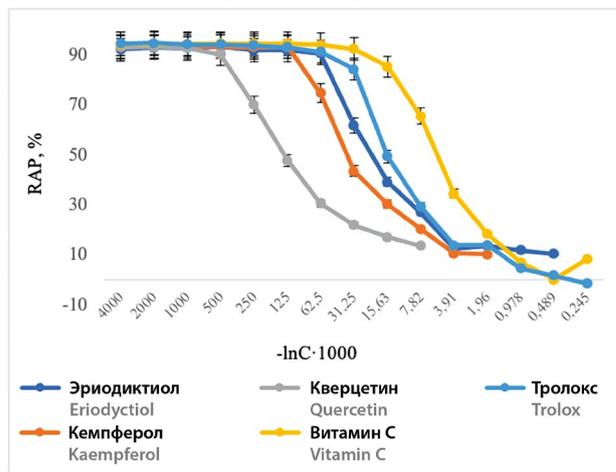


Рисунок 2. Зависимость RAP от концентрации кемпферола (1), кверцетина (2), эриодиктиола (3), витамина С и тролокса

Figure 2. Dependence of RAP from the concentration of kaempferol (1), quercetin (2), eriodictiols (3), vitamin C and Trolox

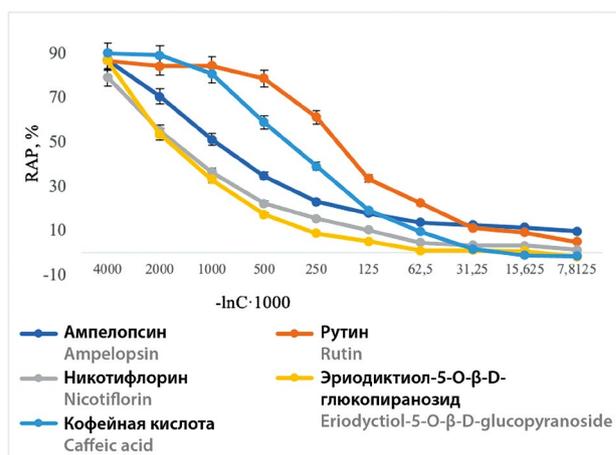


Рисунок 3. Зависимость RAP от концентрации ампелопсина (4), никотифлорина (5), рутина (6), эриодиктиол-5-O-β-D-глюкопиранозид (7) и кофейной кислоты (11)

Figure 3. Dependence of RAP from concentration of ampelopsin (4), nicotiflorin (5), rutin (6), eriodictiols-5-O-β-D-glucopyranoside (7) and caffeic acid (11)

максимума значения RAP (281.25–18.000 μмоль/л), резкое снижение RAP (35.156–1,125.0 μмоль/л) и плато минимальных значений RAP (2.1972–140.63 μмоль/л). Аналогичные зависимости отмечены для препаратов сравнения – витамина С и тролокса (три секции: 140.63–18.000 и 281.85–18.000; 17.578–70.313 и 35.156–140.63; 2.1973–8.7890 и 1.0986–17.578 μмоль/л соответственно).

Иной характер зависимости отмечен для ампелопсина (**4**), никотифлорина (**5**) и эриодиктиол-5-O-β-D-глюкопиранозид (**7**): снижение RAP при уменьшении концентрации (562.50–18.000 μмоль/л) с формированием плато минимальных значений RAP (35.156–281.25 μмоль/л).

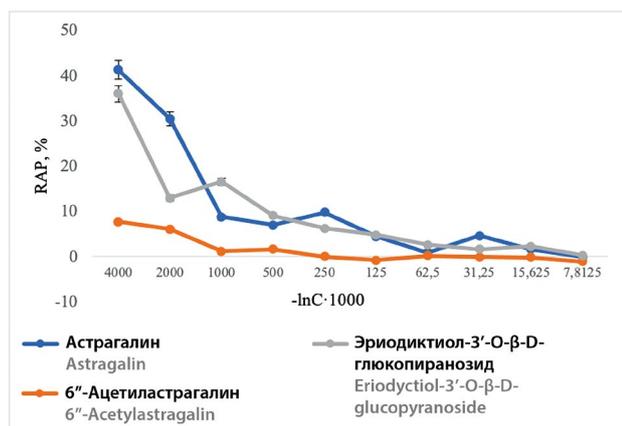


Рисунок 4. Зависимость RAP от концентрации эриодиктиол-3'-О-β-D-глюкопиранозида (8), астрагалина (9) и 6''-ацетиластрагалина (10)

Figure 4. Dependence of RAP from concentration of eriodyctiol-3'-O-β-D-glucopyranoside (8), astragaline (9) and 6''-acetylastragaline (10)

Отмечена слабая зависимость RAP от концентрации эриодиктиол-3'-О-β-D-глюкопиранозида (8), астрагалина (9), 6''-ацетиластрагалина (10) со стохастическими изменениями RAP в исследуемом диапазоне концентраций.

Для сравнения антиоксидантной активности тестируемых соединений друг с другом и с препаратами сравнения в таблице 1 приведены максимальные значения RAP и рассчитанные полуэффективные концентрации.

Максимальные значения RAP эриодиктиола (3), кемпферола (1) и кверцетина (2) достоверно ($p = 0,585$) не отличались от таковых у препаратов сравнения: витамина С и тролокса, что указывает на сравнимость антиоксидантного действия этих трех соединений с известными антиоксидантами. Однако полуэффективные концентрации этих веществ в два и более раза ниже ($p = 2,56 \cdot 10^{-4}$) по сравнению с витамином С, т. е. для того же антиоксидантного действия необходимо принимать изолированных веществ в два и более раза больше, чем витамина С; полуэффективная концентрация эриодиктиола (3) не отличалась от тролокса ($p = 0,273$).

При сравнении выделенных соединений по максимальным значениям RAP было установлено, что эриодиктиол (3), кемпферол (1), кверцетин (2) и кофейная кислота (11) практически не отличались друг от друга по этому показателю ($p = 0,348$), остальные вещества имели значительно ($p = 3,45 \cdot 10^{-6}$) более низкие значения RAP. При сравнении полуэффективных концентраций для эриодиктиола (3) отмечено наименьшее значение, остальные вещества имели значение EC_{50} в два и более раза больше ($p = 2,44 \cdot 10^{-5}$), поэтому среди выделенных соединений эриодиктиол (3) характеризуется наивысшей антиоксидантной активностью.

Таблица 1. Максимальные значения RAP (E_{max} , %) и полуэффективные концентрации (EC_{50} , μмоль/л) исследуемых соединений и препаратов сравнения

Table 1. Maximum RAP values (E_{max} , %) and semi-effective concentrations (EC_{50} , μmol/l) of the test compounds and comparator preparations

Наименование Substances name	E_{max} , %	EC_{50} , μмоль/л EC_{50} , μmol/l
Эриодиктиол (3) Eriodyctiol (3)	92,1 ± 1,2	145,0 ± 7,8
Кемпферол (1) Kaempferol (1)	93,2 ± 3,3	281,5 ± 10,2
Кверцетин (2) Quercetin (2)	93,0 ± 1,9	1050 ± 23
Рутин (6) Rutin (6)	86,7 ± 2,1	398,2 ± 12,1
Кофейная кислота (11) Caffeic acid (11)	90,0 ± 1,7	2290 ± 19
Ампелопсин (4) Ampelopsin (4)	87,1 ± 1,1	4300 ± 38
Никотифлорин (5) Nicotiflorin (5)	79,2 ± 2,2	3450 ± 49
Эриодиктиол-5-О-β-D-глюкопиранозид Eriodyctiol-5-O-β-D-glucopyranoside	86,6 ± 2,1	6490 ± 37
Астрагалин (9) Astragaline (9)	41,3 ± 1,1	7660 ± 43
Эриодиктиол-3'-О-β-D-глюкопиранозид (8) Eriodyctiol-3'-O-β-D-glucopyranoside (8)	36,0 ± 2,0	7750 ± 98
6''-Ацетиластрагалин (10) 6''-Acetylastragaline (10)	7,8 ± 1,0	7170 ± 104
Витамин С Vitamic C	94,3 ± 2,5	78,45 ± 8,9
Тролокс Trolox	94,5 ± 3,1	148,4 ± 7,9

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования из надземной части *I. grandulifera* выделено и установлено структура 11 индивидуальных соединений полифенольной природы. По результатам исследования эриодиктиол (3), кемпферол (1) и кверцетин (2) проявляли наиболее выраженную антиоксидантную активность, достоверно не отличающуюся от таковой у препаратов сравнения – витамина С и тролокса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Szweczyk K., Kalembe D., Komsta L., Nowak R. Comparison of the essential oil composition of selected *Impatiens* species and its antioxidant activities. *Molecules*. 2016;21(9):1162.
2. Richard P. S. S., Karuppusamy S., Ravichandran V. *Impatiens godfreyi* (Balsaminaceae), a new species of Balsam from the southern Western Ghats, India. *Journal of Asia-Pacific Diversity*. 2022;15(1):138–144.
3. Song Y., Peng S., Cong Y., Zheng Y. *Impatiens rapiformis*, a new species of *Impatiens* with root tuber from Yunnan, China. *Nordic Journal of Botany*. 2021;39(5):e03151.
4. De O Pires E. Jr., Pereira E., Pereira C., Dias M. I., Calheta R. C., Ćirić A., Soković M., Hassemmer G., Garcia C. C., Caleja C., Barros L., Ferreira I. C. F. R. Chemical Composition and Bioactive Characterisation of *Impatiens walleriana*. *Molecules*. 2021;26(5):1347. DOI: 10.3390/molecules26051347.

- De O Pires E. Jr., Pereira E., Carochi M., Pereira C., Dias M. I., Calhelha R. C., Ćirić A., Soković M., Garcia C. C., Ferreira I. C. F. R., Caleja C., Barros L. Study on the potential application of *Impatiens balsamina* L. flowers extract as a natural colouring ingredient in a pastry product. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(17):9062. DOI: 10.3390/ijerph18179062.
- Coakley S., Petti C. Impacts of the invasive *Impatiens glandulifera*: Lessons learned from one of Europe's top invasive species. *Biology*. 2021;10(7):619. DOI: 10.3390/biology10070619.
- Qian H., Wang B., Ma J., Li C., Zhang Q., Zhao Y. *Impatiens balsamina*: An updated review on the ethnobotanical uses, phytochemistry, and pharmacological activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2023;303:115956. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115956.
- Szewczyk K. Phytochemistry of the genus *Impatiens* (Balsaminaceae): A review. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2018;80:94–121.
- Helmisaari H. NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Impatiens glandulifera*. – From: Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS. Available at: www.nobanis.org.
- Ahmad K. S., Hamid A., Nawaz F., Hameed M., Ahmad F., Deng J., Akhtar N., Wazarat A., Mahroof S. Ethnopharmacological studies of indigenous plants in Kel village, Neelum Valley, Azad Kashmir, Pakistan. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2017;13(1):1–16. DOI: 10.1186/s13002-017-0196-1.
- Thaler K., Kaminski A., Chapman A., Langley T., Gartlehner G. Bach flower remedies for psychological problems and pain: a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2009;9:16. DOI: 10.1186/1472-6882-9-16.
- Dos Santos Szewczyk K., Zidorn C., Biernasiuk A., Komsta L., Granica S. Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products*. 2016;86:262–272. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.03.053.
- Vieira M. N., Winterhalter P., Jerz G. Flavonoids from the flowers of *Impatiens glandulifera* Royle isolated by high performance countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2016;27(2):116–125. DOI: 10.1002/PCA.2606.
- Triska J., Vrchotová N., Sýkora J., Moos M. Separation and Identification of 1,2,4-Trihydroxynaphthalene-1-O-glucoside in *Impatiens glandulifera* Royle. *Molecules*. 2013;18(7):8429–8439. DOI: 10.3390/molecules18078429.
- Ruckli R., Hesse K., Glauser G., Rusterholz H.-P., Baur B. Inhibitory potential of naphthoquinones leached from leaves and exuded from roots of the invasive plant *Impatiens glandulifera*. *Journal of Chemical Ecology*. 2014;40:371–378. DOI: 10.1007/s10886-014-0421-5.
- Dos Santos Szewczyk K., Bonikowski R., Agnieszka M.-K., Abramek J., Bogucka-Kocka A. Lipophilic components and evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of *Impatiens glandulifera* Royle and *Impatiens noli-tangere* L. (Balsaminaceae). *Grass and Acetes*. 2018;69(3):e270. DOI: 10.3989/gya.0234181.
- Куклина А. Г., Цыбулько Н. С. Характеристика некоторых видов *Impatiens* (Balsaminaceae) по содержанию флавоноидов и аскорбиновой кислоты. *Химия растительного сырья*. 2022;2:211–219. DOI: 10.14258/jcprm.2022029682.
- Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Новикова В. В., Безверхняя Е. А. Противомикробная активность соединений полифенольной природы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):65–72. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-65-72.
- Богутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбарян С. П., Повыдыш М. Н. Выделение формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозиды из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):14–19. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19.
- Whaley A. K., Minakov D. N., Orlova A. A., Ponkratova A. O., Fock E., Rukoyatkina N., Gambaryan S., Luzhanin V. G. Analysis of *Empetrum nigrum* L. lipophilic secondary metabolites, their metabolomic profiles and antioxidant activity. *Journal of Essential Oil Research*. 2023;35(3):310–323. DOI: 10.1080/10412905.2023.2169377.
- Song Y., Peng S., Cong Y., Zheng Y. *Impatiens rapiformis*, a new species of *Impatiens* with root tuber from Yunnan, China. *Nordic Journal of Botany*. 2021;39(5):e03151.
- De O Pires E. Jr., Pereira E., Pereira C., Dias M. I., Calhelha R. C., Ćirić A., Soković M., Hassemer G., Garcia C. C., Caleja C., Barros L., Ferreira I. C. F. R. Chemical Composition and Bioactive Characterisation of *Impatiens walleriana*. *Molecules*. 2021;26(5):1347. DOI: 10.3390/molecules26051347.
- De O Pires E. Jr., Pereira E., Carochi M., Pereira C., Dias M. I., Calhelha R. C., Ćirić A., Soković M., Garcia C. C., Ferreira I. C. F. R., Caleja C., Barros L. Study on the potential application of *Impatiens balsamina* L. flowers extract as a natural colouring ingredient in a pastry product. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(17):9062. DOI: 10.3390/ijerph18179062.
- Coakley S., Petti C. Impacts of the invasive *Impatiens glandulifera*: Lessons learned from one of Europe's top invasive species. *Biology*. 2021;10(7):619. DOI: 10.3390/biology10070619.
- Qian H., Wang B., Ma J., Li C., Zhang Q., Zhao Y. *Impatiens balsamina*: An updated review on the ethnobotanical uses, phytochemistry, and pharmacological activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2023;303:115956. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115956.
- Szewczyk K. Phytochemistry of the genus *Impatiens* (Balsaminaceae): A review. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2018;80:94–121.
- Helmisaari H. NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Impatiens glandulifera*. – From: Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS. Available at: www.nobanis.org.
- Ahmad K. S., Hamid A., Nawaz F., Hameed M., Ahmad F., Deng J., Akhtar N., Wazarat A., Mahroof S. Ethnopharmacological studies of indigenous plants in Kel village, Neelum Valley, Azad Kashmir, Pakistan. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2017;13(1):1–16. DOI: 10.1186/s13002-017-0196-1.
- Thaler K., Kaminski A., Chapman A., Langley T., Gartlehner G. Bach flower remedies for psychological problems and pain: a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2009;9:16. DOI: 10.1186/1472-6882-9-16.
- Dos Santos Szewczyk K., Zidorn C., Biernasiuk A., Komsta L., Granica S. Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products*. 2016;86:262–272. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.03.053.
- Vieira M. N., Winterhalter P., Jerz G. Flavonoids from the flowers of *Impatiens glandulifera* Royle isolated by high performance countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2016;27(2):116–125. DOI: 10.1002/PCA.2606.
- Triska J., Vrchotová N., Sýkora J., Moos M. Separation and Identification of 1,2,4-Trihydroxynaphthalene-1-O-glucoside in *Impatiens glandulifera* Royle. *Molecules*. 2013;18(7):8429–8439. DOI: 10.3390/molecules18078429.
- Ruckli R., Hesse K., Glauser G., Rusterholz H.-P., Baur B. Inhibitory potential of naphthoquinones leached from leaves and exuded from roots of the invasive plant *Impatiens glandulifera*. *Journal of Chemical Ecology*. 2014;40:371–378. DOI: 10.1007/s10886-014-0421-5.
- Dos Santos Szewczyk K., Bonikowski R., Agnieszka M.-K., Abramek J., Bogucka-Kocka A. Lipophilic components and evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of *Impatiens glandulifera* Royle and *Impatiens noli-tangere* L. (Balsaminaceae). *Grass and Acetes*. 2018;69(3):e270. DOI: 10.3989/gya.0234181.
- Kuklina A. G., Tsybulko N. S. Characteristics of some *Impatiens* (Balsaminaceae) species by the content of flavonoids and ascorbic acid. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2022;2:211–219. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2022029682.
- Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Novikova V. V., Bezverkhniaia E. A. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds. *Drug development & registration*. 2022;11(2):65–72. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-65-72.
- Bogutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharo M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullaeva D. Kh., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydysh M. N. Isolation of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and the assessment of its effect on induced platelet activation. *Drug development & registration*. 2021;10(4-1):14–19. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19.
- Whaley A. K., Minakov D. N., Orlova A. A., Ponkratova A. O., Fock E., Rukoyatkina N., Gambaryan S., Luzhanin V. G. Analysis of *Empetrum nigrum* L. lipophilic secondary metabolites, their metabolomic profiles and antioxidant activity. *Journal of Essential Oil Research*. 2023;35(3):310–323. DOI: 10.1080/10412905.2023.2169377.

REFERENCES

- Szewczyk K., Kalembe D., Komsta L., Nowak R. Comparison of the essential oil composition of selected *Impatiens* species and its antioxidant activities. *Molecules*. 2016;21(9):1162.
- Richard P. S. S., Karuppusamy S., Ravichandran V. *Impatiens godfreyi* (Balsaminaceae), a new species of Balsam from the southern Western Ghats, India. *Journal of Asia-Pacific Diversity*. 2022;15(1):138–144.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1584>
УДК 615.21



Оригинальная статья / Research article

Нейропротекторная активность 5-этокси-2-этилтиобензимидазола (этомерзола) и 2-этилтиобензимидазола (бемитила) на модели окклюзии среднемозговой артерии

Е. Ю. Заварина, Е. К. Красова, И. А. Титович✉, А. Н. Кимаев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министрства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Титович Ирина Александровна. E-mail: irina.titovich@pharminnotech.com

ORCID: Е. Ю. Заварина – <https://orcid.org/0000-0003-4448-3270>; Е. К. Красова – <https://orcid.org/0000-0001-7785-4256>;
И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; А. Н. Кимаев – <https://orcid.org/0000-0003-4899-5548>.

Статья поступила: 14.07.2023

Статья принята в печать: 11.10.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) являются одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем, обусловленной высоким показателем смертности и инвалидности. Ведущей причиной развития ЦВЗ является инсульт. Ежегодно в мире регистрируется около 15 миллионов инсультов, по данным Всемирной федерации неврологических сообществ. Стоит отметить, что у ЦВЗ ишемического генеза есть тенденция к омоложению и росту. В связи с ростом заболеваемости ЦВЗ остро стоит вопрос о поиске перспективных нейропротекторов.

Цель. Изучить нейропротекторную активность 5-этокси-2-этилтиобензимидазола (этомерзола) и 2-этилтиобензимидазола (бемитила) на модели окклюзии среднемозговой артерии.

Материалы и методы. В качестве модели использовалась окклюзия средней мозговой артерии (ОСМА). Объект исследования – инбредные крысы-самцы линии Dark Agouti, рандомизированные на пять групп: группу интактных животных и четыре группы с ОСМА: группу контроля, группу с введением 5-этокси-2-этилтиобензимидазола (этомерзола, 25 мг/кг), группу с введением 2-этилтиобензимидазола (бемитила, 25 мг/кг) и группу с препаратом сравнения – диметилфумаратом (ДМФ, 100 мг/кг). На 1, 3 и 7-е сутки после операции проводили тест «Стимулирование конечностей» (СК). На 7-е сутки проводили тесты «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Эвтаназию осуществляли на 7-е сутки в индукционной камере (Bioscapse GmbH, CO₂-бокс для эвтаназии, Германия).

Результаты и обсуждение. Исследование показало выраженный фармакологический эффект этомерзола в модели острого ишемического инсульта. Введение бемитила, этомерзола и ДМФ достоверно снижало неврологический дефицит через 24 часа после ОСМА и улучшало психофункциональное состояние на 7-е сутки. Так, в группе этомерзола на первые сутки после операции неврологический дефицит был снижен в 1,9 раз ($p < 0,05$), а на третьи в 2,0 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. В то время как бемитил и ДМФ снижали показатель в 1,3 ($p < 0,05$) и 1,4 раза ($p < 0,05$) на третьи сутки и в 1,5 раза ($p < 0,05$) на 7-е сутки. В тесте ОП в группе этомерзола наблюдалось увеличение ГДА в 2,7 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Показатель заглядываний в норки в группах этомерзола и бемитила был выше, чем у контрольной группы, в 2,6 ($p < 0,05$) и 3,4 раза ($p < 0,05$) соответственно. Поисково-исследовательская активность была повышена в этих же группах в 2,0 ($p < 0,05$) и 2,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными. В тесте ПКЛ у групп этомерзола и ДМФ наблюдалось увеличение числа стоек в рукавах по сравнению с контрольной группой в 2,7 ($p < 0,05$) и 3,8 раза ($p < 0,05$) соответственно. В группах этомерзола и бемитила отмечалось увеличение количества свешиваний в 3,4 ($p < 0,05$) и 6,2 раза ($p < 0,05$).

Заключение. Данные, полученные в ходе исследования активности бензимидазолов после ишемического инсульта, свидетельствуют о достоверном повышении двигательной активности животных в тестах ОП, что может говорить о психостимулирующем и потенциальном ноотропном эффекте этомерзола и бемитила, а увеличение количества стоек и свешиваний в тесте ПКЛ может быть расценено как проявление анксиолитической активности. В нашем исследовании выраженность фармакологических эффектов ДМФ уступала бензимидазолам. Однако достоверное снижение неврологического дефицита в тесте СК и повышение количества стоек в рукавах в ПКЛ могут свидетельствовать о наличии у препарата анксиолитической активности. Полученные результаты подчеркивают важность проведения дополнительных исследований по оценке эффективности ДМФ при ОСМА.

Ключевые слова: инсульт, бемитил, этомерзол, диметилфумарат, нейропротекторы

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

Вклад авторов. Е. Ю. Заварина проводила сбор и систематизацию материала, работала с табличным материалом, участвовала в написании текста. Е. К. Красова осуществляла сбор данных из литературных источников, проводила сбор и анализ полученных данных, отвечала за написание и редактирование текста статьи, оформление текста статьи. И. А. Титович и А. Н. Кимаев отвечали за концепцию и дизайн исследования, редактирование текста статьи, научное консультирование и утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

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

Для цитирования: Заварина Е. Ю., Красова Е. К., Титович И. А., Кимаев А. Н. Нейропротекторная активность 5-этокси-2-этилтиобензимидазола (этомерзола) и 2-этилтиобензимидазола (бемитила) на модели окклюзии среднемозговой артерии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):231–238. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1584>

© Заварина Е. Ю., Красова Е. К., Титович И. А., Кимаев А. Н., 2023

© Zavarina E. Yu., Krasova E. K., Titovich I. A., Kimaev A. N., 2023

Neuroprotective Activity of 5-ethoxy-2-ethylthiobenzimidazole (Etomerzol) and 2-ethylthiobenzimidazole (Bemtil) in a Model of Middle Cerebral Artery Occlusion

Ekaterina Yu. Zavarina, Elena K. Krasova, Irina A. Titovich ✉, Aleksandr N. Kimaev

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

✉ **Corresponding author:** Irina A. Titovich. E-mail: irina.titovich@pharminnotech.com

ORCID: Ekaterina Yu. Zavarina – <https://orcid.org/0000-0003-4448-3270>; Elena K. Krasova – <https://orcid.org/0000-0001-7785-4256>; Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Aleksandr N. Kimaev – <https://orcid.org/0000-0003-4899-5548>.

Received: 14.07.2023

Revised: 11.10.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Cerebrovascular diseases (CVD) are one of the most pressing medical and social problems due to the high rate of mortality and disability. Stroke is the leading cause of CVD. About 15 million strokes are registered annually in the world according to the World Federation of Neurological Societies. It should be noted that CVD of ischemic origin has a tendency to rejuvenation and growth. Traditionally, in clinical practice, antihypoxic, antioxidant agents, as well as drugs with neuroprotective and neurorehabilitation effects are used to treat CVD. In connection with the increase in the incidence of CVD, there is an urgent need to search for promising neuroprotectors.

Aim. To study the neuroprotective activity of 5-ethoxy-2-ethylthiobenzimidazole (etomerzol) and 2-ethylthiobenzimidazole (bemtil) in a model of middle cerebral artery occlusion.

Materials and methods. Occlusion of the middle cerebral artery (OMCA) was used as a model. The object of the study was inbred male rats of the Dark Agouti line, randomized into five groups: a group of intact animals and four groups with OSMA: a control group, a group with the introduction of 5-ethoxy-2-ethylthiobenzimidazole (etomerzole, 25 mg/kg), a group with the introduction 2-ethylthiobenzimidazole (bemtil, 25 mg/kg) and a group with the reference drug dimethyl fumarate (DMF, 100 mg/kg). On the 1st, 3rd, and 7th days after the operation, the "Limb Stimulation" (SC) test was performed. On the 7th day, the tests "Open field" (OP) and "Elevated plus maze" (EPM) were performed. Euthanasia was performed on the 7th day in an induction chamber (Bioscape GmbH, CO₂ box for euthanasia, Germany).

Results and discussion. The study showed a pronounced pharmacological effect of etomerzole in a model of acute ischemic stroke. The introduction of bemtil, etomerzol and DMF significantly reduced the neurological deficit 24 hours after OSMA and improved the psycho-functional state on the 7th day. Thus, in the etomerzol group on the first day after surgery, the neurological deficit was reduced by 1.9 times ($p < 0.05$), and by 3 and 2.0 times ($p < 0.05$) compared with the control group. While bemtil and DMF reduced the index by 1.3 ($p < 0.05$) and 1.4 times ($p < 0.05$) on the 3rd day and by 1.5 times ($p < 0.05$) on the 7th day. In the OP test in the etomerzol group, an increase in HDA by 2.7 times ($p < 0.05$) was observed compared with the control. The rate of peering into minks in the etomerzol and bemtil groups was higher than in the control group by 2.6 ($p < 0.05$) and 3.4 times ($p < 0.05$), respectively. Search and research activity was increased in the same groups by 2.0 ($p < 0.05$) and 2.2 times ($p < 0.05$) compared to control animals. In the PCL test, the etomerzol and DMF groups showed an increase in the number of uprights in the sleeves compared to the control group by 2.7 ($p < 0.05$) and 3.8 times ($p < 0.05$), respectively. In the etomerzol and bemtil groups, there was an increase in the number of overhangs by 3.4 ($p < 0.05$) and 6.2 times ($p < 0.05$).

Conclusion. The data obtained during the study of the activity of benzimidazoles after ischemic stroke indicate a significant increase in the motor activity of animals in the OP tests, which may indicate a psychostimulating and potential nootropic effect of etomerzole and bemtil, and an increase in the number of racks and hangings in the PCL test can be regarded as manifestation of anxiolytic activity. In our study, the severity of the pharmacological effects of DMF was inferior to benzimidazoles. However, a significant decrease in neurological deficit in the SC test and an increase in the number of uprights in the sleeves in the PCL may indicate the presence of anxiolytic activity in the drug. The results obtained underline the importance of conducting additional studies to evaluate the effectiveness of DMF in OSMA.

Keywords: ischemic stroke, bemtil, etomerzole, dimethyl fumarate, neuroprotectors

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

Contribution of the authors. Ekaterina Yu. Zavarina collected and systematized the material, worked with tabular material, and participated in writing the text. Elena K. Krasova collected data from literary sources, collected and analyzed the data obtained, was responsible for writing and editing the text of the article, and the design of the text of the article. Irina A. Titovich and Aleksandr N. Kimaev were responsible for the concept and design of the study, editing the text of the article, scientific advice and approval of the final version of the article for publication.

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: Zavarina E. Yu., Krasova E. K., Titovich I. A., Kimaev A. N. Neuroprotective activity of 5-ethoxy-2-ethylthiobenzimidazole (etomerzol) and 2-ethylthiobenzimidazole (bemtil) in a model of middle cerebral artery occlusion. *Drug development & registration*. 2023;12(4):231–238. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1584>

ВВЕДЕНИЕ

Инсульт – одна из ведущих причин смертности и инвалидности во всем мире. По данным Ассоциации американских кардиологов, 85 % инсультов опосредовано ишемией головного мозга, а 15 % – кровоизлиянием в мозг [1]. По экспертным оценкам

Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), инсульт занимает второе место в мире среди причин смертности [2]. В России зарегистрировано более 1 миллиона граждан после перенесенного инсульта, из них 80 % в дальнейшем признаны инвалидами [3].

Церебральная ишемия, вызванная окклюзией церебральных артерий, приводит к недостатку кровоснабжения и, следовательно, к меньшему поступлению глюкозы и кислорода в клетки головного мозга, что запускает патофизиологические состояния, включая усиление окислительного стресса, воспаления, эксайтотоксичности и кульминации в гибели нервных клеток [4–6].

Среди фармакологических средств, используемых для нейропротекции и улучшения восстановления неврологических функций, традиционно обсуждаемыми являются органопрепараты, антигипоксантами и ноотропы [7–9]. Перспективным представляется использование препаратов класса синтетических адаптогенов, обладающих антигипоксической, антиоксидантной и антиаггенической активностью [10–13]. Однако прямого сравнения нейропротекторной эффективности этих препаратов на модели окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) не проводилось.

Цель работы. Изучить нейропротекторный эффект синтетических адаптогенов – 5-этокси-2-этилтиобензимидазола (этомерзол) и 2-этилтиобензимидазола (бемитил) на модели ОСМА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были 5-этокси-2-этилтиобензимидазол (этомерзол) и 2-этилтиобензимидазол (бемитил), ресинтезированные на кафедре органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ. Препаратом сравнения был выбран диметилфумарат (ДМФ), продемонстрировавший в эксперименте способность уменьшать выраженность повреждения мозга при ишемическом поражении [14–16].

Исследование выполнено с соблюдением принципов Европейской конвенции¹, Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС² и Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Правила надлежащей лабораторной практики ЕАЭС в сфере обращения лекарственных средств».

Эксперимент проводили на 50 инбредных крысах-самцах линии Dark Agouti в возрасте 8–12 недель, массой 200–220 г, полученных из вивария ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Животные содержались по 5 особей в вентилируемых клетках RairisoSystem (Bioscarpe GmbH, Германия) при температуре воздуха 20–22 °С, относительной влажности 40–60 %, световом режиме 12:12 с включением света в 8⁰⁰. Крысы получали *ad libitum* корм «Полнораационный комбикорм для лабораторных животных» (ООО «Лабораторкорм», Россия) и воду, соответствующую требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая».

¹ Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986 г.).

² Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Непосредственно перед началом исследования животные были рандомизированы методом случайных чисел на 5 групп ($n = 10$): группа 1 – интактные животные, группы 2–5 были прооперированы по методике E. Z. Longa et al. [17]. Контрольной группе 2 вводили изотонический р-р натрия хлорида в эквивалентных количествах, группа 3 получала бемитил в дозе 25 мг/кг, группа 4 получала этомерзол в дозе 25 мг/кг, группа 5 получала диметилфумарат в дозе 100 мг/кг. Выбор доз был основан на литературных данных [18–20].

Крыс наркотизировали комбинацией: золетил (25 + 25 мг/кг, Virbac, Франция) и ксилазин (3 мг/кг, Interchemie werken "De Adelaar" BV, Нидерланды). Выполняли срединный разрез в области шеи и выделяли правую общую сонную артерию (ОСА), внешнюю сонную артерию (ВНСА) и внутреннюю сонную артерию (ВСА). Накладывали лигатуру на ВСА и микрососудистую клипсу на ОСА, после чего перерезали ВНСА дистальнее наложения нити. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0,25 мм, покрытую силиконом, вводили через культю ВНСА во ВСА на глубину 19–20 мм [до перекрытия средней мозговой артерии (СМА)] и фиксировали клипсой. Перекрытие кровотока сохранялось в течение 45 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне СМА. После извлечения нити культю ВНСА закрывали коагуляцией электрокаутером до полной герметичности, после чего операционную рану ушивали и обрабатывали 5%-м раствором бриллиантового зеленого. Исследуемые вещества вводили внутривентриально спустя час после операции и далее 1 раз в сутки в течение 7 дней.

Исследование проводили в соответствии со схемой, изображенной в таблице 1.

На 1, 3 и 7-е сутки после операции у крыс оценивали выраженность неврологического дефицита с помощью теста «Стимулирование конечностей». Тест предполагает балльную оценку ответа передних и задних коллатеральных конечностей на тактильную и проприоцептивную стимуляцию в 7 последовательных испытаниях [21].

На 7-е сутки после операции проводили тесты «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Тест ОП является классической моделью, используемой для определения уровня стресса, вызванного открытым пространством и ярким освещением, что способствует выявлению особенностей высшей нервной деятельности животных в норме и при действии различных экстремальных факторов.

В тесте ОП передвижение животных осуществлялось в установке (ООО «НПК Открытая наука», Россия) с видеофиксацией в течение 3 минут. Интенсивность освещения составляла 250 ± 15 Лк. По результатам теста оценивали горизонтальную двигательную активность (ГДА) (количество заходов на периферию

Таблица 1. Схема эксперимента

Table 1. Experimental schedule

День 0 Day 0	День 1 Day 1	День 2 Day 2	День 3 Day 3	День 4 Day 4	День 5 Day 5	День 6 Day 6	День 7 Day 7
Утро Моделирование ишемического инсульта с помощью МСАО по методике Longa. 1 час после операции – введение ЛС Morning Modeling of ischemic stroke using MCAO according to the Longa method. 1 hour after surgery – drug administration	Тест СК. Введение ЛС LPT. Drug administration	Введение ЛС Drug administration	Тест СК. Введение ЛС LPT. Drug administration	Введение ЛС Drug administration	Введение ЛС Drug administration	Введение ЛС Drug administration	Тест СК. Тесты ОП, ПКЛ LPT. OF EPM

Примечание. ЛС – лекарственные средства; СК – «Стимулирование конечностей»; ОП – «Открытое поле»; ПКЛ – «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Note. LPT – Limb Placing test; OF – Open Field; EPM – Elevated Plus Maze.

арены; на 2/3 арены; в центре арены), вертикальную двигательную активность [количество стоек с упором в стенку, количество стоек на весу (без упора в стенку)], груминг, количество заглядываний в норки, поисково-исследовательскую активность (сумма вертикальных перемещений и заглядываний), общую двигательную активность (ОДА – сумма показателей горизонтальных, вертикальных перемещений, заглядываний в норки) [22].

Тест ПКЛ позволяет оценить тревожность животного по количеству входов в открытые и закрытые рукава. Нахождение животных в закрытых рукавах и снижение количества перемещений показывают низкий уровень тревожности и могут расцениваться как скрытая эмоциональная напряженность (состояние, близкое к естественному).

В тесте ПКЛ проводили видеофиксацию передвижений животных в установке (ООО «НПК Открытая наука», Россия) в течение 3 минут, после чего определяли (в ручном режиме) время нахождения в открытых рукавах (ОР), в закрытых рукавах (ЗР) и в центре, количество заходов в ОР и ЗР, количество стоек, грумингов, выглядываний из ЗР и свисаний с ОР, ОДА [23].

Эвтаназию осуществляли на 7-е сутки в индукционной камере (Bioscare GmbH, CO₂-бокс для эвтаназии, Германия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью комплекта программного обеспечения GraphPad Prism 8.2.0. (GraphPad Software, США). Нормальность распределения количественных признаков проверяли с помощью W-критерия Шапиро – Уилка (все данные имели нормальное распределение). Значимость различий оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с post-hoc-тестом по Даннетту. Числовые данные приведены в таблицах как среднее арифметических

(*M*) ± ошибка среднего (*m*). В тесте СК данные представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль). Результаты тестов СК, ОП, ПКЛ имеют 95 % доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 1-е сутки после проведения операции в тесте СК наблюдали выраженный неврологический дефицит [в 2,6 раза ($p < 0.05$)] в группе контроля по сравнению с интактными животными (рисунок 1). В группах, которым вводили бемитил и ДМФ, на 1-е сутки наблюдали умеренные неврологические нарушения, в то время как этомерзол (25 мг/кг) снижал отрицательное действие ОСМА в 1,9 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. На 3-и сутки неврологический дефицит в группе этомерзола статистически значимо снизился в 2 раза ($p < 0,05$), в группе бемитила в 1,3 раза ($p < 0,05$) и в группе ДМФ в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. На 7-е сутки выраженность неврологического дефицита в группах бемитила и ДМФ была в 1,5 раза ($p < 0,05$) ниже, в то время как у этомерзола наблюдалось уменьшение последствий ОСМА в 1,9 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рисунок 1, таблица 2).

В тесте ОП наблюдали снижение всех видов активности в группе контроля по отношению к интактным животным, что свидетельствует о формировании патологии и тревожном состоянии животных. Так, показатель ГДА был снижен в 2,5 раза ($p < 0,05$), количество стоек с упором в стенку уменьшилось в 2 раза ($p < 0,05$), количество стоек на весу (без упора) в 4,5 раза ($p < 0,05$), количество заглядываний в норки в 2,7 раза ($p < 0,05$), а поисково-исследовательская активность в 2,2 раза ($p < 0,05$).

Этомерзол достоверно повышал показатель ГДА в 2,7 раза ($p < 0,05$), заглядывания в норки в 2,6 раза ($p < 0,05$) и поисково-исследовательскую актив-

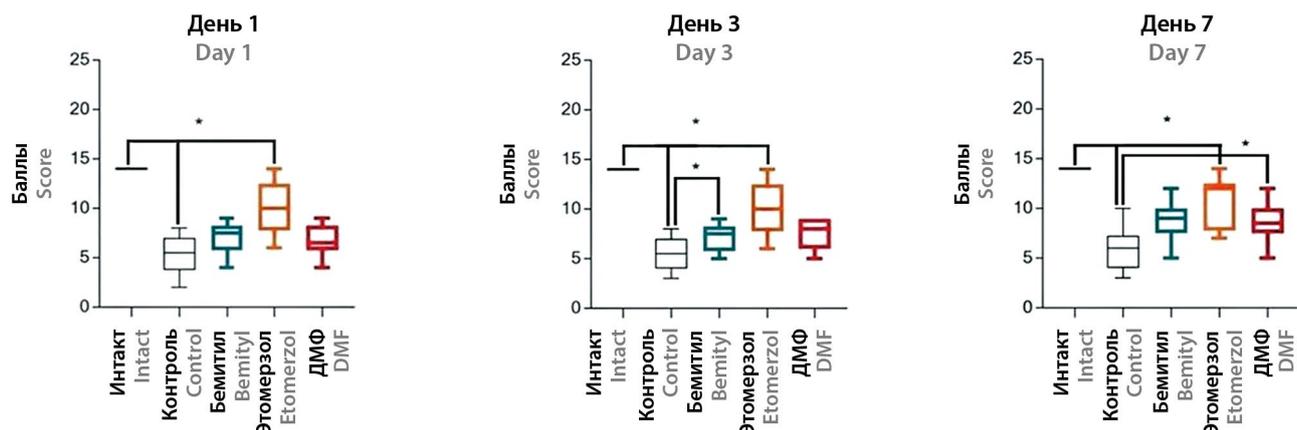


Рисунок 1. Влияние бемитила, этомерзола, ДМФ на неврологический дефицит в тесте «Стимулирование конечностей».

Примечание. * $p < 0,05$

Figure 1. Effect of bemitil, etomerzole, DMF on neurologic deficit in the Limb Placing test.

Note. * $p < 0.05$

Таблица 2. Влияние бемитила, этомерзола, ДМФ на параметры поведения крыс в «Открытом поле» спустя 7 суток после острой ишемии головного мозга ($M \pm m, n = 10$)

Table 2. The effect of bemitil, etomerzole, DMF on the parameters of the behavior of rats in the open field 7 days after acute cerebral ischemia ($M \pm m, n = 10$)

Группа животных Group	Горизонтальная двигательная активность (ГДА) Horizontal motion activity	Вертикальная двигательная активность (ВДА) Vertical motor activity		Заглядывание в норки Peeking into minks	Поисково-исследовательская активность Search and research activity
		Стойки (с упором) Rearing (with emphasis)	Стойки (на весу) Rearing (by weight)		
Интakтные Intact	27,5 ± 2,3	4,2 ± 0,8	9,5 ± 1,3	7,7 ± 1,3*	22,2 ± 1,5*
Контроль Control	11,3 ± 1,6*	2,1 ± 0,5*	2,1 ± 0,6*	2,9 ± 0,9*	10,1 ± 1,5*
Бемитил Bemitil	20,0 ± 2,9	6,3 ± 0,8*	3,1 ± 0,7	10,0 ± 1,5*	22,4 ± 1,0*
Этомерзол Etomerzole	31,2 ± 2,6*	5,0 ± 0,9	5,7 ± 0,8*	7,4 ± 0,5*	20,2 ± 0,7*
ДМФ DMF	23,3 ± 3,06*	5,7 ± 0,5*	3,8 ± 0,5	5,0 ± 0,93	12,0 ± 1,5

Примечание. * $p < 0,05$.

Note. * $p < 0,05$.

ность в 2 раза ($p < 0,05$) по отношению к контрольной группе.

Бемитил увеличивал количество стоек с упором в стенку в 3 раза ($p < 0,05$), показатель заглядывания в норки в 3,4 раза ($p < 0,05$) и поисково-исследовательскую активность в 2,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

В целом бемитил в наибольшей степени восстанавливал реализацию ориентировочно-исследовательского рефлекса (заглядывание в норки) у крыс.

Стоит отметить, что во всех группах, где вводились нейропротекторы, наблюдалось восстановление ОДА и рефлекторно-поведенческого статуса особей, что свидетельствует о снижении психопатологи-

ческой симптоматики церебральной ишемии (рисунок 2). Наиболее выраженный эффект в отношении ОДА наблюдался у этомерзола и бемитила. Результаты этомерзола были выше в 2,7 раза ($p < 0,05$) (восстановление показателей до цифр интактной группы), а в группе бемитила – в 1,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

В тесте ПКЛ в группе контроля наблюдалось снижение количества входов в закрытый рукав в 1,5 раза ($p < 0,05$), в открытый рукав – в 3,2 раза ($p < 0,05$), количества стоек – в 5,4 раза ($p < 0,05$), свешиваний – в 8 раз ($p < 0,05$) по отношению к интактным животным (таблица 3).

Таблица 3. Показатели уровня тревожности экспериментальных животных в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» ($M \pm m, n = 10$)

Table 3. Indicators of the level of anxiety of experimental animals in the Elevated plus maze ($M \pm m, n = 10$)

Группа животных Group of animals	Количество входов Number of entrances		Количество стоек в рукавах Number of rearing in the arms	Количество свешиваний Number of head dipping
	в закрытые рукава in the closed arms	в открытые рукава in the open arms		
Интактные Intact	4,6 ± 0,3	4,2 ± 0,4*	13,0 ± 1,2*	8,7 ± 0,7*
Контроль Control	3,2 ± 0,5	1,3 ± 0,4*	2,4 ± 0,7*	1,1 ± 0,4*
Бемитил Bemityl	2,5 ± 0,9	2,0 ± 0,5	2,3 ± 0,5	6,8 ± 0,6*
Этомерзол Etomerzol	1,7 ± 0,5	1,4 ± 0,25	6,5 ± 1,0	3,8 ± 0,5
ДМФ DMF	3,9 ± 0,8	2,1 ± 0,3	9,0 ± 0,6*	3,6 ± 0,6

Примечание. * $p < 0,05$.

Note. * $p < 0,05$.

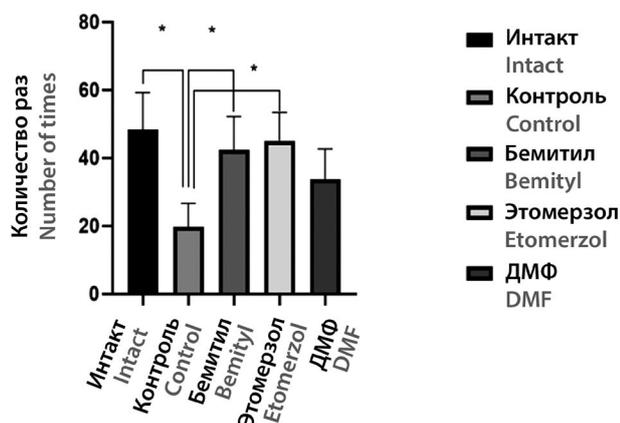


Рисунок 2. Влияние бемитила, этомерзола, ДМФ на общую двигательную активность в открытом поле.

Примечание. * $p < 0,05$

Figure 2. Influence of bemityl, etomerzol, DMF on general motor activity in the open field.

Note. * $p < 0,05$

В группах этомерзола и ДМФ наблюдались высокие значения по показателю количества стоек в рукавах, что в 2,7 ($p < 0,05$) и 3,8 раза ($p < 0,05$) выше, чем у контрольных животных. Бемитил и этомерзол оказывали наибольшее положительное влияние на число свешиваний, что превышало значение таковых в контрольной группе в 6,2 ($p < 0,05$) и 3,4 раза ($p < 0,05$) соответственно. Полученные результаты могут расцениваться как уменьшение боязни высоты у крыс и, следовательно, восстановление психоэмоционального фона животных.

В ряде публикаций присутствуют сведения о психоактивных свойствах производных бензимидазолов. Так, показано, что бемитил в диапазоне доз от 5 до 150 мг/кг угнетал локомоторную активность и исследовательское поведение крыс в тесте ОП, а так-

же проявлял анксиогенные свойства [23, 24]. Данные, полученные в ходе исследования активности бензимидазолов после ишемического инсульта, свидетельствуют о достоверном повышении двигательной активности животных в тестах ОП, что может говорить о психостимулирующем и потенциальном ноотропном эффекте этомерзола и бемитила, а увеличение количества стоек и свешиваний в тесте ПКЛ может быть расценено как проявление анксиолитической активности, что согласуется с ранее проведенными работами [24]. Таким образом, можно сказать, что введение препаратов этомерзола и бемитила, с одной стороны, позволяет добиться выраженного активирующего влияния на психическую и физическую деятельность и, с другой – снизить уровень тревоги у травмированных животных. Стоит отметить, что ранее была выявлена более высокая антиоксидантная активность у этомерзола по сравнению с бемитилом [19]. В настоящем исследовании этомерзол был более эффективен в большинстве тестов.

ДМФ является диметилловым эфиром фумаровой кислоты, в отношении которого активно изучается его предполагаемое нейропротекторное действие [26–28]. Установлено, что введение ДМФ способствует снижению ICAM-1, которая играет важную роль в индукции нейровоспаления и прогрессирования повреждений после острого ишемического инсульта. Антиоксидантное действие осуществляется за счет уменьшения активности окислительного стресса, воспалительного процесса и демиелинизации нейронов [16, 29, 30]. В нашем исследовании выраженность фармакологических эффектов ДМФ уступала бензимидазолам. Однако достоверное снижение неврологического дефицита в тесте СК и повышение количества стоек в рукавах в ПКЛ могут свидетельствовать о наличии у препарата анксиолитической активности. Полученные результаты подчеркивают важность проведения дополнительных исследований по оценке эффективности ДМФ при ОСМА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метод окклюзии средней мозговой артерии у крыс вызывает стойкий неврологический дефицит и психофункциональные расстройства, наиболее выраженные в первые сутки после операции и постепенно редуцирующие под влиянием нейропротекторов.

В сравнении с бемитилом и ДМФ в данном исследовании этомерзол был более эффективен в большинстве тестов. Так, показатель неврологического дефицита в группе этомерзола был ниже по сравнению с бемитилом и ДМФ в 1,4 ($p < 0,05$) и 1,5 раз ($p < 0,05$) соответственно. Значение горизонтальной двигательной активности в тесте ОП было увеличено в 1,6 ($p < 0,05$) (бемитил) и 1,3 раза ($p < 0,05$) (ДМФ). Поисково-исследовательская активность была выше, чем у ДМФ, в 1,7 раз. Количество стоек в тесте ПКЛ было увеличено в 2,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с бемитилом. Умеренное восстановление психоэмоционального фона у крыс наблюдалось во всех группах, получавших нейропротекторы.

Полученные данные могут свидетельствовать о потенциальном нейропротекторном эффекте этомерзола.

ЛИТЕРАТУРА

- Benjamin E. J., Virani S. S., Callaway C. W., Chamberlain A. M., Chang A. R., Cheng S., Chiuve S. E., Cushman M., Delling F. N., Deo R., de Ferranti S. D., Ferguson J. F., Fornage M., Gillespie C., Isasi C. R., Jiménez M. C., Chaffin Jordan L., Judd S. E., Lackland D., Lichtman J. H., Lisabeth L., Liu S., Longenecker C. T., Lutsey P. L., Mackey J. S., Matchar D. B., Matsushita K., Mussolino M. E., Nasir K., O'Flaherty M., Palaniappan L. P., Pandey A., Pandey D. K., Reeves M. J., Ritchey M. D., Rodriguez C. J., Roth G. A., Rosamond W. D., Sampson U. K. A., Satou G. M., Shah S. H., Spartano N. L., Tirschwell D. L., Tsao C. W., Voeks J. H., Willey J. Z., Wilkins J. T., Wu J. H., Alger H. M., Wong S. S., Muntner P. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137(12):e67–e492. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558.
- Пирадов М. А., Максимова М. Ю., Танащян М. М. Инсульт. Пошаговая инструкция. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2020. 286 с.
- Стаховская Л. В., Ключихина О. А., Богатырева М. Д., Чугунова С. А. Анализ эпидемиологических показателей повторных инсультов в регионах Российской Федерации (по итогам территориально-популяционного регистра 2009–2014 гг.). *Consilium Medicum*. 2016;18(9):8–11.
- Vongsfak J., Pratchayasakul W., Apaijai N., Vaniyapong T., Chattipakorn N., Chattipakorn S. C. The Alterations in Mitochondrial Dynamics Following Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(9):1384. DOI: 10.3390/antiox10091384.
- Yang J.-L., Mukda S., Chen S.-D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke. *Redox Biology*. 2018;16:263–275. DOI: 10.1016/j.redox.2018.03.002.
- Klaczanova K., Kovalska M., Chomova M., Pilchova I., Tatarikova Z., Kaplan P., Rascay P. Global brain ischemia in rats is associated with mitochondrial release and downregulation of Mfn2 in the cerebral cortex, but not the hippocampus. *International Journal of Molecular Medicine*. 2019;43(6):2420–2428. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4168.
- Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака у взрослых. Клинические рекомендации М.: Всероссийское общество неврологов; 2021. 260 с.
- Haupt M., Gerner S. T., Bähr M., T. R. Doepfner T. R. Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke—Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4334. DOI: 10.3390/ijms24054334.
- Paul S., Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies. *Experimental Neurology*. 2021;335:113518. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113518.
- Оковитый С. В. Актопротекторы как синтетические адаптогены нового поколения. *Психофармакология и биологическая наркология*. 2003;3(1–2):510–516.
- Макляков Ю. С., Хоронько В. В., Степанов А. А., Сергеева С. А., Мякота И. М. Сравнительное изучение фармакокинетики бемитила и его влияния на циркуляторно-метаболическое обеспечение нейронного модуля соматосенсорной коры мозга. *Биомедицина*. 2007;1(1):111–119.
- Плотникова Т. М., Кулакова З. В., Плотников М. Б. Влияние этомерзола на кровоснабжение и кислородный обмен мозга при острой транзиторной ишемии и рециркуляции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1991;107(4):386–388.
- Orellana-Urúa S., Claps G., Rodrigo R. Improvement of a Novel Proposal for Antioxidant Treatment Against Brain Damage Occurring in Ischemic Stroke Patients. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*. 2021;20(1):3–21. DOI: 10.2174/1871527319666200910153431.
- Kunze R. Dimethyl fumarate for ischemic stroke. *Oncotarget*. 2017;8(9):14281–14282. DOI: 10.18632/oncotarget.15357.
- Hou X., Xu H., Chen W., Zhang N., Zhao Z., Fang X., Zhang X., Chen H., Xu Yu. Neuroprotective effect of dimethyl fumarate on cognitive impairment induced by ischemic stroke. *Annals of Translational Medicine*. 2020;8(6):375. DOI: 10.21037/atm.2020.02.10.
- Owlfard M., Bigdeli M. R., Safari A., Haghani M., Namavar M. R. Effect of Dimethyl Fumarate on the Motor Function and Spatial Arrangement of Primary Motor Cortical Neurons in the Sub-Acute Phase of Stroke in a Rat Model. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2021;30(4):105630. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105630.
- Longa E. Z., Weinstein P. R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84–91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- Новиков В. Е., Левченкова О. С., Климкина Е. И., Кулагин К. Н. Потенцирование антигипоксантами эффекта гипоксического preconditionирования. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2019;17(1):37–44. DOI: 10.17816/RCF17137-44.
- Миронова О. П., Зарубина И. В., Шабанов П. Д. Этомерзол как антиоксидантное средство. *Биомедицинская химия*. 2003;49(5):434–442.
- Shavakandi S.-M., Ranjbaran M., Nabavizadeh F., Vali R., Sehati F., Ashabi G. Dimethyl fumarate protects the aged brain following chronic cerebral hypoperfusion-related ischemia in rats in Nrf2-dependent manner. *Nutritional Neuroscience*. 2022;25(10):2100–2110. DOI: 10.1080/1028415X.2021.1940429.
- Jolkkonen J., Puurunen K., Rantakömi S., Härkönen A., Haapalinnä A., Sivenius J. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000;400(2–3):211–219. DOI: 10.1016/s0014-2999(00)00409-x.
- Walsh R. N., Cummins R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*. 1976;83(3):482–504. DOI: 10.1037/0033-2909.83.3.482.
- Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
- Гамма Т. В., Коренюк И. И. Влияние бемитила и бензимидазола на поведение крыс в тесте "открытое поле". *Нейрофизиология*. 2006;38(1):71–76.
- Черетаев И. В., Коренюк И. И., Ноздрачев А. Д. Нейротропные, психоактивные и обезболивающие действия свойства бензимидазолов и его производных. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2017;103(4):381–390.
- Li J., Ma J., Lacagnina M. J., Lorca S., Odem M. A., Walters E. T., Kavelaars A., Grace P. M. Oral Dimethyl Fumarate Reduces Peripheral Neuropathic Pain in Rodents via NFE2L2 Antioxidant Signaling. *Anesthesiology*. 2020;132(2):343–356. DOI: 10.1097/ALN.000000000000307.
- Safari A., Badeli-Sarkala H., Namavar M. R., Kargar-Abarghouei E., Anssari N., Izadi S., Borhani-Haghighi A. Neuroprotective effect of dimethyl fumarate in stroke: The role of nuclear factor erythroid 2-related factor. *Iranian Journal of Neurology*. 2019;18(3):103–108.

28. Sghaier R., Nury T., Leoni V., Caccia C., Pais De Barros J.-P., Cherif A., Vejux A., Moreau T., Limem K., Samadi M., Mackrill J. J., Mas-moudi A. S., Lizard G., Zarrouk A. Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7 β -hydroxycholesterol. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2019;194:105432. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105432.
29. Iniaqhe L. O., Krafft P. R., Klebe D. W., Omogbai E. K. I., Zhang J. H., Tang J. Dimethyl fumarate confers neuroprotection by casein kinase 2 phosphorylation of Nrf2 in murine intracerebral hemorrhage. *Neurobiology of Disease*. 2015;82:349–358. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.07.001.
30. Farina M., Vieira L. E., Buttari B., Profumo E., Saso L. The Nrf2 Pathway in Ischemic Stroke: A Review. *Molecules*. 2021;26(16):5001. DOI: 10.3390/molecules26165001.

REFERENCES

1. Benjamin E. J., Virani S. S., Callaway C. W., Chamberlain A. M., Chang A. R., Cheng S., Chiuve S. E., Cushman M., Dellling F. N., Deo R., de Ferranti S. D., Ferguson J. F., Fornage M., Gillespie C., Isasi C. R., Jiménez M. C., Chaffin Jordan L., Judd S. E., Lackland D., Lichtman J. H., Lisabeth L., Liu S., Longenecker C. T., Lutsey P. L., Mackey J. S., Matchar D. B., Matsushita K., Mussolino M. E., Nasir K., O'Flaherty M., Palaniappan L. P., Pandey A., Pandey D. K., Reeves M. J., Ritchey M. D., Rodriguez C. J., Roth G. A., Rosamond W. D., Sampson U. K. A., Satou G. M., Shah S. H., Spartano N. L., Tirschwell D. L., Tsao C. W., Voeks J. H., Willey J. Z., Wilkins J. T., Wu J. H. Y., Alger H. M., Wong S. S., Muntner P. Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137(12):e67–e492. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558.
2. Piradov M. A., Maksimova M. Yu., Tanashyan M. M. Stroke. Step-by-step instruction. M.: GEOTAR-Media; 2020. 286 p. (In Russ.)
3. Stahovskaya L. V., Klyuchihina O. A., Bogatyreva M. D., Chugunova S. A. Analysis of epidemiological indicators of recurrent stroke in regions of Russian Federation (On the basis of territorial and population registry 2009–2014). *Consilium Medicum*. 2016;18(9):8–11. (In Russ.)
4. Vongsfak J., Pratchayasakul W., Apaijai N., Vaniyapong T., Chattipakorn N., Chattipakorn S. C. The Alterations in Mitochondrial Dynamics Following Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(9):1384. DOI: 10.3390/antiox10091384.
5. Yang J.-L., Mukda S., Chen S.-D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke. *Redox Biology*. 2018;16:263–275. DOI: 10.1016/j.redox.2018.03.002.
6. Klacanova K., Kovalska M., Chomova M., Pilchova I., Tatarkova Z., Kaplan P., Racay P. Global brain ischemia in rats is associated with mitochondrial release and downregulation of Mfn2 in the cerebral cortex, but not the hippocampus. *International Journal of Molecular Medicine*. 2019;43(6):2420–2428. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4168.
7. Ischemic stroke and transient ischemic attack in adults. Clinical guidelines. Moscow: All-Russian Society of Neurologists; 2021. 260 p. (In Russ.)
8. Haupt M., Gerner S. T., Bähr M., T. R. Doepfner T. R. Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke—Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4334. DOI: 10.3390/ijms24054334.
9. Paul S., Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies. *Experimental Neurology*. 2021;335:113518. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113518.
10. Okovity S. V. Actoprotectors as synthetic adaptogens of a new generation. *Psihofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya*. 2003;3(1–2):510–516. (In Russ.)
11. Maklyakov Y. S., Khoronko V. V., Stepanov A. A., Myakota I. M. Comparative study of the pharmacokinetics of bemtil and its effect on the circulatory-metabolic supply of the neural module of the somatosensory cortex. *Biomedicina*. 2007;1(1):111–119. (In Russ.)
12. Plotnikova T. M., Kulakova Z. V., Plotnikov M. B. Influence of etomerzol on blood supply and oxygen metabolism of the brain in acute transient ischemia and recirculation. *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny*. 1991;107(4):386–388. (In Russ.)
13. Orellana-Urzúa S., Claps G., Rodrigo R. Improvement of a Novel Proposal for Antioxidant Treatment Against Brain Damage Occurring in Ischemic Stroke Patients. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*. 2021;20(1):3–21. DOI: 10.2174/1871527319666200910153431.
14. Kunze R. Dimethyl fumarate for ischemic stroke. *Oncotarget*. 2017;8(9):14281–14282. DOI: 10.18632/oncotarget.15357.
15. Hou X., Xu H., Chen W., Zhang N., Zhao Z., Fang X., Zhang X., Chen H., Xu Yu. Neuroprotective effect of dimethyl fumarate on cognitive impairment induced by ischemic stroke. *Annals of Translational Medicine*. 2020;8(6):375. DOI: 10.21037/atm.2020.02.10.
16. Owjifard M., Bigdeli M. R., Safari A., Haghani M., Namavar M. R. Effect of Dimethyl Fumarate on the Motor Function and Spatial Arrangement of Primary Motor Cortical Neurons in the Sub-Acute Phase of Stroke in a Rat Model. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2021;30(4):105630. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105630.
17. Longa E. Z., Weinstein P. R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84–91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
18. Novikov V. E., Levchenkova O. S., Klimkina E. I., Kulagin K. N. Potentiation of the hypoxic preconditioning effect by antihypoxants. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(1):37–44. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF17137-44.
19. Mironova O. P., Zarubina I. V., Shabanov P. D. Etomerzol as an antioxidant. *Biomedicinskaya himiya*. 2003;49(5):434–442. (In Russ.)
20. Shavakandi S.-M., Ranjbaran M., Nabavizadeh F., Vali R., Sehati F., Ashabi G. Dimethyl fumarate protects the aged brain following chronic cerebral hypoperfusion-related ischemia in rats in Nrf2-dependent manner. *Nutritional Neuroscience*. 2022;25(10):2100–2110. DOI: 10.1080/1028415X.2021.1940429.
21. Jolkonen J., Puurunen K., Rantakömi S., Härkönen A., Haapalinn A., Sivenius J. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000;400(2–3):211–219. DOI: 10.1016/s0014-2999(00)00409-x.
22. Walsh R. N., Cummins R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*. 1976;83(3):482–504. DOI: 10.1037/0033-2909.83.3.482.
23. Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007;2(2):322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
24. Gamma T. V., Korenyuk I. I. The effect of bemtil and benzimidazole on the behavior of rats in the open field test. *Nejrofiziologiya*. 2006;38(1):71–76. (In Russ.)
25. Cheretaev I. V., Korenyuk I. I., Nozdrachev A. D. Neurotropic, psychoactive and analgesic effects of the properties of benzimidazoles and its derivatives. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I. M. Sechenova*. 2017;103(4):381–390. (In Russ.)
26. Li J., Ma J., Lacagnina M. J., Lorca S., Odem M. A., Walters E. T., Kavelaars A., Grace P. M. Oral Dimethyl Fumarate Reduces Peripheral Neuropathic Pain in Rodents via NFE2L2 Antioxidant Signaling. *Anesthesiology*. 2020;132(2):343–356. DOI: 10.1097/ALN.000000000000307.
27. Safari A., Badeli-Sarkala H., Namavar M. R., Kargar-Abarghouei E., Anssari N., Izadi S., Borhani-Haghighi A. Neuroprotective effect of dimethyl fumarate in stroke: The role of nuclear factor erythroid 2-related factor. *Iranian Journal of Neurology*. 2019;18(3):103–108.
28. Sghaier R., Nury T., Leoni V., Caccia C., Pais De Barros J.-P., Cherif A., Vejux A., Moreau T., Limem K., Samadi M., Mackrill J. J., Mas-moudi A. S., Lizard G., Zarrouk A. Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiaoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7 β -hydroxycholesterol. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2019;194:105432. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105432.
29. Iniaqhe L. O., Krafft P. R., Klebe D. W., Omogbai E. K. I., Zhang J. H., Tang J. Dimethyl fumarate confers neuroprotection by casein kinase 2 phosphorylation of Nrf2 in murine intracerebral hemorrhage. *Neurobiology of Disease*. 2015;82:349–358. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.07.001.
30. Farina M., Vieira L. E., Buttari B., Profumo E., Saso L. The Nrf2 Pathway in Ischemic Stroke: A Review. *Molecules*. 2021;26(16):5001. DOI: 10.3390/molecules26165001.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1642>
УДК 615.21



Оригинальная статья / Research article

Изучение эффектов агониста α_2 -адренорецепторов мафедина на поведение белых беспородных мышей при однократном введении

Н. С. Курмазов^{1, 2}, С. А. Червонецкий¹, В. А. Приходько^{1, 2},
Ю. И. Сысоев^{1, 3, 4, 5}, С. В. Оковитый^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева Российской академии наук (ИМЧ РАН). 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 9

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук (ИФ РАН). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

⁴ Институт трансляционной биомедицины Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (ФГБОУ ВО СПбГУ). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9, пом. 1050

⁵ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус». 354340, Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Олимпийский пр-т, д. 1

✉ Контактное лицо: Сысоев Юрий Игоревич. E-mail: susoyev92@mail.ru

ORCID: Н. С. Курмазов – <http://orcid.org/0000-0001-7212>; С. А. Червонецкий – <http://orcid.org/0009-0001-4730-8649>;
В. А. Приходько – <http://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; Ю. И. Сысоев – <http://orcid.org/0000-0003-4199-5318>;
С. В. Оковитый – <http://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Статья поступила: 09.10.2023

Статья принята в печать: 17.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Агонисты α_2 -адренорецепторов могут быть использованы не только как антигипертензивные и седативные средства, но также представляют большой интерес для лечения неврологических нарушений. В ранее проведенных исследованиях для представителя данной группы 6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-ола (мафедина) была показана высокая эффективность в качестве нейротропного средства. Однако его влияние на поведение животных в поведенческих тестах еще не было оценено.

Цель. Целью настоящей работы стала оценка влияния натриевой соли мафедина в трех дозах (1, 10 и 50 мг/кг) на поведение белых беспородных мышей в 3 тестах: «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Черно-белая камера».

Материалы и методы. Эксперименты были выполнены на 60 белых беспородных мышах-самцах массой 20–22 г, рандомизированных на 4 группы ($n = 15$): 1) контроль (0,9%-й раствор натрия хлорида); 2) мафедин (1 мг/кг); 3) мафедин (10 мг/кг); 4) мафедин (50 мг/кг). Все препараты вводили однократно внутривентриально за 20 мин до тестирования. Поведение животных оценивали в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Черно-белая камера» по общепринятым методикам с перераспределением по группам после каждого теста и интервалом между тестами не менее 2 суток. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программного обеспечения Prism 8.0.2.

Результаты и обсуждение. Мафедин в дозах 1 и 10 мг/кг не оказывал влияние на поведение испытуемых животных ни в одном из тестов. Доза 50 мг/кг оказывала на испытуемых животных анксиолитическое действие, о чем свидетельствовали снижение индекса тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» и увеличение количества выглядываний из черной камеры в тесте «Черно-белая камера» по сравнению с контрольной группой.

Заключение. Натриевая соль мафедина в диапазоне доз от 1 до 50 мг/кг не оказывает негативного влияния на поведение мышей, что свидетельствует о высоком профиле безопасности изучаемого соединения. Обнаруженное противотревожное действие высокой дозы изучаемого соединения определяет интерес к его изучению не только как нейротропного, но и противотревожного средства.

Ключевые слова: α_2 -адреномиметики, мафедин, мыши, поведенческие тесты, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, черно-белая камера

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

Вклад авторов. Ю. И. Сысоев, С. В. Оковитый – идея и планирование эксперимента. Н. С. Курмазов, С. А. Червонецкий – проведение экспериментов и обработка данных. Ю. И. Сысоев – подготовка иллюстраций. Н. С. Курмазов, С. А. Червонецкий, В. А. Приходько, Ю. И. Сысоев, С. В. Оковитый – подготовка и редакция рукописи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы ГП-47 «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030), тема 0113-2019-0006, и в рамках проектов 93022925/94030803 Санкт-Петербургского государственного университета и № 075-10-2021-093 (Проект NRB-RND-2115) при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Для цитирования: Курмазов Н. С., Червонецкий С. А., Приходько В. А., Сысоев Ю. И., Оковитый С. В. Изучение эффектов агониста α_2 -адренорецепторов мафедина на поведение белых беспородных мышей при однократном введении. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):239–246. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1642>

© Курмазов Н. С., Червонецкий С. А., Приходько В. А., Сысоев Ю. И., Оковитый С. В., 2023

© Kurmazov N. S., Chervonetskiy S. A., Prikhodko V. A., Sysoev Yu. I., Okovityi S. V., 2023

Evaluation of the α_2 -adrenergic Agonist Mafedine Effects on White Outbred Mouse Behaviour Following Acute Administration

Nikita S. Kurmazov^{1,2}, Sergey A. Chervonetskiy¹, Veronika A. Prikhodko^{1,2}, Yuriy I. Sysoev^{1,3,4,5}✉, Sergey V. Okovityi^{1,2}

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² N. P. Behтерева Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, 9, Akademika Pavlova str., Saint Petersburg, 197376, Russia

³ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6, Makarova emb., Saint Petersburg, 199034, Russia

⁴ Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, 7–9/1050, Universitetskaya emb., Saint Petersburg, 199034, Russia

⁵ Sirius University of Science and Technology, 1, Olympic ave., town. Sirius, federal territory "Sirius", Krasnodar region, 354340, Russia

✉ Corresponding author: Yuriy I. Sysoev. E-mail: susoyev92@mail.ru

ORCID: Nikita S. Kurmazov – <http://orcid.org/0000-0001-7212>; Sergey A. Chervonetskiy – <http://orcid.org/0009-0001-4730-8649>;

Veronika A. Prikhodko – <http://orcid.org/0000-0002-4690-1811>; Yuriy I. Sysoev – <http://orcid.org/0000-0003-4199-5318>;

Sergey V. Okovityi – <http://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Received: 09.10.2023

Revised: 17.11.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. α_2 -adrenergic agonists are not only used as antihypertensive and sedative agents, but are also of interest as potential medications for the treatment of neurological disorders. Previous research has shown a compound from this class, 6-oxo-1-phenyl-2-(phenylamino)-1,6-dihydropyrimidine-4-ol (mafedine), to exert strong neuroprotection under experimental conditions. Despite its long record of development, the effects of mafedine on animal behavioural characteristics remain unknown.

Aim. This work was aimed at evaluating the effects of mafedine sodium at three doses (1, 10, or 50 mg/kg) on white outbred mouse behavior in three tests: Open Field, Elevated Plus Maze, and Light/Dark Box.

Materials and methods. Experiments were carried out on 60 white outbred male mice weighing 20–22 g, randomized into 4 groups ($n = 15$): 1) control (0,9% saline); 2) mafedine (1 mg/kg); 3) mafedine (10 mg/kg); 4) mafedine (50 mg/kg). All agents were administered via single intraperitoneal injections 20 min before testing. Animal behavior was assessed using the Open Field, Elevated Plus Maze, and Light/Dark Box tests following conventional protocols with group reassignment between tests and an inter-test time interval of at least 2 days. Statistical analysis was carried out using the Prism 8.0.2 software package.

Results and discussion. At 1 or 10 mg/kg, mafedine did not affect animal behaviour in either of the tests. At 50 mg/kg, it produced an anxiolytic effect, as indicated by the decrease in the anxiety index values for the Elevated Plus Maze test as well as the increase in peeking out frequency in the Light/Dark Box test, compared to respective control values.

Conclusion. Mafedine sodium salt at doses between 1 and 50 mg/kg was shown to produce no adverse effect on mouse behaviour, indicating a good safety profile of the compound. The discovered anxiolytic effect of mafedine at the highest dose validates its further research not only as a neuroprotector, but also as an anti-anxiety agent.

Keywords: α_2 -adrenergic agonists, mafedine, mice, behavioural testing, Open Field, Elevated Plus Maze, Light/Dark Box

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. Yuriy I. Sysoev, Sergey V. Okovityi – experimental design and planning. Nikita S. Kurmazov, Sergey A. Chervonetskiy – experiment conduction and data analysis. Yuriy I. Sysoev – visualization, Nikita S. Kurmazov, Sergey A. Chervonetskiy, Veronika A. Prikhodko, Yuriy I. Sysoev, Sergey V. Okovityi – preparation and editing of manuscripts.

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" as part of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia. The work was carried out with the support of the State Program SP-47 "Scientific and technological development of the Russian Federation" (2019-2030), project 0113-2019-0006 and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, (Agreement 075-10-2021-093, Project [NRB-RND-2115]) and as part of the projects 93022925/94030803 of the Saint Petersburg State University.

For citation: Kurmazov N. S., Chervonetskiy S. A., Prikhodko V. A., Sysoev Yu. I., Okovityi S. V. Evaluation of the α_2 -adrenergic agonist mafedine effects on white outbred mouse behaviour following acute administration. *Drug development & registration*. 2023;12(4):239–246. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1642>

ВВЕДЕНИЕ

Мафедин (6-оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-ол) – производное пиримидина, синтезированное в Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете [1]. В серии экспериментов на различных видах животных мафедин (в виде основания) продемонстрировал гипотензивный эффект, обусловленный активацией центральных

α_2 -адренорецепторов. В отличие от своего фармакологического аналога клонидина, мафедин обладал более длительным, равномерным и продолжительным действием, не вызывал синдрома отмены, а также в значительно меньшей степени угнетал центральную нервную систему [1]. На основании указанных особенностей рецепторного действия было сделано предположение о наличии у мафедина потенциальной нейропротекторной активности. Позднее меха-

низм действия препарата был уточнен в исследовании на рыбах *Danio rerio*. В качестве его основной молекулярной мишени были определены центральные адренорецепторы α_{2c} -подтипа, воздействием на которые объяснялось его мягкое психостимулирующее действие [2].

На модели черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс натриевая соль мафедина (2,5 мг/кг) при курсовом введении в течение 1 недели после травмы уменьшала объем повреждения головного мозга и выраженность местного воспаления, а также улучшала восстановление функции конечностей и общей двигательной активности животных [3]. Введение мафедина способствовало нормализации межполушарных связей отделов коры, отдаленных от области повреждения, а также внутримушарных связей здорового полушария к 7-му дню после травмы. Помимо этого, препарат оказывал положительное влияние на динамику рефлекторных ответов коры головного мозга при фото- и соматосенсорной стимуляции в острый период ЧМТ [4]. Наряду с этим одним из компонентов механизма действия мафедина может быть репрессия генов α_{2b} -адренорецепторов, фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-6 в травмированном полушарии при компенсаторном увеличении их экспрессии в здоровом [5].

Несмотря на долгую историю изучения фармакологической активности мафедина, его потенциальное влияние на поведение теплокровных животных не было оценено экспериментально. При этом изучение поведенческой активности целесообразно не только с точки зрения выявления нежелательных эффектов и составления профиля безопасности препарата, но и для обнаружения возможных плейотропных свойств, наличие которых в целом характерно для α_2 -адреномиметиков [7–9].

В связи с вышесказанным **целью данной работы** стало изучение влияния мафедина при однократном введении в трех дозах (1, 10 и 50 мг/кг) на поведение белых беспородных мышей в тестах «Открытое поле» (ОП), «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Черно-белая камера» (ЧБК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС от 22 сентября 2010 г., принципами Базельской декларации и требованиями Совета Евразийского экономического союза от 03.11.2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». Протокол эксперимента был утвержден биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Были предприняты все меры для уменьшения числа используемых животных и минимизации их страданий. Эксперименты были выполнены на 60 белых беспородных мышах-самцах массой 20–22 г, полученных из

ФГУП НИЦ «Курчатовский институт» – питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, Россия). Мыши получали неограниченный доступ к корму (сухой полнорационный гранулированный экструдированный комбикорм рецепта ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Россия) и воде. Перед началом первого теста животные были разделены на 4 группы по 15 особей: 1) контроль – 0,2 мл растворителя (физиологический раствор); 2) мафедин (1 мг/кг); 3) мафедин (10 мг/кг) и 4) мафедин (50 мг/кг). Все препараты вводились однократно внутривентрально за 20 мин до тестирования. В дни последующих экспериментов животные перераспределялись по группам во избежание накопительного эффекта мафедина. Оценку влияния изучаемого соединения на поведение животных проводили на основании тестов «Открытое поле» (ОП), «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Черно-белая камера» (ЧБК) (ООО «НПК Открытая Наука», Россия). В тесте ОП оценивали пройденную дистанцию, число пересеченных сегментов, среднюю скорость, время в центре, общее время замираний, число замираний, стоек, грумингов и заглядываний в норки [10]. В тесте ПКЛ оценивали время, проводимое животными в центре, в открытых (ОР) и закрытых рукавах (ЗР) лабиринта, число посещений ОР и ЗР, число грумингов, стоек, свисаний с ОР и выглядываний из ЗР [11]. Дополнительно рассчитывали индекс тревожности (ИТ) по формуле:

$$\text{ИТ} = 1 - \left[\frac{\text{время в ОР} / \text{общее время тестирования} + \text{число посещений ОР} / \text{общее число посещений}}{2} \right] [12].$$

В тесте ЧБК оценивали латентное время посещения черной (ЧК) и белой (БК) камеры, время, проведенное в ЧК/БК, число переходов, стоек, грумингов и выглядываний из ЧК [13]. Для ОП анализ видеозаписей проводили с использованием системы видеорегистрации VideoMot2 3.0.1 (TSE Systems, Германия), для ПКЛ и ЧБК – в полуавтоматическом режиме с использованием программы RealTimer 1.30 (ООО «НПК Открытая Наука», Россия). Тестирование животных начинали в 12:00, длительность тестирования одного животного составляла 3 мин. Перерыв между разными тестами составлял не менее 2 суток. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программного обеспечения Prism 8.0.2 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро – Уилка. При нормальном распределении количественных признаков значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с тестом *post hoc* по Тьюки; при распределении, отличном от нормального, – с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с тестом *post hoc* по Данну. Числовые данные, приведенные на рисунках, представлены в виде: среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех используемых дозах мафедин не оказывал значимого влияния на поведение животных ни в одном из проводимых тестов (рисунки 1–3). При введении изучаемого соединения в дозе 50 мг/кг у животных в тесте ПКЛ было отмечено снижение ИТ по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$; тест *post hoc* по Тьюки) (рисунок 2). В тесте ЧБК эта же доза вызывала повышение числа выглядываний из ЧК по сравнению с контролем ($p < 0,05$; однофакторный ANOVA, тест *post hoc* по Тьюки) (рисунок 3).

Несмотря на значительное количество работ, посвященных антигипертензивной и нейропротекторной активности мафедина, изучение его потенциального влияния на поведение животных при однократ-

ном введении ранее не проводилось. Первая попытка оценки поведенческих эффектов мафедина была предпринята в 2019 г. в рамках скринингового исследования на *Danio rerio*, в котором препарат продемонстрировал мягкую психостимулирующую и анксиогенную активность [2]. Следует отметить, что *D. rerio*, будучи эволюционно более древним видом, во многих случаях оказываются неоптимальным модельным объектом для изучения биологической активности нейро- и психотропных веществ, в том числе воздействующих на α_2 -адренергические рецепторы [14–16]. Сравнительно низкая степень филогенетического родства между костистыми рыбами и млекопитающими может объяснять нередко наблюдаемые расхождения результатов различных фарма-

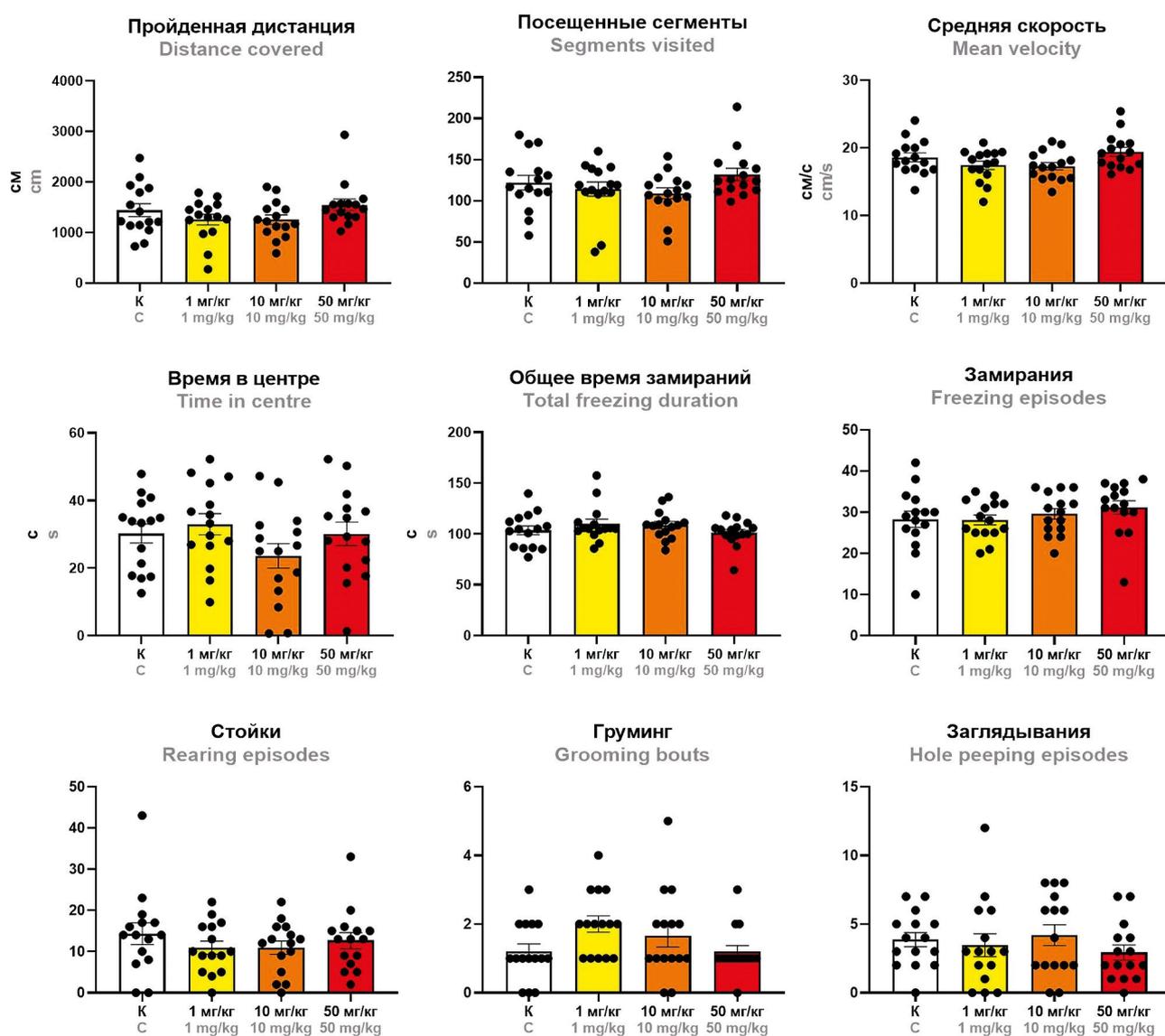


Рисунок 1. Результаты оценки поведения мышей в тесте «Открытое поле».

К – контроль (физиологический раствор)

Figure 1. Mouse behaviour as assessed in the Open Field test.

C – control (normal saline)

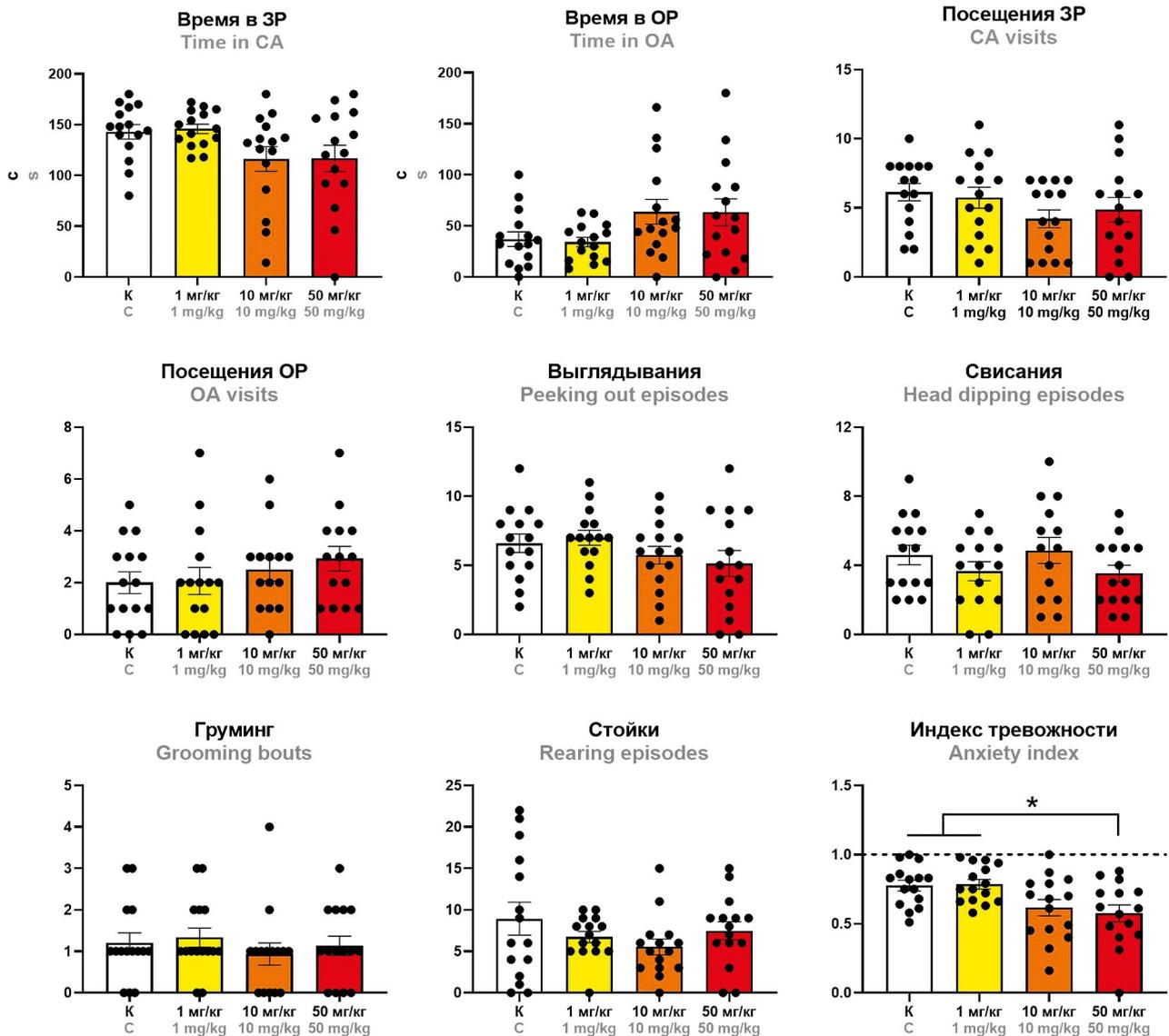


Рисунок 2. Результаты оценки поведения мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».

ЗР – закрытые рукава; ОР – открытые рукава; К – контроль (физиологический раствор). * $p < 0,05$

Figure 2. Mouse behaviour as assessed in the Elevated Plus Maze test.

CA – closed arms; OA – open arms; C – control (normal saline). * $p < 0,05$

кологических экспериментов, а также их несоответствие данным клинических исследований.

В проведенной работе показано, что при однократном введении в низких (1, 10 мг/кг) дозах мафедина не оказывал существенного влияния на поведение мышей в тестах ОП, ПКЛ и ЧБК, а в высокой дозе (50 мг/кг) обладал неярко выраженным анксиолитическим эффектом в тестах ПКЛ и ЧБК. Полученные данные свидетельствуют о хорошем профиле безопасности мафедина, а также дают основание для дальнейшего изучения его возможной анксиолитической активности. Ранее наличие противотревожных свойств было показано для α_2 -агонистов дексметомидина [17], клонидина [18], гуанфацина [19], азепексола и гуанабенза [20]. Наблюдаемый анкси-

олитический эффект мафедина может указывать на его селективность в отношении определенных подтипов α_2 -адренорецепторов. Считается, что основной вклад в реализацию поведенческих эффектов препаратов данного ряда вносит их взаимодействие с рецепторами α_{2A} - и α_{2C} -подтипов [21–23].

Проявление анксиолитического эффекта мафедина только при его введении в сравнительно высокой дозе (50 мг/кг) может быть связано с недостаточной высокой степенью прохождения вещества через гематоэнцефалический барьер. Данная проблема потенциально может быть решена путем использования липосомальных, мицеллярных или иных систем направленной доставки лекарственных веществ [24, 25].

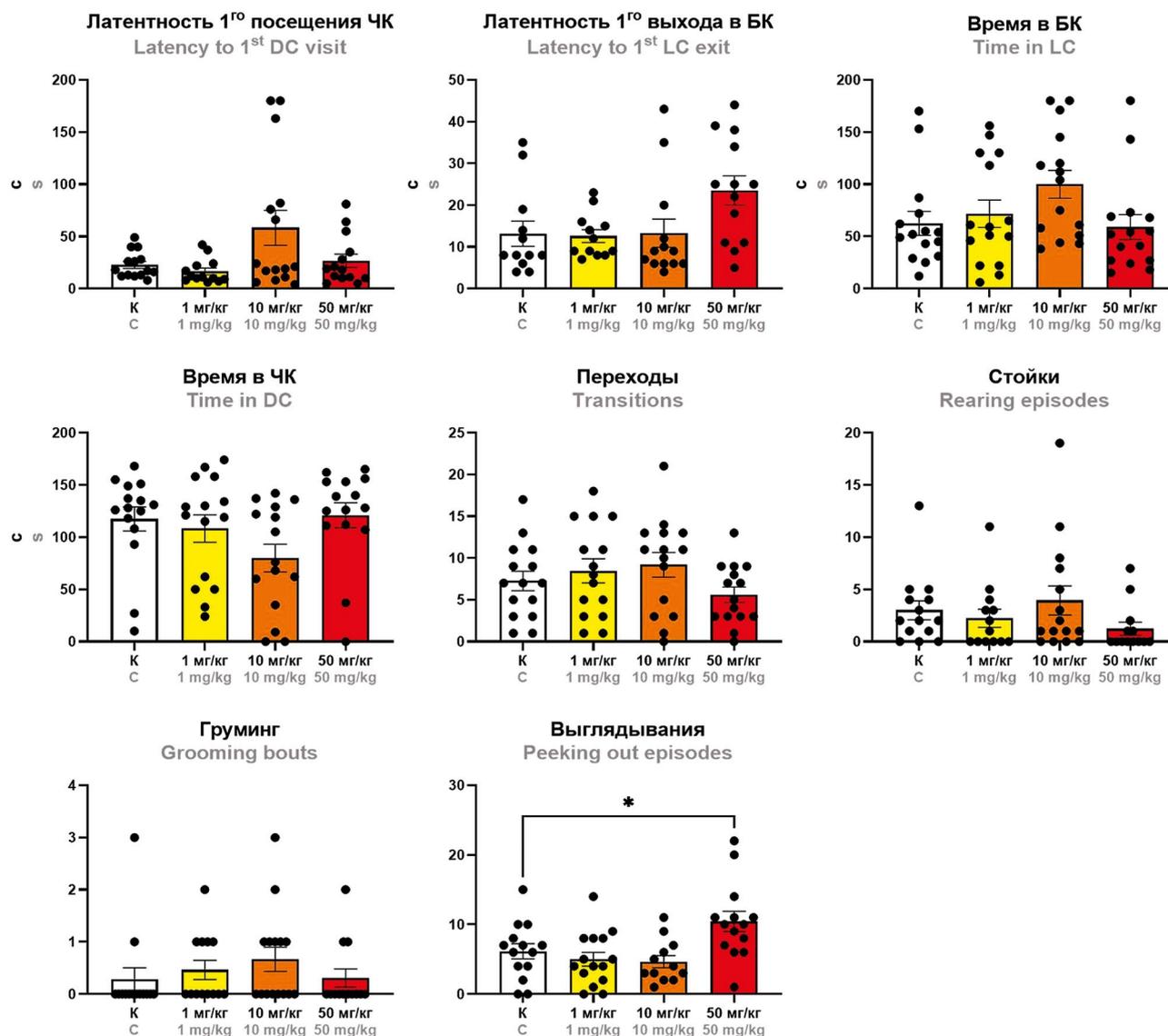


Рисунок 3. Результаты оценки поведения мышей в тесте «Черно-белая камера». ЧК – черная камера; БК – белая камера; К – контроль (физиологический раствор). * $p < 0,05$

Figure 3. Mouse behaviour as assessed in the Light/Dark Box test. DC – dark chamber; LC – light chamber; C – control (normal saline). * $p < 0,05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенными исследованиями установлено отсутствие негативного влияния α_2 -адреномиметика мафедина на поведение мышей при однократном введении, а также наличие у него анксиолитического эффекта в высоких дозах. Полученные результаты свидетельствуют о высокой безопасности мафедина, а также обуславливают целесообразность дальнейшей оценки его противотревожной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юсоев В. Н., Чернов Н. М., Яковлев И. П., Оковитый С. В., Сысоев Ю. И., Анисимова Н. А. 6-Оксо-1-фенил-2-(фениламино)-1,6-дигидропиримидин-4-олят натрия и способ его получения. Патент РФ на изобретение № RU 2669555 C1. 19.01.2018. Доступно по: <https://patentimages.storage.googleapis.com/19/79/c3/609d6a91fade81/RU2669555C1.pdf> Ссылка активна на 08.11.2023.
2. Sysoev Yu. I., Meshalkina D. A., Petrov D. V., Okovityi S. V., Musienko P. E., Kalueff A. V. Pharmacological screening of a new alpha-2 adrenergic receptor agonist, mafedine, in zebrafish. *Neuroscience Letters*. 2019;701:234–239. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.03.001.
3. Сысоев Ю. И., Дагаев С. Г., Кубарская Л. Г., Гайкова О. Н., Узурбунам Б. Ч., Модисе К., Маквана Т. Л., Оковитый С. В. Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(1):62–77. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
4. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Chernyakov R. T., Idiyatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sciences*. 2021;11(8):981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.

5. Сысоев Ю.И., Шустов М.В., Приходько В.А., Шиц Д.Д., Пучик М.М., Оковитый С.В. Изучение молекулярно-генетических механизмов действия агониста $\alpha 2$ -адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2023;109(4):438–456. DOI: 10.31857/S0869813923040118.
6. Morrow B.A., George T.P., Roth R.H. Noradrenergic alpha-2 agonists have anxiolytic-like actions on stress-related behavior and mesoprefrontal dopamine biochemistry. *Brain Research*. 2004;1027(1-2):173–178. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.08.057.
7. Harstad E., Shults J., Barbaresi W., Bax A., Cacia J., Deavenport-Saman A., Friedman S., LaRosa A., Loe I. M., Mittal S., Tullio S., Vanderbilt D., Blum N.J. $\alpha 2$ -Adrenergic Agonists or Stimulants for Preschool-Age Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *JAMA*. 2021;325(20):2067–2075. DOI: 10.1001/jama.2021.6118.
8. Antipov A., Brizuela M., Blessing W. W., Ootsuka Y. Alpha2-adrenergic receptor agonists prevent emotional hyperthermia. *Brain research*. 2020;1732:146678. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.146678.
9. Preskorn S. H., Zeller S., Citrome L., Finman J., Goldberg J. F., Fava M., Kakar R., De Vivo M., Yocca F. D., Risinger R. Effect of Sublingual Dexmedetomidine vs Placebo on Acute Agitation Associated With Bipolar Disorder: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2022;327(8):727–736. DOI: 10.1001/jama.2022.0799.
10. Walsh R. N., Cummins R. A. The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychol. Bull.* 1976;83:482–504.
11. Walf A. A., Frye C. A. The Use of the Elevated plus Maze as an Assay of Anxiety-Related Behavior in Rodents. *Nature Protocols*. 2007;2:322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
12. Cohen H., Matar M. A., Joseph Z. Animal models of post-traumatic stress disorder. *Current Protocols in Neuroscience*. 2013;9:9.45. DOI: 10.1002/0471142301.ns0945s64.
13. Bourin M., Hascoët M. The Mouse Light/Dark Box Test. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463:55–65. DOI: 10.1016/s0014-2999(03)01274-3.
14. Joyce W., Warwicker J., Shiels H. A., Perry S. F. Evolution and divergence of teleost adrenergic receptors: why sometimes 'the drugs don't work' in fish. *Journal of Experimental Biology*. 2023;226(19):jeb245859. DOI: 10.1242/jeb.245859.
15. Markin P. A., Brito A., Moskaleva N. E., Tagliaro F., Tarasov V. V., La Frano M. R., Savitskii M. V., Appolonova S. A. Short- and medium-term exposures of diazepam induce metabolomic alterations associated with the serotonergic, dopaminergic, adrenergic and aspartic acid neurotransmitter systems in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*. 2021;38:100816. DOI: 10.1016/j.cbd.2021.100816.
16. O'Daniel M. P., Petrunich-Rutherford M. L. Effects of chronic prazosin, an alpha-1 adrenergic antagonist, on anxiety-like behavior and cortisol levels in a chronic unpredictable stress model in zebrafish (*Danio rerio*). *PeerJ*. 2020;8:e8472. DOI: 10.7717/peerj.8472.
17. Venn R. M., Bradshaw C. J., Spencer R., Brealey D., Caudwell E., Naughton C., Vedio A., Singer M., Feneck R., Treacher D., Willets S. M., Grounds R. M. Preliminary UK experience of dexmedetomidine, a novel agent for postoperative sedation in the intensive care unit. *Anaesthesia*. 1999;54(12):1136–1142. DOI: 10.1046/j.1365-2044.1999.01114.x.
18. Hoehn-Saric R., Merchant A. F., Keyser M. L., Smith V. K. Effects of clonidine on anxiety disorders. *Archives of General Psychiatry*. 1981;38(11):1278–1282. DOI: 10.1001/archpsyc.1981.01780360094011.
19. Fox H., Sinha R. The role of guanfacine as a therapeutic agent to address stress-related pathophysiology in cocaine-dependent individuals. *Advances in Pharmacology*. 2014;69:217–265. DOI: 10.1016/B978-0-12-420118-7.00006-8.
20. Handley S. L., Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1984;327(1):1–5. DOI: 10.1007/BF00504983
21. Schramm N. L., McDonald M. P., Limbird L. E. The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(13):4875–4882. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-13-04875.2001.
22. Uys M. M., Shahid M., Harvey B. H. Therapeutic Potential of Selectively Targeting the $\alpha 2C$ -Adrenoceptor in Cognition, Depression, and Schizophrenia-New Developments and Future Perspective. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;8:144. DOI: 10.3389/fpsy.2017.00144.
23. Tekin N., Karamahmutoglu T. E., Aykaç A., Akakin D., Gönen M. Z. The $\alpha 2C$ -adrenoceptor antagonist JP-1302 controls behavioral parameters, tyrosine hydroxylase activity and receptor expression in a rat model of ketamine-induced schizophrenia-like deficits. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2022;221:173490. DOI: 10.1016/j.pbb.2022.173490.
24. Скоробогатова А.И., Терентьева О.А., Вайнштейн В.А., Оковитый С.В., Флисюк Е.В., Наркевич И.А. Направленный транспорт как перспективный метод доставки лекарственных веществ в центральную нервную систему (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2019;53(9):33–39. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-9-33-39.
25. Khare P., Edgecomb S. X., Hamadani C. M., Tanner E. E. L., Manickam D. S. Lipid nanoparticle-mediated drug delivery to the brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2023;197:114861. DOI: 10.1016/j.addr.2023.114861.

REFERENCES

1. Yuskovets V. N., Chernov N. M., Yakovlev I. P., Okovityi S. V., Sysoev Yu. I., Anisimova N. A. 6-Oxo-1-phenyl-2-(phenylamino)-1,6-dihydropyrimidine-4-olate of sodium and method for preparation thereof. Patent RUS № 2669555 C1. 19.01.2018. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/19/79/c3/609d6a91fade81/RU2669555> Accessed: 08.11.2023. (In Russ.)
2. Sysoev Yu. I., Meshalkina D. A., Petrov D. V., Okovityi S. V., Musienko P. E., Kalueff A. V. Pharmacological screening of a new alpha-2 adrenergic receptor agonist, mafedine, in zebrafish. *Neuroscience Letters*. 2019;701:234–239. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.03.001.
3. Sysoev Y. I., Dagaev S. G., Kubarskaja L. G., Gaikova O. N., Uzuegbunam B. C., Modise K., Makwana T. L., Okovityi S. V. Study of neuroprotective activity of mafedine, an alpha-2 adrenergic receptor agonist, by modeling a traumatic brain injury in rats. *Biomedicine*. 2019;15(1):62–77. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-62-77.
4. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Chernyakov R. T., Idiyatullin R. D., Musienko P. E., Okovityi S. V. Effects of alpha-2 adrenergic agonist mafedine on brain electrical activity in rats after traumatic brain injury. *Brain Sciences*. 2021;11(8):981. DOI: 10.3390/brainsci11080981.
5. Sysoev Yu. I., Shustov M. V., Prikhodko V. A., Shits D. D., Puchik M. M., Okovityi S. V. Exploring the molecular and genetic mechanisms of action of the $\alpha 2$ -adrenergic agonist mafedine in experimental traumatic brain injury in rats. *Russian Journal of Physiology*. 2023;109(4):438–456. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0869813923040118.
6. Morrow B.A., George T.P., Roth R.H. Noradrenergic alpha-2 agonists have anxiolytic-like actions on stress-related behavior and mesoprefrontal dopamine biochemistry. *Brain Research*. 2004;1027(1-2):173–178. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.08.057.
7. Harstad E., Shults J., Barbaresi W., Bax A., Cacia J., Deavenport-Saman A., Friedman S., LaRosa A., Loe I. M., Mittal S., Tullio S., Vanderbilt D., Blum N.J. $\alpha 2$ -Adrenergic Agonists or Stimulants for Preschool-Age Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *JAMA*. 2021;325(20):2067–2075. DOI: 10.1001/jama.2021.6118.
8. Antipov A., Brizuela M., Blessing W. W., Ootsuka Y. Alpha2-adrenergic receptor agonists prevent emotional hyperthermia. *Brain research*. 2020;1732:146678. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.146678.
9. Preskorn S. H., Zeller S., Citrome L., Finman J., Goldberg J. F., Fava M., Kakar R., De Vivo M., Yocca F. D., Risinger R. Effect of Sublingual Dexmedetomidine vs Placebo on Acute Agitation Associated With Bipolar Disorder: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2022;327(8):727–736. DOI: 10.1001/jama.2022.0799.
10. Walsh R. N., Cummins R. A. The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychol. Bull.* 1976;83:482–504.

11. Walf A. A., Frye C. A. The Use of the Elevated plus Maze as an Assay of Anxiety-Related Behavior in Rodents. *Nature Protocols*. 2007;2:322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
12. Cohen H., Matar M. A., Joseph Z. Animal models of post-traumatic stress disorder. *Current Protocols in Neuroscience*. 2013;9:9.45. DOI: 10.1002/0471142301.ns0945s64.
13. Bourin M., Hascoët M. The Mouse Light/Dark Box Test. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463:55–65. DOI: 10.1016/s0014-2999(03)01274-3.
14. Joyce W., Warwicker J., Shiels H. A., Perry S. F. Evolution and divergence of teleost adrenergic receptors: why sometimes 'the drugs don't work' in fish. *Journal of Experimental Biology*. 2023;226(19):jeb245859. DOI: 10.1242/jeb.245859.
15. Markin P. A., Brito A., Moskaleva N. E., Tagliaro F., Tarasov V. V., La Frano M. R., Savitskii M. V., Appolonova S. A. Short- and medium-term exposures of diazepam induce metabolomic alterations associated with the serotonergic, dopaminergic, adrenergic and aspartic acid neurotransmitter systems in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*. 2021;38:100816. DOI: 10.1016/j.cbd.2021.100816.
16. O'Daniel M. P., Petrunich-Rutherford M. L. Effects of chronic prazosin, an alpha-1 adrenergic antagonist, on anxiety-like behavior and cortisol levels in a chronic unpredictable stress model in zebrafish (*Danio rerio*). *PeerJ*. 2020;8:e8472. DOI: 10.7717/peerj.8472.
17. Venn R. M., Bradshaw C. J., Spencer R., Brealey D., Caudwell E., Naughton C., Vedio A., Singer M., Feneck R., Treacher D., Willett S. M., Grounds R. M. Preliminary UK experience of dexmedetomidine, a novel agent for postoperative sedation in the intensive care unit. *Anaesthesia*. 1999;54(12):1136–1142. DOI: 10.1046/j.1365-2044.1999.01114.x.
18. Hoehn-Saric R., Merchant A. F., Keyser M. L., Smith V. K. Effects of clonidine on anxiety disorders. *Archives of General Psychiatry*. 1981;38(11):1278–1282. DOI: 10.1001/archpsyc.1981.01780360094011.
19. Fox H., Sinha R. The role of guanfacine as a therapeutic agent to address stress-related pathophysiology in cocaine-dependent individuals. *Advances in Pharmacology*. 2014;69:217–265. DOI: 10.1016/B978-0-12-420118-7.00006-8.
20. Handley S. L., Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1984;327(1):1–5. DOI: 10.1007/BF00504983
21. Schramm N. L., McDonald M. P., Limbird L. E. The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(13):4875–4882. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-13-04875.2001.
22. Uys M. M., Shahid M., Harvey B. H. Therapeutic Potential of Selectively Targeting the α_2C -Adrenoceptor in Cognition, Depression, and Schizophrenia-New Developments and Future Perspective. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;8:144. DOI: 10.3389/fpsy.2017.00144.
23. Tekin N., Karamahmutoğlu T. E., Aykaç A., Akakin D., Gören M. Z. The α_2C -adrenoceptor antagonist JP-1302 controls behavioral parameters, tyrosine hydroxylase activity and receptor expression in a rat model of ketamine-induced schizophrenia-like deficits. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2022;221:173490. DOI: 10.1016/j.pbb.2022.173490.
24. Skorobogatova A. I., Terent'eva O. A., Okovityi S. V., Vainshstein V. A., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Targeted transport as a promising method of drug delivery to the central nervous system (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(9):33–39. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-9-33-39.
25. Khare P., Edgecomb S. X., Hamadani C. M., Tanner E. E. L., Manickam D. S. Lipid nanoparticle-mediated drug delivery to the brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2023;197:114861. DOI: 10.1016/j.addr.2023.114861.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1646>
УДК 615.21



Оригинальная статья / Research article

Холеотропная активность экстракта ладанника шалфеелистного

Е. Д. Семивеличенко, А. С. Ивкина, А. В. Караваева, А. Ю. Гришина, Е. И. Елецкая,
М. В. Краснова, К. О. Сидоров, И. А. Титович, Д. Ю. Ивкин ✉

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ORCID: Е. Д. Семивеличенко – <https://orcid.org/0000-0002-8464-7711>; А. С. Ивкина – <https://orcid.org/0000-0002-4938-1321>;
А. В. Караваева – <https://orcid.org/0000-0001-8231-6364>; А. Ю. Гришина – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>;
Е. И. Елецкая – <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>; М. В. Краснова – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>;
К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>.

Статья поступила: 10.11.2023

Статья принята в печать: 21.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Известно, что ряд видов рода ладанник используется в средиземноморской народной медицине в виде настоев и травяных чаев для лечения проблем с пищеварением и ОРВИ. Накопились эмпирические данные о том, что экстракт ладанника шалфеелистного улучшает состояние больных с хроническими холестатическими заболеваниями печени (ХЗП). В настоящее время единственным общепринятым препаратом для медикаментозного лечения большинства ХЗП является урсодезоксихолевая кислота (УДХК).

Цель. Сравнительная оценка эффективности испытуемого экстракта ладанника шалфеелистного (на 2 уровнях доз) и референтного препарата урсодезоксихолевой кислоты Урсосан® (в терапевтической дозе) при внутрижелудочном введении мышам на модели холестаза, вызванного внутрижелудочным введением в течение 20 дней масляного раствора альфа-нафтилизотиоцианата (АНИТ).

Материалы и методы. Модель холестаза вызвали внутрижелудочным введением мышам в течение 20 дней масляного раствора альфа-нафтилизотиоцианата. В сыворотке крови подопытных животных определяли следующие биохимические показатели: аланинаминотрансферазу, аспартатаминотрансферазу, щелочную фосфатазу, общий белок, холестерин общий, билирубин, триглицериды, альбумины. Гистологическому анализу подвергались печень и желчный пузырь.

Результаты и обсуждение. Экстракт ладанника в терапевтической дозе 253 мг/кг и в дозе, превышающей терапевтическую (506 мг/кг), а также референтный препарат урсодезоксихолевой кислоты Урсосан® в терапевтической дозе 150 мг/кг снижали уровень аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови, повышенный после введения АНИТ, до уровня в контрольной группе без патологии. Отклонения от контроля других показателей (аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, общего белка, холестерина общего, билирубина, триглицеридов, альбуминов) были статистически незначимы. Гистологический анализ печени и желчного пузыря показал, что выраженность баллоной дистрофии и холецистита значительно снижалась при лечении экстрактом ладанника в двух дозах, но не после введения препарата сравнения. На выраженность холестаза экстракт ладанника оказывал слабое влияние в отличие от препарата урсодезоксихолевой кислоты, который был более эффективным в отношении данной патологии.

Заключение. Проведенное исследование на фоне сообщений об эффективности экстракта ладанника шалфеелистного в клинической практике позволяет рекомендовать его к использованию в качестве компонента комбинированной терапии пациента с гепатобилиарной патологией и как средство фармакопревенции у здоровых людей при наличии факторов риска.

Ключевые слова: холестаз, баллонная дистрофия, холецистит, гепатит, урсодезоксихолевая кислота, альфа-нафтилизотиоцианат, Урсосан®, *Cistus salvifolius* L.

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

Вклад авторов. Д. Ю. Ивкину принадлежит научная идея и окончательная корректура статьи. А. С. Ивкина отвечала за дизайн эксперимента. А. В. Караваева проводила биохимический анализ. Е. Д. Семивеличенко, К. О. Сидоров, И. А. Титович и Е. И. Елецкая проводили моделирование холестаза. А. Ю. Гришина участвовала в обработке данных. А. В. Караваева, М. В. Краснова участвовали в написании статьи. Все авторы участвовали в обсуждении статьи.

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

Для цитирования: Семивеличенко Е. Д., Ивкина А. С., Караваева А. В., Гришина А. Ю., Елецкая Е. И., Краснова М. В., Сидоров К. О., Титович И. А., Ивкин Д. Ю. Холеотропная активность экстракта ладанника шалфеелистного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):247–253. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1646>

Choleotropic Activity of *Cistus salvifolius* Extract

Evgenii D. Semivelichenko, Arina S. Ivkina, Anna V. Karavaeva, Anna Yu. Grishina,
Elizaveta I. Eletskaia, Marina V. Krasnova, Kirill O. Sidorov,
Irina A. Titovich, Dmitry Yu. Ivkin ✉

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

✉ Corresponding author: Dmitry Yu. Ivkin. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

© Семивеличенко Е. Д., Ивкина А. С., Караваева А. В., Гришина А. Ю., Елецкая Е. И., Краснова М. В., Сидоров К. О., Титович И. А., Ивкин Д. Ю., 2023

© Semivelichenko E. D., Ivkina A. S., Karavaeva A. V., Grishina A. Yu., Eletskaia E. I., Krasnova M. V., Sidorov K. O., Titovich I. A., Ivkin D. Yu., 2023

ORCID: Evgenii D. Semivelichenko – <https://orcid.org/0000-0002-8464-7711>; Arina S. Ivkina – <https://orcid.org/0000-0002-4938-1321>;
Anna V. Karavaeva – <https://orcid.org/0000-0001-8231-6364>; Anna Yu. Grishina – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>;
Elizaveta I. Eletskaia – <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>; Marina V. Krasnova – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>;
Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>; Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>; Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>.

Received: 10.11.2023 Revised: 21.11.2023 Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. It is known that a number of species of the genus *Cistus* are used in Mediterranean folk medicine in the form of infusions and herbal teas to treat digestive problems and acute respiratory virus infection. Empirical data have accumulated that sage incense extract improves the condition of patients with chronic cholestatic liver diseases (CLDs). Currently, only ursodeoxycholic acid (UDCA) is the generally accepted drug for the treatment of most CLDs.

Aim. Comparative efficacy evaluation of *Cistus salvifolius* extract (at 2 doses levels) compared to the reference medicine ursodeoxycholic acid Ursosan® (at a therapeutic dose) in intragastric administration to mice in a cholestasis model induced by intragastric administration of alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT) oil solution during 20 Days.

Materials and methods. The cholestase model was induced by intragastric administration of an alpha-naphthylisothiocyanate oil solution to mice during 20 days. The following biochemical parameters were determined in the serum of experimental animals: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, total protein, total cholesterol, bilirubin, triglycerides, albumins. Histological analysis was performed on the liver and gallbladder.

Results and discussion. *Cistus salvifolius* extract at a therapeutic dose of 253 mg/kg and at a dose exceeding the therapeutic dose (506 mg/kg), as well as the reference medicine of Ursodeoxycholic acid Ursosan® at a therapeutic dose of 150 mg/kg reduced the level of aspartate aminotransferase in serum increased after ANIT administration to a level of the control group without pathology. Deviations of other parameters from the control group (alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, total protein, total cholesterol, bilirubin, triglycerides, albumins) were statistically insignificant. Histological analysis of the liver and gallbladder demonstrated that the severity of ballooning degeneration and cholecystitis were significantly reduced in groups which was treated by *Cistus salvifolius* extract at two doses, but not in the group with reference drug. The severity of cholestasis was poorly influenced by *Cistus salvifolius* extract in contrast to ursodeoxycholic acid, which was more effective for this pathology.

Conclusion. The conducted study against the background of reports on the effectiveness of the *Cistus salvifolius* extract in clinical practice allows to recommend its use as a component of combined therapy of a patient with hepatobiliary pathology and as a pharmacoprevention in healthy people in the presence of risk factors.

Keywords: cholecystitis, ballooning degeneration, cholecystitis, hepatitis, ursodeoxycholic acid, alpha-naphthylisothiocyanate, Ursosan®, *Cistus salvifolius*

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

Contribution of the authors. Dmitry Yu. Ivkin was responsible for the scientific idea and final proofreading of the article. Arina S. Ivkina was responsible for the design of the experiment. Anna V. Karavaeva conducted biochemical analysis. Evgenii D. Semivelichenko, Kirill O. Sidorov, Irina A. Titovich and Elizaveta I. Eletskaia conducted cholestasis modeling. Anna Y. Grishina participated in data processing. Marina V. Krasnova participated in writing the article All authors participated in the discussion 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: Semivelichenko E. D., Ivkina A. S., Karavaeva A. V., Grishina A. Yu., Yeletskaia E. I., Krasnova M. V., Sidorov K. O., Titovich I. A., Ivkin D. Yu. Choleotropic activity of *Cistus salvifolius* extract. *Drug development & registration*. 2023;12(4):247–253. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1646>

ВВЕДЕНИЕ

Холестаз представляет собой недостаточность выделения желчи, обусловлен нарушением ее выработки гепатоцитами или прекращением тока желчи по желчным протокам вплоть до дуоденального соочка. Этиология и механизмы развития многофакторны. Причины варьируют от механической обструкции печеночных протоков до токсического поражения печени. Нарушение оттока желчи в конечном счете приводит к поражению билиарных протоков и цитолизу гепатоцитов [1–3]. В настоящее время единственным общепринятым препаратом для медикаментозного лечения большинства хронических холес-

татических заболеваний печени (ХЗП) является урсодезоксиголевая кислота (УДХК) [4].

Накопились эмпирические данные о том, что экстракт ладанника шалфеелистного улучшает состояние больных с ХЗП. Это было отмечено как дополнительное действие пациентами, принимавшими данный экстракт с целью профилактики и лечения различных бактериальных инфекций верхних дыхательных путей. Известно, что ряд видов рода ладанник используется в средиземноморской народной медицине в виде настоев и травяных чаев для лечения проблем с пищеварением и ОРВИ [5]. В опытах *in vitro* и *in vivo* было показано, что водные

Таблица 1. Испытуемая субстанция и препарат сравнения

Table 1. Test substance and reference medicine

Характеристика Characteristic	Испытуемая субстанция Test substance	Препарат сравнения Reference medicine
Торговое название, производитель, формы выпуска Trade name, manufacturer, release forms	Экстракт травы ладанника сухой (Gehrlicher Pharmaceutical Extracts GmbH, Германия) <i>Cistus salviifolius</i> Herb extract (Gehrlicher Pharmaceutical Extracts GmbH, Germany)	Урсосан® (ЗАО «ЗиО-Здоровье», Россия), капсулы, 250 мг Ursosan® (CJSC ZiO-Health, Russia), capsules, 250 mg
Регистрационный номер Registration number	–	ПУ П N016302/01
МНН International non-proprietary name	–	Урсодезоксихолевая кислота Ursodeoxycholic acid
Активное вещество Active substance	Спиртовой экстракт травы ладанника шалфеелистного Ethanol extract of the herb <i>Cistus salviifolius</i>	Урсодезоксихолевая кислота, 250 мг Ursodeoxycholic acid, 250 mg
Вспомогательные вещества Auxiliary substances	Диоксид кремния безвод., мальтодекстрин (фармакоп.) Anhydrous silicon dioxide, maltodextrin (Ph. Eur.)	Крахмал кукурузный, крахмал кукурузный прежелатинизированный, кремния диоксид коллоидный, магния стеарат Corn starch, pregelatinized corn starch, colloidal silicon dioxide, magnesium stearate
Серия Series	7941	1901020
Годен до Best before	06.2023	09.2024
Условия хранения Storage conditions	В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С In a dry place protected from light at a temperature not higher than 25 °C	В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С In a dry place protected from light at a temperature not higher than 25 °C

экстракты листьев ладанника обладают антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активностью [5–14], а также антиоксидантной, противовоспалительной, антипролиферативной в отношении клеточной линии рака легкого человека и противодиабетической [8, 12, 13, 15, 16]. Все эти свойства авторы приписывают ряду фитоконпонентов, таких как терпеноиды, включая дитерпены, лабданоподобные дитерпены и клероданы, фенилпропаноиды, включая флавоноиды и эллаготаннины, нескольким группам алкалоидов и другим типам вторичных метаболитов [5, 7, 10, 12]. Показано, что кверцетин, выделенный из ладанника шалфеелистного, уменьшал экспрессию бактериально индуцированных провоспалительных маркеров [7].

Учитывая вышеизложенное, возникла идея проверить в эксперименте на животных, обладает ли экстракт травы ладанника шалфеелистного холетропной активностью.

Цель работы: сравнительная оценка эффективности испытуемого экстракта ладанника шалфеелистного (на 2 уровнях доз) по отношению к референтному препарату урсодезоксихолевой кислоты Урсосан® (в терапевтической дозе) при внутрижелудочном введении мышам на модели холестаза, вызванного внутрижелудочным введением в течение 20 дней масляного раствора альфа-нафтилизотиоцианата (АНИТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Краткое описание испытуемой субстанции и препарата сравнения представлено в таблице 1.

Контрольное вещество – вода очищенная в соответствии с ФС¹. Модель холестаза, вызванного масляным раствором альфа-нафтилизотиоцианата (АНИТ) [17].

Методом рандомизации были сформированы 5 групп мышей-самцов линии C57BL/6 по 19 особей массой 18–20 г в каждой группе. 1-я группа – интактные мыши, 2-я – модель «патология», 3-я – модель «патология + экстракт доза 1 (253 мг/кг)», 4-я – модель «патология + экстракт доза 2 (506 мг/кг)», 5-я – модель «патология + Урсосан® (150 мг/кг)». Моделирование холестаза проводили путем внутрижелудочного введения АНИТ через день в течение 20 дней при помощи шприца с иглой для кормления (24G, диаметр шара 1,25 мм; Braintree scientific, INC). Объем введения раствора на одно животное массой 20 г составлял 0,5 мл (0,04 мг АНИТ в 0,5 мл оливкового масла). Испытуемую субстанцию и препарат сравнения вводили животным внутрижелудочно в виде суспензий 1 раз в день в первой половине дня в течение 30 дней. Животные из контрольной груп-

¹ Государственная фармакопея РФ XIV издания. ФС.2.2.0020 «Вода очищенная». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-2-0020-15-voda-ochishhennaya/> Ссылка активна на 10.10.2023.

пы аналогичным образом получали контрольное вещество – воду очищенную.

Расчет дозировок препаратов для введения животным проводили при помощи коэффициентов пересчета доз для мышей и человека в зависимости от массы тела по E.J. Freireich (1966) [18]. Индивидуальный объем вводимой дозы для каждого животного рассчитывался исходя из значения массы тела, полученного после последнего взвешивания.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Животные получали *ad libitum* стандартный гранулированный корм «Полнораационный экструдированный комбикорм ЛБК-120 для лабораторных животных (крыс, мышей)» производства ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Россия, в кормовое углубление клетки.

Оценка внешнего вида животных проводилась в рамках ежедневного ветеринарного осмотра в период адаптации и проведения эксперимента. Масса тела регистрировалась при формировании групп, непосредственно перед первым введением, еженедельно в ходе исследования (для расчета объема введения).

Потребление корма и воды оценивалось визуально для каждой клетки содержания ежедневно до дачи следующей порции корма и воды. Лишение корма производилось за 24 часа перед запланированной, согласно схеме эксперимента, эвтаназией. Доступ к воде при этом не ограничивался. Животные подвергались эвтаназии на 31-й день после начала введения препаратов путем усыпления углекислым газом в CO₂-боксе модели THF3481-V01 (BIOSCAPE (EHRET), Германия). После эвтаназии тела животных были подвергнуты некропсии. Были исследованы внешнее состояние животного, кожи, шерстного покрова, проходов, видимых слизистых оболочек, а также органы грудной и брюшной полости, половые органы и скелетно-мышечная система. Взятие проб крови проводилось на 31-й день после начала введения препаратов не менее чем у 50 % животных из каждой группы. Пробы крови для исследований брали из ретроорбитального синуса в специальные пробирки с активатором свертывания.

Образцы крови после свертывания центрифугировали для получения сыворотки крови. В сыворотке крови подопытных животных определяли следующие биохимические показатели: аланинаминотрансферазу (АЛТ), аспартатаминотрансферазу (АСТ), щелочную фосфатазу (ЩФ), общий белок, холестерин общий, билирубин, триглицериды (ТГ), альбумины. Биохимический анализ производился на биохимическом автоматическом анализаторе производства Erba Lachema, Чехия.

Макроскопическое исследование печени и желчного пузыря животных всех групп было проведено после плановой некропсии на 31-й день после начала введения препаратов.

Гистологические препараты были исследованы методом световой микроскопии (x100) после стандартной проводки, нарезания на ротационном микротоме и окраски гематоксилин-эозином. Гистологическому анализу подвергались печень и желчный пузырь.

В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики: подсчитывались средние выборочные значения (M) и стандартные отклонения (SD) согласно рекомендациям Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [19], которые вместе со значением *n* (количество животных в группе) представлены в итоговых таблицах. Межгрупповые различия анализировали непараметрическими методами для множественного сравнения – критерий Манна – Уитни. Различия определяли при 0,05 уровне значимости. Использовалось программное обеспечение STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении 30 суток от начала эксперимента гибели животных не наблюдали. По результатам проведенного клинического осмотра отметили, что животные опытных групп после внутрижелудочного введения суспензий испытуемого средства и препарата сравнения выглядят и ведут себя практически так же, как и животные контрольной группы.

Средние значения биохимических показателей сыворотки крови животных, взятой на 31-й день эксперимента, приведены в таблице 2. Анализ полученных данных показал, что все отличия от контроля были статистически незначимы, за исключением показателя АСТ, который является важным маркером при повреждении печени. В группе № 2 (патология без лечения) наблюдали увеличение уровня данного фермента на 83 % по сравнению с контролем. Испытуемая субстанция в обеих дозах и препарат сравнения снижали данный показатель до уровня в контрольной группе (группа № 1). В данном случае можно говорить о гепатопротекторном действии данных препаратов. Уровень АЛТ изменялся аналогично, но менее выражено (уровень статистической значимости различий был меньше).

Результаты гистологического анализа в виде балльной оценки представлены в таблице 3. Гистологический анализ печени и желчного пузыря показал, что в группе № 2 (патология без лечения) у всех животных были выявлены патологические изменения: гранулематозный гепатит, баллонная дистрофия и эксудативный холецистит слабой и умеренно выраженной степени. Во всех случаях выявлен слабо выра-

Таблица 2. Влияние внутрижелудочного введения экстракта ладанника и препарата Урсосан® на биохимические показатели крови мышей-самок на фоне холестаза, вызванного АНИТ ($n = 10, M \pm SD$)

Table 2. Effect of intragastric administration of *Cistus salvifolius* extract and the Ursosan® on the biochemical parameters of the blood of female mice against the background of cholestasis caused by ANIT ($n = 10, M \pm SD$)

Показатели Indicators	Группа № 1 Group № 1	Группа № 2 Group № 2	Группа № 3 Group № 3	Группа № 4 Group № 4	Группа № 5 Group № 5
	Вода очищенная Purified water	Патология Pathology	Патология + экстракт Pathology + extract	Патология + экстракт Pathology + extract	Патология+ Урсосан® Pathology + Ursosan®
Доза, мг/кг Dose, mg/kg	–	–	253	506	150
АЛТ, МЕ/л ALT, IU/L	94,9 ± 34,9	103,6 ± 28,5	73,5 ± 28,2	73,2 ± 23,5	95,4 ± 27,2
АСТ, МЕ/л AST, IU/L	212,4 ± 6,6	389,3 ± 38,8*	179,8 ± 68,3**	190,2 ± 26,4**	207,3 ± 85,0**
ЩФ, МЕ/л AP, IU/L	158,1 ± 34,4	167,0 ± 29,7	141,4 ± 30,7	170,3 ± 27,3	194,1 ± 54,
Холестерин общий, мМ/л Total cholesterol, mM/L	1,38 ± 0,23	1,36 ± 0,29	1,46 ± 0,29	1,50 ± 0,18	1,53 ± 0,29
Общий белок, г/л Total protein, g/L	51,0 ± 5,1	51,5 ± 4,0	49,6 ± 1,2	51,2 ± 2,9	49,2 ± 3,0
Альбумин, г/л Albumin, g/L	35,2 ± 1,8	34,0 ± 2,5	34,2 ± 1,3	38,1 ± 2,6	36,4 ± 1,5
Билирубин, мкмоль/л Bilirubin, μmol/L	1,68 ± 0,54	1,26 ± 0,35	2,15 ± 0,97	1,29 ± 0,50	1,47 ± 0,61
ТГ, мМ/л TG, mM/L	0,84 ± 0,27	0,96 ± 0,40	0,87 ± 0,21	0,85 ± 0,13	0,96 ± 0,12

Примечание. * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой № 1.

** $p \leq 0,05$ по сравнению с группой № 2.

Note. * $p \leq 0.05$ compared to group № 1.

** $p \leq 0.05$ compared to group № 2.

Таблица 3. Влияние внутрижелудочного введения экстракта ладанника и препарата Урсосан® на изменения в печени, выявленные при гистологическом анализе на фоне холестаза, вызванного АНИТ

Table 3. The effect of intragastric administration of *Cistus salvifolius* extract and Ursosan® on changes in the liver detected by histological analysis against the background of cholestasis caused by ANIT

Группа Group	Баллонная дистрофия Ballooning degeneration	Жировая дистрофия Adipose degeneration	Степень активности гепатита Degree of hepatitis activity	Некроз Necrosis	Холестаз Cholestasis	Холецистит Cholecystitis
№ 1 Вода очищенная № 1 Purified water	0,5	0	1	0,16	0,33	0,33
№ 2 Патология № 2 Pathology	0,66	0	1,5	0	1	1,16
№ 3 Патология + экстракт № 3 Pathology + extract	0,16	0	1	0	0,83	0,16
№ 4 Патология + экстракт № 4 Pathology + extract	0,5	0	2	0	0,66	0,16
№ 5 Патология+ Урсосан® № 5 Pathology + Ursosan®	0,83	0	1	0	0,16	0,5

женный внутриклеточный холестаз. Жировой дистрофии и некрозов не было выявлено.

В группе № 3 (патология + экстракт 253 мг/кг) у всех животных были выявлены патологические изменения, но в меньшей степени, чем в группе № 2: гранулематозный гепатит и внутриклеточный холес-

таз слабой степени выраженности. В группе № 4 (патология + экстракт 506 мг/кг) значимых отличий от группы с патологией не наблюдали. В группе № 5 (патология + Урсосан® 150 мг/кг) был выявлен гранулематозный гепатит слабой степени выраженности, баллонная дистрофия слабой и умеренно вы-

раженной степени. Только в одном случае выявлен слабо выраженный внутриклеточный холестаза и эксудативный холецистит.

Таким образом, экстракт ладанника был более эффективен, чем препарат Урсосан® при лечении биллонной дистрофии и холецистита, вызванных введением АНИТ, но не в отношении холестаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования выявлено, что экстракт ладанника шалфеелистного, так же как референтный препарат урсодезоксихолевой кислоты Урсосан®, обладает холеотропной активностью. В частности, экстракт ладанника был более эффективен, чем препарат сравнения, при лечении биллонной дистрофии и холецистита, вызванных введением АНИТ. Полученные данные и сообщения об эффективности экстракта ладанника в клинической практике позволяют рекомендовать его к использованию в качестве компонента комбинированной терапии пациента с гепатобилиарной патологией и как средство фармакопревенции у здоровых людей при наличии факторов риска.

ЛИТЕРАТУРА

- Ивашкин В.Т., Широкова Е.Н., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Шифрин О.С., Маев И.В., Трухманов А.С. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Российского общества по изучению печени по диагностике и лечению холестаза. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2015;25(2):41–57.
- Yokoda R. T., Rodriguez E. A. Review: Pathogenesis of cholestatic liver diseases. *World Journal of Hepatology*. 2020;12(8):423–435. DOI: 10.4254/wjh.v12.i8.423.
- Полунина Т.Е. Терапевтические подходы к лечению холестатических заболеваний печени. *Терапия*. 2019;3:99–108.
- Вольнец Г.В., Хавкин А.И. Урсодезоксихолевая кислота и болезни печени. *Лечащий врач*. 2020;6:62–68.
- Papaefthimiou D., Papanikolaou A., Falara V. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties *Frontiers in Chemistry. Agricultural Biological Chemistry*. 2014;2:35.
- Tomás-Menor L., Morales-Soto A., Barrajon-Catalán E. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;55:313–322.
- Fernández-Calvet A., Euba B., Caballero L., Díez-Martínez R., Menéndez M., de Solórzano C. O., Leiva J., Micol V., Barrajon-Catalán E., Garmendia J. Preclinical Evaluation of the Antimicrobial-Immunomodulatory Dual Action of Xenohormetic Molecules against *Haemophilus influenzae* Respiratory Infection. *Biomolecules*. 2019;9(12):891; DOI: 10.3390/biom9120891.
- Carev I., Maravić A., Ilić N., Čulić V. Č., Politeo O., Zorić Z., Radan M. UPLC-MS/MS Phytochemical Analysis of Two Croatian *Cistus* Species and Their Biological Activity. *Life*. 2020;10:112. DOI: 10.3390/life10070112.
- Álvarez-Martínez F. J., Rodríguez J. C., Borrás-Rocher F., Barrajon-Catalán E., Micol V. The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition. *Scientific Reports*. 2021;11:588.

- Zalegh I., Akssira M., Bourhia M., Mellouki F., Rhallabi N., Salamatullah A. M., Alkaltham M. S., Alyahya H. K., Mhand R. A. A Review on *Cistus* sp.: Phytochemical and Antimicrobial Activities. *Plants*. 2021;10:1214. DOI: 10.3390/plants10061214.
- Есаулкова Я.Л., Мурылева А.А., Синегубова Е.О., Беляевская С.В., Гаршина А.В., Киреева М.А., Волобуева А.С., Слита А.В., Кадырова Р.А., Зарубаев В.В. Механизмы противовирусной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в отношении респираторных вирусов человека. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020;65(7–8):8–17. DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-7-8-17.
- Bouabidi M., Salamone F. L., Gadhi C. Efficacy of Two Moroccan *Cistus* Species Extracts against Acne Vulgaris: Phytochemical Profile, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities. *Molecules*. 2023;28(6):2797. DOI: 10.3390/molecules28062797.
- Ramiro Boy F., Casquete R., Martínez A., de Guía Córdoba M., Ruiz-Moyano S., José Benito M. Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(5):2475. DOI: 10.3390/ijerph18052475.
- Alamami A., Elshibani F., Alshalmani S. et al. High-performance Liquid Chromatography Analysis and Antimicrobial Activities of Libyan *Cistus salviifolius* Extract. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(56A):32–40.
- Abu-Orabi S. T., Al-Qudah M. A., Saleh N. R., Bataneh T. T., Obeidat S. M., Al-Sheraideh M. S., Al-Jaber H. I., Tashtoush H. I., Lahham J. N. Antioxidant Activity of Crude Extracts and Essential Oils from Flower Buds and Leaves of *Cistus creticus* and *Cistus salviifolius*. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020;13(7):6256–6266. DOI: 10.1016/j.arabj.2020.05.043.
- Sayah K., Mrabti H. N., Belarj B. Evaluation of antidiabetic effect of *Cistus salviifolius* L. (Cistaceae) in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. *The Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2021;32(2):121–127. DOI: 10.1515/jbcpp-2020-0044.
- Tingting Ya., Huifang M., Dengqiu X. Early indications of ANIT-induced cholestatic liver injury: Alteration of hepatocyte polarization and bile acid homeostasis. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;110:1–12.
- Freireich E. J., Gehan E. A., Rail D. P., Schmidt L. H., Skipper H. E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemotherapy Reports*. 1966;50(4):219–244.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012.

REFERENCES

- Ivashkin V. T., Shirokova E. N., Mayevskaya M. V., Pavlov Ch. S., Shifrin O. S., Mayev I. V., Trukhmanov A. S. Clinical guidelines of the Russian Gastroenterological Association and the Russian Society on Study of the Liver on Diagnostics and Treatment of Cholestasis. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2015;25(2):41–57. (In Russ.)
- Yokoda R. T., Rodriguez E. A. Review: Pathogenesis of cholestatic liver diseases. *World Journal of Hepatology*. 2020;12(8):423–435. DOI: 10.4254/wjh.v12.i8.423.
- Polunina T. E. Therapeutic approaches to the treatment of cholestatic liver diseases. *Therapy*. 2019;3:99–108. (In Russ.) DOI: 10.18565/therapy.2019.3.99-108.
- Volynets G. V., Khavkin A. I. Ursodeoxycholic acid and liver disease. *Attending doctor*. 2020;6:62–68. (In Russ.) DOI: 10.26295/OS.2020.75.99.012.
- Papaefthimiou D., Papanikolaou A., Falara V. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic,

- and pharmacological properties *Frontiers in Chemistry. Agricultural Biological Chemistry*. 2014;2:35.
6. Tomás-Menor L., Morales-Soto A., Barrañón-Catalán E. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;55:313–322.
 7. Fernández-Calvet A., Euba B., Caballero L., Díez-Martínez R., Menéndez M., de Solórzano C. O., Leiva J., Micol V., Barrañón-Catalán E., Garmendia J. Preclinical Evaluation of the Antimicrobial-Immunomodulatory Dual Action of Xenohormetic Molecules against *Haemophilus influenzae* Respiratory Infection. *Biomolecules*. 2019;9(12):891; DOI: 10.3390/biom9120891.
 8. Carev I., Maravić A., Ilić N., Čulić V. Č., Politeo O., Zorić Z., Radan M. UPLC-MS/MS Phytochemical Analysis of Two Croatian *Cistus* Species and Their Biological Activity. *Life*. 2020;10:112. DOI: 10.3390/life10070112.
 9. Álvarez-Martínez F. J., Rodríguez J. C., Borrás-Rocher F., Barrañón-Catalán E., Micol V. The antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* and *Punica granatum* plant extracts against clinical pathogens is related to their polyphenolic composition. *Scientific Reports*. 2021;11:588.
 10. Zalegh I., Akssira M., Bourhia M., Mellouki F., Rhallabi N., Salamattullah A. M., Alkaltham M. S., Alyahya H. K., Mhand R. A. A Review on *Cistus* sp.: Phytochemical and Antimicrobial Activities. *Plants*. 2021;10:1214. DOI: 10.3390/plants10061214.
 11. Esaulkova Y. L., Muryleva A. A., Sinegubova E. O., Belyaevskaya S. V., Garshinina A. V., Kireeva M. A., Volobueva A. S., Slita A. V., Kadyrova R. A., Zarubaev V. V. Mechanisms of Antiviral Activity of *Cistus Salviifolius* Extract Against Human Respiratory Viruses. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2020;65(7–8):8–17. (In Russ.) DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-7-8-8-17.
 12. Bouabidi M., Salamone F. L., Gadhi C. Efficacy of Two Moroccan *Cistus* Species Extracts against *Acne Vulgaris*: Phytochemical Profile, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities. *Molecules*. 2023;28(6):2797. DOI: 10.3390/molecules28062797.
 13. Ramiro Boy F., Casquete R., Martínez A., de Guía Córdoba M., Ruíz-Moyano S., José Benito M. Antioxidant, Antihypertensive and Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds Obtained from Native Plants by Different Extraction Methods. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(5):2475. DOI: 10.3390/ijerph18052475.
 14. Alamami A., Elshibani F., Alshalmani S. et al. High-performance Liquid Chromatography Analysis and Antimicrobial Activities of Libyan *Cistus salviifolius* Extract. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(56A):32–40.
 15. Abu-Orabi S. T., Al-Qudah M. A., Saleh N. R., Bataineh T. T., Obeidat S. M., Al-Sheraideh M. S., Al-Jaber H. I., Tashtoush H. I., Lahham J. N. Antioxidant Activity of Crude Extracts and Essential Oils from Flower Buds and Leaves of *Cistus creticus* and *Cistus salviifolius*. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020;13(7):6256–6266. DOI: 10.1016/j.arabjc.2020.05.043.
 16. Sayah K., Mrabti H. N., Belarj B. Evaluation of antidiabetic effect of *Cistus salviifolius* L. (Cistaceae) in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice. *The Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2021;32(2):121–127. DOI: 10.1515/jbcpp-2020-0044.
 17. Tingting Ya., Huifang M., Dengqiu X. Early indications of ANIT-induced cholestatic liver injury: Alteration of hepatocyte polarization and bile acid homeostasis. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;110:1–12.
 18. Freireich E. J., Gehan E. A., Rail D. P., Schmidt L. H., Skipper H. E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemotherapy Reports*. 1966;50(4):219–244.
 19. Guidelines for Preclinical Trials of Medicinal Products. Part 1. Moscow: Grif I K; 2012. (In Russ.)

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науке:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.

2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.

3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – <http://www.consort-statement.org>

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате A4 Microsoft Word (*.doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов. Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – <http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5trtkb73ae013ofk4g8nr1v1>)

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 исследование 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: Синдрол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, страну происхождения [пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете, в прослеживаемом формате, с четкими, разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т. д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n . Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, 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/ЕЕС) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по ал-

фавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации*, затем ставится знак = и дается английское название журнала (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychopharmacogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117 DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008-0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatr Scand*. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

Варианты библиографического описания патентов: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.citethisforme.com>.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *.tif, *.jpg, *.cdr, *.ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.



**АНАЛИТИКА
ЭКСПО**

22-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

16–18.04.2024

Москва, Крокус Экспо



Получите билет

analitikaexpo.com



ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER



Ваш промокод

pharmjournal

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 ВИНТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- Услуга комплексного перевода.
- Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.
Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.



Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: info@cpha.ru



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**