WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

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

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК Scopus

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Лабконцепт

РЕШЕНИЯ ОТ ГК «ЛАБКОНЦЕПТ»
для предприятий фармацевтической отрасли

- Поставка оборудования
- Собственное производство
- Собственная лаборатория
- Учебный центр
- Быстрый сервис
- Методическая поддержка

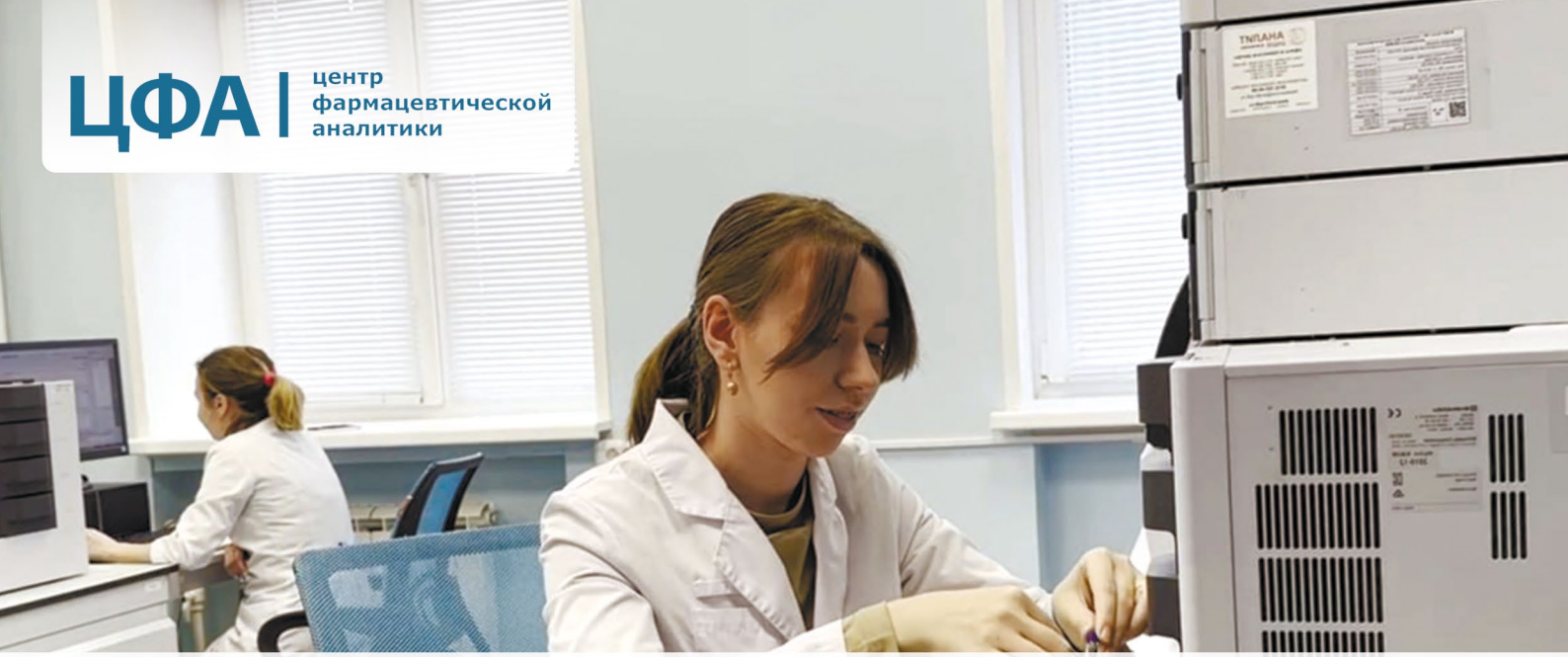
Санкт-Петербург +7 (812) 327-37-00 lc@labconcept.ru labconcept.ru

2024. Том 13, № 1 2024. Volume 13, No. 1

18+

Summum bonum medicinae sanitas

ЦФА | центр фармацевтической аналитики



ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих государственных программ развития фармацевтической промышленности (Фарма-2030)

Основными видами деятельности центра являются:

- **БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**
  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 EMA 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 противолекарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.

GLP сертификат

ISO сертификат

ЛИДЕР ОТРАСЛИ 2023

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 противолекарственных 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»

WWW.PHARMJOURNAL.RU

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

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2024. Том 13, № 1

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2024. Volume 13, No. 1

Цели и задачи журнала

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

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

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

Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества.

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

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

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

Емшанова С. В., д. фарм. н., начальник отдела научных разработок ЦКП (НОЦ) ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Ивкин Д. Ю., к. б. н., доцент, начальник центра экспериментальной фармакологии, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

Каленикова Е. И., проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

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

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

Куркин В. А., д. фарм. н., профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия

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

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

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

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

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

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

Оборотова Н. А., проф., д. фарм. н., НИМЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

Попов В. В., проф., д. м. н., зав. лабораторией профессиональной клинической фармакодинамики НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва, Россия

Русинов В. Л., чл. корр. РАН, д. х. н., директор Химико-технологического института ФГАОУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

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

Сливкин А. И., проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологи ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Смехова И. Е., профессор кафедры технологии лекарственных форм. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

Станишевский Я. М., д. х. н., проф., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

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

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

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

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

Чучалин В. С., д. фарм. н., заведующий кафедрой фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Эпштейн Н. А., к. х. н., зав. лабораторией Центра регистрации и разработки лекарственных средств ООО «Ирвин 2», Москва, Россия

Учредители печатной версии	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117246, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, 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 бульвар, д. 8, пом. 1/1
Издатель	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117246, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, 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 бульвар, 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, 2024
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Тираж	999 экземпляров
Цена	Свободная

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Focus and Scope of the journal

Research and production peer-reviewed journal **"Drug Development & Registration"** (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) is an up-to-date quarterly free application publication and information portal for Professionals involved in the circulation of medicines. Journal is designed for pharmaceutical manufacturers and their employees from the departments of development, quality control, registration, production and development; employees of laboratory centers, contract research organizations, scientific and educational institutions. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of drug development and registration, to increase the scientific and practical qualifications of specialists in the field of drug circulation. The main **five thematic sections** of the journal "Drug development & registration" (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) include the development lifecycle of a drug product from its creation to obtaining a marketing authorization.

The first section is devoted to the research and development of new medicines.

The second section one provides information about pharmaceutical technology, pharmaceutical ingredients, and equipment for drug development.

The third section describes analytical quality control methods.

The fourth section is devoted to approaches to evaluating the efficacy and safety of medicines, conducting clinical and preclinical studies.

The fifth section deals with the validation of methods, preparation of the registration dossier, the life cycle of the drug product in the GxP environment. Journal accepts for consideration both review and original papers. Both domestic and foreign researchers in the field of drug development and registration are invited to publication in the journal.

Editor-in-Chief

Igor E. Shohin, Dr. of Sci. (Pharm.), CEO in LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" / LLC "CPHA"), Moscow, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Vitaliy V. Khutoryanskiy, Prof., Dr. of Sci. (Chem.) (UK), University of Reading, Reading, United Kingdom

Rouslan I. Moustafine, Cand. of Sci. (Pharm.), Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan

Yury A. Skorik, Cand. of Sci. (Chem.), Institute of Macromolecular Compounds, Saint-Petersburg, Russia

Editorial board

Yulia I. Ammour, Cand. of Sci. (Biol.), Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Sera of RAMS, Moscow, Russia

Vladimir L. Beloborodov, Dr. of Sci., Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, Moscow, Russia

Mikhail V. Belousov, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

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

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

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

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

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

Svetlana V. Emshanova, Dr. of Sci. (Pharm.), RUDN University, Moscow, Russia

Dmitry Yu. Ivkin, Cand. of Sci, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Elena I. Kalenikova, Prof., Dr. of Sci., Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

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

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

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

Larisa I. Lavrenteva, as. Dr. of Sci., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

Oleg G. Makeev, Prof., Dr. of Sci. (Med.), The Central Research Laboratory of the Ural Medical University, Yekaterinburg, Russia

Evgeniya A. Malashenko, Cand. of Sci. Pharm., Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Yury V. Medvedev, Cand. of Sci. (Pharm.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Evgeny S. Melnikov, Cand. of Sci. (Pharm.), FSBI "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Igor I. Miroshnichenko, Dr. of Sci., Federal State Budget Scientific Institution "Scientific Center of Mental Health", Moscow, Russia

Natalia A. Oborotova, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Vladimir V. Popov, Prof., Dr. of Sci. (Med.), Joint Stock Company "Russian Railways", Moscow, Russia

Vladimir L. Rusinov, RAS c.-m., Dr. of Sci. (Chem.), Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

Arina I. Selezneva, Cand. of Sci., State Institute of Drugs and Good Practices, Moscow, Russia

Aleksei I. Slivkin, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Irina E. Smekhova, Dr. of Sci. (Pharm.), Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Yaroslav M. Stanishevskiy, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

Galina V. Sukoyan, Dr. of Sci. (Biol.) (Georgia), International Centre of Introduction of New Biomedical Technology, Tbilisi, Georgia

Boris B. Sysuev, as. Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Vadim N. Tashlitsky, Cand. of Sci. (Chem.), Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Olga V. Trineeva, Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Vladimir S. Chuchalin, Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Naum A. Epshtein, Cand. of Sci. (Chem.), Irvin-2 Company, Moscow, Russia

Print version founders	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia **I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)** Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia **Siberian State Medical University** Address: 2, Moscowskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
Online version founders	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
Publisher	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
Journal director	Natalia V. Kuldjanova
Managing Editor	Nadezhda S. Mikhaylova
Founded:	The journal has been published since November 2012.
Frequency	Quarterly
DOI Prefix	10.33380
ISSN print	2305-2066
ISSN online	2658-5049
Editorial office address	**LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA")** Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru
Printing house address	**LLC "MAX PRESS"** 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia
Copyright	© Drug development & registration, 2024
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Circulation	999 copies
Price	Free

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

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции 10

Поиск и разработка новых лекарственных средств

Оптимизация способа спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанциях
Е. В. Вишняков, А. А. Толстикова, Ю. Э. Генералова, А. К. Калдыбаева, И. И. Тернинко 18

Гефитиниб: комбинированная терапия и комплексные системы доставки (обзор)
Л. Л. Николаева, Е. В. Санарова, А. В. Ланцова 26

Фармацевтическая технология

Хроматографические методы контроля биологически активных добавок в смывах с имитационных моделей силиконовых лайнеров
С. В. Грибанова, И. Л. Удянская, В. Г. Янкова, Т. К. Слонская, Н. Б. Эпштейн, А. А. Жукова, О. Н. Плахотная, В. Н. Кузина 34

Ультразвуковая активация минеральных сорбентов
А. В. Бондарев, Е. Т. Жилякова, Н. В. Автина, Н. Б. Демина, К. К. Размахнин 45

Ретроспективный анализ производства и промышленного применения блок-сополимеров полиэтиленоксида и полипропиленоксида (обзор)
Е. О. Бахрушина, В. С. Пыжов, П. С. Сахарова, Н. Б. Демина, И. И. Краснюк 52

Разработка глазных пленок на основе импортозамещенного полоксамера эмуксол-268
Е. О. Бахрушина, А. Р. Тураева, Д. Р. Жалялова, Д. А. Климов, Н. Б. Демина, И. И. Краснюк 69

Исследование динамики высвобождения дифлунизала из полимерной матрицы
П. А. Михайлова, А. А. Адамова, Ю. Э. Генералова, П. П. Снетков, С. Н. Морозкина 75

Актуальность разработки стоматологического *in situ* имплантата для применения в пострезекционной терапии (обзор)
М. В. Помыткина, Е. О. Бахрушина, П. С. Сахарова, П. Д. Коногорова, Н. Б. Демина 81

Методы анализа лекарственных средств

Методы определения афлатоксинов и охратоксина А в лекарственном растительном сырье (обзор)
У. В. Иванова, И. В. Гравель 95

Люминесцентная микроскопия в идентификации близкородственных видов на примере рода *Persicaria* Mill.
А. А. Гудкова, А. С. Чистякова, А. И. Сливкин, А. С. Болгов 110

Сравнительное изучение профиля свободных аминокислот в подземных органах нескольких видов рода Rumex на разных фазах вегетационного цикла
А. М. Полуянов, У. А. Матвиенко, А. Ю. Соколова, А. Е. Савельева, Н. А. Дурнова, Н. В. Бобкова 120

Многократное использование биослоя QCM: подходы к регенерации в пьезокварцевых иммуносенсорах. Применение биосенсоров для обнаружения иммунохимических реакций (обзор)
С. С. Гогина, Е. А. Смирнова, Я. М. Станишевский, А. М. Стойнова 128

ВЭЖХ-УФ-анализ гликозидов флавоноидов в траве *Astragalus* (*A. dasyanthus*, *A. varius*, *A. testiculatus*, *A. henningii*), произрастающих на территории Поволжья
У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова, А. М. Полуянов, Н. В. Бобкова, Г. В. Раменская 139

Влияние выделенных из *Rubus chamaemorus* метаболитов на систему гемостаза в условиях *in vitro*
В. Г. Лужанин, А. В. Самородов, А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, Г. П. Яковлев, И. А. Самылина 149

Предварительный качественный анализ растительных образцов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии на присутствие стероидных сапогенинов некоторых представителей семейств диоскорейные, бобовые, лютиковые, мелантьевые и норичниковые
А. Е. Суханов, И. А. Крылов, В. В. Сепп, К. С. Бакулин 159

Доклинические и клинические исследования

Изучение антибактериальных и химических свойств металл-органических координационных полимеров Sr-BDC$_\infty$
А. А. Водяшкин, П. Кезимана, М. Дж. А. Мбарга, М. Ю. Путырская, Я. М. Станишевский 176

Биомаркеры ишемии головного мозга (обзор)
А. С. Самойлов, Е. И. Балакин, В. И. Пустовойт 182

Роль доксорубицина в формировании кардиотоксичности – общепринятое утверждение. Часть I. Распространенность и механизмы формирования (обзор)
Д. А. Андреев, Е. И. Балакин, А. С. Самойлов, В. И. Пустовойт 190

Сравнительная оценка диуретической активности настоев четырех видов рода астрагал (*Astragalus* L.) в эксперименте
У. А. Матвиенко, А. Ю. Каретникова, Н. А. Дурнова 200

Разработка и валидация методики на основе функционального клеточного теста для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека
М. А. Никифорова, И. А. Валуев, А. В. Петров, Е. Е. Бекетов, И. Е. Шохин 208

Изучение фармакокинетики препарата для перорального приема Эсперавир® (МНН: молнупиравир) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования
Т. Н. Комаров, Н. С. Багаева, К. К. Карнакова, К. Я. Заславская, П. А. Белый, И. Е. Шохин 216

Разработка и валидация методики количественного определения апиксабана в плазме крови с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС
У. Д. Филонова, П. К. Карнакова, К. К. Карнакова, М. О. Попова, А. А. Попова, О. А. Арчакова, Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин 224

Результаты доклинических исследований 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1H-1,2,4-триазол-4-ия бромида в отношении системы гемостаза в условиях *in vivo*
Ю. Ванг, Н. Р. Булатова, Е. Э. Клен, Г. А. Розит, И. Л. Никитина, Е. А. Смолярчук, К. А. Завадич, И. Д. Крылова, А. В. Самородов 241

Опыт проведения валидации методики оценки нейтрализующих антител ромиплостима в плазме крови человека
А. Н. Афанасьева, В. Б. Сапарова, И. Е. Макаренко, Т. А. Сельменских, Д. В. Куркин, А. Л. Хохлов, Р. В. Драй 247

Разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС
П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. Ю. Ивкин, Е. С. Ветрова, И. И. Тернинко, И. Е. Шохин, И. А. Наркевич 257

Оценка взаимного влияния монокомпонентов комбинированного лекарственного препарата, содержащего молнупиравир и фавипиравир, на фармакокинетику в рамках фазы I клинического исследования
Т. Н. Комаров, К. К. Карнакова, Н. С. Багаева, О. А. Арчакова, М. О. Попова, В. С. Щербакова, К. Я. Заславская, П. А. Белый, И. Е. Шохин 272

Изучение фармакокинетики препарата Арепливир® Цинк (МНН: фавипиравир + цинка глюконат) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования
Т. Н. Комаров, Н. С. Багаева, К. К. Карнакова, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, В. С. Щербакова, К. Я. Заславская, П. А. Белый, А. В. Таганов, И. Е. Шохин 281

Регуляторные вопросы

Влияние признаков штамма микроорганизма на объем исключительных прав
Ф. С. Иванов, К. В. Насонова 291

CONTENTS

Introduction 10

Research and development of new drug products

Optimization of the Method for Spectrofluorimetric Determination of Aluminum Impurities in Substances
Evgeniy V. Vishnyakov, Alexandra A. Tolstikova, Julia E. Generalova, Aigul K. Kaldybaeva, Inna I. Terninko 18

Gefitinib: Combination Therapy and Complex Delivery Systems (Review)
Lyudmila L. Nikolaeva, Ekaterina V. Sanarova, Anna V. Lantsova 26

Pharmaceutical Technology

Release Control of Biologically Active Substances from Simulation Model of Silicone Liners
Svetlana V. Gribanova, Irina L. Udyanskaya, Viktoriya G. Yankova, Tatiana K. Slonskaya, Natalia B. Epshtein, Anna A. Zhukova, Olga N. Plakhotnaya, Vera N. Kuzina 34

Ultrasonic Activation of Mineral Sorbents
Alexander V. Bondarev, Elena T. Zhilyakova, Natalya V. Avtina, Natalya B. Demina, Konstantin K. Razmakhnin 45

Retrospective Analysis of Polyethylene Oxide and Polypropylene Oxide Block Copolymers Production and Industrial Applications (Review)
Elena O. Bakhrushina, Victor S. Pyzhov, Polina S. Sakharova, Natalia B. Demina, Ivan I. Krasnyuk 52

Development of Ocular Inserts Based on Import Substituted Poloxamer Emuxol 268
Elena O. Bakhrushina, Anastasia R. Turaeva, Diana R. Zhalyalova, Daniil A. Klimov, Natalia B. Demina, Ivan I. Krasnuk 69

Study of the Dynamics of Diflunisal Release from a Polymer Matrix
Polina A. Mihajlova, Aleksandra A. Adamova, Yulia E. Generalova, Petr P. Snetkov, Svetlana N. Morozkina 75

Relevance of the Development of Dental *In situ* Implant for Post-resection Therapy (Review)
Maria V. Pomytkina, Elena O. Bakhrushina, Polina S. Sakharova, Polina D. Konogorova, Natalia B. Demina 81

Analytical Methods

Methods for the Determination of Aflatoxins and Ochratoxin A in Medicinal Plant Raw Materials (Review)
Ulyana V. Ivanova, Irina V. Gravel 95

Luminescence Microscopy in the Identification of Closely related Species Using the Example of the Genus *Persicaria* Mill.
Alevtina A. Gudkova, Anna S. Chistyakova, Aleksei I. Slivkin, Aleksei S. Bolgov 110

Comparative Study of Free Amino Acid Profiles in Underground Organs of Several Species of the Genus Rumex During Different Phases of the Vegetation Cycle
Andrey M. Poluyanov, Uliana A. Matvienko, Anna Yu. Sokolova, Anna E. Savelyeva, Natalya A. Durnova, Natalya V. Bobkova 120

Detection of Immunochemical Reactions Using Piezoquartz Immunosensor. Regeneration of the Electrode Bio-layer (Review)
Sofia S. Gogina, Ekaterina A. Smirnova, Yaroslav M. Stanishevskii, Anastasia M. Stoinova 128

HPLC-UV Analysis of Flavonoid Glycosides in the Herb of *Astragalus* (*A. dasyanthus*, *A. varius*, *A. testiculatus*, *A. henningii*), Growing in the Volga Region
Uliana A. Matvienko, Natalya A. Durnova, Andrey M. Poluyanov, Natalya V. Bobkova, Galina V. Ramenskaya 139

The Effect of Individual Compounds from *Rubus chamaemorus* on Hemostasis *in vitro*
Vladimir G. Luzhanin, Aleksandr V. Samorodov, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Whaley, Gennadi P. Yakovlev, Irina A. Samylina 149

Preliminary Qualitative Analysis of Plant Samples by High-performance Thin-layer Chromatography for the Presence of Steroid Sapogenins of Some Representatives of the Dioscoreacae, Fabaceae, Ranunculaceae, Melanthiaceae, Scrophulariaceae
Anton E. Sukhanov, Ilia A. Krylov, Vladislav V. Sepp, Konstantin S. Bakulin 159

Preclinical and clinical study

Antibacterial and Chemical Properties of Sr-BDC$_{\infty}$ Metal-Organic Framework (MOF)
Andrey A. Vodyashkin, Parfait Kezimana, Joseph Arsene A. Mbarga, Maria Y. Putirskaya, Yaroslav M. Stanishevskiy 176

Biomarkers of Brain Ischemia (Review)
Alexander S. Samoylov, Evgenii I. Balakin, Vasily I. Pustovoit 182

The Role of Doxorubicin in the Formation of Cardiotoxicity – Generally Accepted Statement. Part I. Prevalence and Mechanisms of Formation (Review)
Dmitry A. Andreev, Evgenii I. Balakin, Alexander S. Samoilov, Vasily I. Pustovoit 190

Comparative Evaluation of the Diuretic Activity of Infusions of Four Species of the Genus Astragalus (*Astragalus* L.) in the Experiment
Uliana A. Matvienko, Alena Yu. Karetnikova, Natalya A. Durnova 200

Development and Validation of the Cell-based Functional Method for Neutralizing Anti-adalimumab Antibodies Detection in Human Serum
Maria A. Nikiforova, Igor A. Valouev, Alexander V. Petrov, Evgeny E. Beketov, Igor E. Shokhin 208

Phase I Pharmacokinetics Study of Oral Administration of Esperavir® (INN: Molnupiravir) (LLC "PROMOMED RUS", Russia)
Timofey N. Komarov, Natalia S. Bagaeva, Kseniia K. Karnakova, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely, Igor E. Shohin 216

Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for Quantification of Apixaban in Human Plasma
Ulyana D. Filonova, Polina K. Karnakova, Kseniia K. Karnakova, Mariia O. Popova, Anna A. Popova, Olga A. Archakova, Timofey N. Komarov, Igor E. Shohin 224

Results of Preclinical Studies of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-th Bromide in Relation to the Hemostasis System *in vivo*
Yi Wang, Nailya R. Bulatova, Elena E. Klen, Galina A. Rozit, Irina L. Nikitina, Elena A. Smolyarchuk, Ksenia A. Zavadich, Irina D. Krylova, Aleksandr V. Samorodov 241

Experimental Validation a Method for Assessing Neutralizing Antibodies of Romiplostim in Human Plasma
Alina N. Afanaseva, Valeria B. Saparova, Igor E. Makarenko, Tatiana A. Selmenskikh, Denis V. Kurkin, Alexander L. Hohlov, Roman V. Drai 247

Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Quantitative Determination of Etmaben in Human Blood Plasma
Polina K. Karnakova, Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dmitry Yu. Ivkin, Evgeniya S. Vetrova, Inna I. Terninko, Igor E. Shohin, Igor A. Narkevich 257

Reciprocal Impact of Molnupiravir and Favipiravir Monocomponents of the Combination Drug on Each Other's Pharmacokinetics in a Phase I Clinical Trial
Timofey N. Komarov, Kseniia K. Karnakova, Natalia S. Bagaeva, Olga A. Archakova, Maria O. Popova, Victoria S. Shcherbakova, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely, Igor E. Shohin 272

Phase I Pharmacokinetics Study of Drug Areplivir® Zinc (INN: Favipiravir + Zinc Gluconate) (LLC "PROMOMED RUS", Russia)
Timofey N. Komarov, Natalia S. Bagaeva, Kseniia K. Karnakova, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Victoria S. Shcherbakova, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely, Alexey V. Taganov, Igor E. Shohin 281

Regulatory Issues

Affect of Features of a Microorganism Strain on a Scope of Exclusive Rights
Fedor S. Ivanov, Ksenia V. Nasonova 291

Редакционная статья / Editorial article

Интервью в рамках цикла «Мнение лидеров»

Представляем вашему вниманию новое интервью в рамках цикла «Мнение лидеров». Первым гостем цикла стал генеральный директор ООО «ЦФА», главный редактор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» доктор фармацевтических наук Шохин Игорь Евгеньевич.

Interview as Part of the "Leadership Opinion" Series

We present to your attention a new interview as part of the Leaders' Opinion series. The first guest of the series was the General Director of CFA LLC, editor-in-chief of the journal Development and Registration of Medicines, Doctor of Pharmaceutical Sciences Igor Evgenievich Shokhin.

В роли интервьюера выступил Полуянов Андрей Михайлович, генеральный директор ООО «СК». Спикеры подробно обсудили испытания твердых лекарственных форм, моделирование условий человеческого организма и направления развития отечественных фармацевтических компаний.

Андрей Михайлович: ***Учитывая Ваш многолетний опыт работы, а также статус лидера мнений в области теста сравнительной кинетики растворений, не могли бы Вы поделиться мыслями о текущем статусе данного испытания в области разработки и качества лекарственных препаратов?***

Игорь Евгеньевич: Тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР) – это важнейший метод исследования твердых дозированных лекарственных форм для приема внутрь. Данный тест может и должен быть применим на протяжении всего жизненного цикла лекарственного средства (ЛС), начиная от ранней разработки и заканчивая пострегистрационными изменениями. На этапе разработки твердой лекарственной формы ТСКР необходим для правильного подбора вспомогательных веществ, лекарственных форм и технологий для того, чтобы воспроизведенное лекарственное средство было максимально близко к оригинальному препарату по своему поведению в условиях *in vitro*. На этапе выхода клинических исследований ТСКР должен быть проведен с целью выбора биосерии лекарственного препарата, то есть той серии, которую будут принимать добровольцы в рамках исследования биоэквивалентности. Кроме того, дополнительные дозировки ЛС могут быть зарегистрированы без клинических исследований по процедуре биовейвера. ТСКР также используется для дополнительных дозировок. Более того, действующее законодательство стран ЕАЭС допускает в некоторых случаях для отдельных групп лекарственных средств – быстрорастворимых, относящихся к 1 или 3 классу биофармацевтической классификационной системы (БКС) – проведение их регистрации на основании процедуры биовейвера БКС без исследования биоэквивалентности, основываясь лишь на комплексе исследований *in vitro*. На этом роль ТСКР в жизненном цикле ЛС не заканчивается. После того как препарат пройдет экспертизу качества, получит регистрационное удостоверение, компании необходимо провести процедуры трансфера технологии на фармацевтическое предприятие, где опять придется проводить ТСКР. В дальнейшем препарат может быть подвергнут различным пострегистрационным изменениям, таким как смена поставщика субстанции, смена вспомогательных веществ, смена техно-

Андрей Михайлович Полуянов
Генеральный директор ООО «СК»

логии или технологического оборудования. Во всех этих случаях действующее законодательство ЕАЭС требует проведения теста ТСКР для того, чтобы подтвердить постоянство и неизменность биологических свойств препарата, начиная с серии, которая прошла клинические исследования, до уже выпускаемых промышленных серий. Подводя итог, можно сказать, что тест сравнительной кинетики растворения занял свою твердую, надежную позицию в процедуре регистрации лекарственных средств согласно действующим требованиям ЕЭК. Надеюсь, будет оставаться там и играть ключевую роль и в дальнейшем.

Андрей Михайлович: ***Игорь Евгеньевич, на основании Вашего многолетнего опыта могли бы Вы сказать, есть ли какие-то недостатки у данного испытания?***

Игорь Евгеньевич: Что касается недостатков данного испытания. К испытанию скорее относится тест «Растворение», который проводится для контроля качества фармацевтического предприятия в рамках рутинного посерийного контроля препарата. Как я обычно отвечаю, ТСКР – это ongoing science. Это прекрасный тест, который занял свою определенную нишу. Однако его следует дополнять некими, более совершенными испытаниями. Прекрасно зарекомендовавший себя ТСКР является достаточно простой моделью. Моделью желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), где в сосудах для растворения моделируется то, что происходит с таблеткой при приеме внутрь. К сожалению, абсолютно все процессы ЖКТ смоделировать нельзя. Например, современные тестеры растворения не могут моделировать процесс проницаемости, то есть абсорбцию через мембраны клеток энтероцитов, а также некоторые другие процессы, например эффект первого прохождения через печень, дуодено-гастральный рефлюкс. Буферные растворы тоже не вполне соответствуют реальным физиологическим растворам. Например, бикарбонатный буфер, на котором строится вся физиология, к сожалению, невозможно смоделировать в тестере растворения. ТСКР следует проводить всегда, однако не исключено, что его нужно дополнить чем-то новым, чем-то физиологически релевантным.

Андрей Михайлович: ***Игорь Евгеньевич, подскажите, существуют ли какие-то биопредиктивные тесты для оценки поведения лекарственного препарата в организме человека in vitro?***

Игорь Евгеньевич: Андрей, Вы имеете ввиду какие-то тесты, которые применяются в дополнение к обычному тесту?

Андрей Михайлович: ***Да.***

Игорь Евгеньевич: Хороший вопрос! Какого-то финального теста, который бы широко применялся, к сожалению, нет. Разные научные группы идут разными путями. Один из путей – это создание биорелевантных сред растворения. Это специальные среды, которые позволяют наиболее точно отразить состав ЖКТ. К сожалению, из-за экономических ограничений есть сложности в доставке биорелевантных сред в Россию. Есть и некие другие пути. Например, двухфазное растворение, когда в попытках смоделировать процесс проницаемости в тестер добавляется еще слой октанола, моделирующий границу раздела фаз «октанол – вода», так же как и границу раздела «липидный бислой энтероцитов – содержимое тонкого кишечника». Тест не нашел широкого применения из-за сложности работы с октанолом в условиях классических контрольно-аналитических лабораторий. Были попытки сделать полноценного гомункулуса. Например, голландская компания TIM собрала огромный стенд, на нем смоделировала полностью ЖКТ человека, включая микрофлору. Однако, к сожалению, все эти инструменты характеризуются не самой высокой робастностью и высокой стоимостью. Да, разные научные группы идут разными научными путями, но я искренне надеюсь, что рано или поздно классический тест сравнительной кинетики растворения будет дополнен каким-то научным моделирующим испытанием, в связке с которым можно будет предсказывать с достаточно высокой долей достоверности (строить ту самую корреляцию *in vivo* / *in vitro*), как поведет себя препарат в ЖКТ человека.

Система tiny-TIM (TNO gastroIntestinal Model)

Андрей Михайлович: ***Большое спасибо за ответ. Последний вопрос. В каком направлении Вы посоветуете двигаться отечественным фарма-***

цевтическим производителям в области разработки и контроля качества твердых лекарственных форм?

Игорь Евгеньевич: Вы задали очень актуальный вопрос. Это крайне важно с точки зрения обеспечения технологического суверенитета Российской Федерации в условиях санкционных ограничений. Не секрет, что некоторые зарубежные фармкомпании приостановили поставки лекарственных сред в Российскую Федерацию. Важнейшей задачей отечественной фармпромышленности является их быстрое замещение. Однако просто быстрого замещения недостаточно. Необходимо разработать качественный, эффективный и безопасный препарат. В первую очередь ориентируем разработчиков на то, чтобы они следовали действующему законодательству союза, решению ЕАЭС № 78 и № 85 с его многочисленными приложениями. Обязательно оптимизировали состав, пробовали разные лекарственные формы, использовали различные предиктивные тесты, применяли ТСКР в необходимом объеме, проводили исследования биоэквивалентности с привлечением надежных партнеров – как с точки зрения клиники, так и с точки зрения аналитики. Конечно же, в первую очередь стремились к обеспечению эффективности и безопасности лекарственного средства. Очень важно обеспечить единство фармацевтической разработки и клинической разработки, то есть, с одной стороны, группа разработчиков создает лекарственную форму, а с другой стороны, клинический отдел адекватным образом готовит протокол о клиническом исследовании, далее проводит данное испытание на группе здоровых добровольцев. Мне нередко приходится ездить по заводам, по фармкомпаниям с целью проведения обучения по исследованию биоэквивалентности, тесту растворения и другим вопросам. Получается иногда в рамках обучения знакомить между собой отдел разработки фармпредприятия и медицинский отдел и ориентировать их на совместную и единую работу. Только в таком случае удается достичь комбинации высокого качества и высокой скорости, необходимой для вывода препарата на рынок.

Посмотреть интервью можно на нашем YouTube-канале.

Мнение Лидеров®

Рекламная статья / Sponsored article

Решения от ГК Лабконцепт для предприятий фармацевтической отрасли

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке ООО «Лабконцепт»

Группа компаний Лабконцепт – официальный дистрибьютор ведущих производителей аналитического и общелабораторного оборудования. Лабконцепт предлагает комплексные решения для оснащения лабораторий разных направленностей, в том числе и для фармацевтической отрасли. Фармацевтическая отрасль России продолжает развиваться и расширять перечень и объемы выпускаемых лекарственных средств, что неминуемо влечет за собой необходимость создания новых и расширения существующих лабораторий по контролю качества выпускаемых препаратов. В условиях санкционного давления многие привычные производители аналитического оборудования ушли с рынка. При этом, растет потребность в надёжном и эффективном аналитическом и испытательном оборудовании. Группа компаний Лабконцепт предлагает решения, на практике апробированные в собственной лаборатории, в частности, тестеры растворения от Haosoo Instruments (Hanon Group) и анализаторы общего органического углерода под собственной OEM-маркой SILab. Обе линейки приборов соответствуют требованиям фармакопеи США, европейской фармакопеи EP и Государственной Фармакопеи РФ.

Labconcept Group Solutions for Pharmaceutical Industry

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

The Labconcept Group is the official distributor of leading manufacturers of analytical and general laboratory equipment. Labconcept offers comprehensive solutions for equipping laboratories of various fields, including for the pharmaceutical industry. The pharmaceutical industry in Russia continues to develop and expand the volumes of manufactured medicines, which inevitably entails the need to create new and expand existing laboratories for quality control of manufactured drugs. Under the conditions of sanctions pressure, many familiar manufacturers of analytical equipment have left the market. At the same time, there is a growing need for reliable and efficient analytical and testing equipment. The Labconcept Group offers solutions that have been tested in own laboratory, in particular, dissolution testers from Haosoo Instruments (Hanon Group) and total organic carbon analyzers under its own OEM brand SILab. Both lines of devices comply with the requirements of the US Pharmacopoeia, the European Pharmacopoeia and the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Фармацевтическая отрасль России продолжает развиваться и расширять перечень и объемы выпускаемых лекарственных средств, что неминуемо влечет за собой необходимость создания новых и расширения существующих лабораторий по контролю качества выпускаемых препаратов.

Одним из основных методов оценки качества твердых дозированных лекарственных форм является тест «Растворение». Скорость высвобождения действующего вещества из лекарственной формы существенно влияет на степень всасывания, особенно в случае твердых лекарственных форм[1]. По этой причине фармакопеи разных стран включают тест «Растворение», позволяющий *in vitro* предвидеть поведение лекарственного средства в условиях живого организма[2]. Нормы теста «Растворение» (количество активного вещества, перешедшее в среду растворения к определенному моменту времени и время растворения) устанавливают на основании экспериментальных исследований в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм»[3]. При этом, воспроизводимость получаемых результатов играет критическую роль при выборе оборудования под данную задачу. Кроме того, следует отметить, что для рутинных анализов также ключевое значение имеет удобство эксплуатации приборов.

[1] Раменская Г. В., Шохин И. Е. Современные подходы к оценке генерических лекарственных средств при их регистрации (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2009;43(6):30–34.

[2] FDA, Electronic Orange Book, Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. 20th Edition. 2000.

[3] ОФС 1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. 2018.

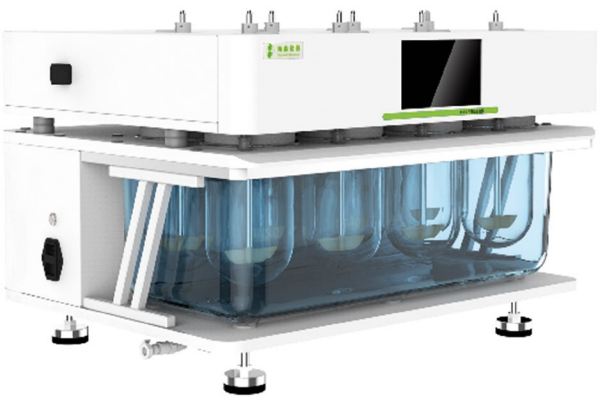
В условиях санкционного давления многие привычные производители аналитического оборудования ушли с рынка. При этом, растет потребность в надежном и эффективном аналитическом и испытательном оборудовании.

Группа компаний Лабконцепт является официальным дистрибьютором производителя тестеров растворения Haosoo Instruments на территории России. Данная компания входит в один из наиболее активно развивающихся и современных китайских холдингов Hanon, специализирующихся на разработке и производстве лабораторного и аналитического оборудования. Тестеры растворения Haosoo Instruments сочетают в себе высокую степень автоматизации, простоту управления и высокую воспроизводимость результатов. Их программное обеспечение отвечает требованиям 21CFR part 11/FDA. Технические параметры всей линейки тестеров растворения Haosoo Instruments полностью соответствуют требованиям фармакопеи США (реализуемые USP методы 1, 2, 5, 6), европейской фармакопеи EP и Государственной Фармакопеи РФ ОФС.1.4.2.0014.15 (аппарат I и II):

- USP Метод 1. Корзинка (соответствует Аппарат I «Вращающаяся корзинка» ОФС.1.4.2.0014.15) (набор аксессуаров входит в базовую комплектацию приборов).
- USP Метод 2. Лопасть (соответствует Аппарат II «Лопастная мешалка» ОФС.1.4.2.0014.15) (набор аксессуаров входит в базовую комплектацию приборов).
- USP Метод 5. Лопасть над диском (опция).
- USP Метод 6. Вращающийся цилиндр (опция).

Тестеры растворения Haosoo Instruments поставляются в трех исполнениях.

1. Модель **DT06** с 8-ю сосудами, автоматическим лифтом верхней крышки и ручным отбором проб (через канюли в верхней крышке). Система имеет одновременно привлекательную стоимость и высокое качество. Предназначена для лабораторий с небольшим объемом тестов.



2. Модель **DT08** с 8-ю сосудами, автоматическим лифтом верхней крышки и автоматическим лифтом станции отбора проб с пробоотборными канюлями.

3. Модель **DT12**. Функционал данного прибора идентичен модели DT08, однако дополнен большим количеством сосудов для растворения (12 сосудов), что позволяет анализировать единовременно 12 образцов или 2 серии по 6 образцов параллельно в идентичных условиях. Модель DT12 спроектирована для лабораторий с большим количеством тестов.

Для моделей DT08 и DT12 доступно дооснащение автосамплерами (SC08 и SC12).

Автосамплеры сочетают в себе:

✓ автоматическую станцию отбора проб;

- ✓ прецизионные перистальтические насосы (8 или 12 шт.) для автоматического отбора проб (точность дозирования – менее ±0,5 %), фильтрации образцов и добавления чистого растворителя в сосуды;
- ✓ коллектор фракций (на 128 или 192 позиций) для хранения образцов как в стеклянных пробирках, так и в ВЭЖХ виалах объемом 1,5 мл с септами.

Тестеры растворения Haosoo Instruments имеют следующие преимущества:

- встроенный 7-ми дюймовый сенсорный дисплей для управления прибором, с интегрированными функциями редактирования и хранения методов, разграничением прав доступа и входом по отпечатку пальца, журналом событий;
- порты для автоматического сброса таблетки/капсулы;
- баня (температура регулируется в диапазоне от комнатной до 55 °C) с функциями предварительного нагрева, мониторинга уровня жидкости и защиты от перегрева, подсветкой и встроенным в рециркуляционную линию бани стерилизатором (для замедления роста микроорганизмов);
- встроенный в модели DT08 и DT12 микропринтер с функцией печати результатов анализа по одному нажатию клавиши.

Другой немаловажной задачей, стоящей перед фармацевтическим предприятиями России, является выполнение высоких стандартов чистоты технологического оборудования при производстве активных фармацевтических субстанций (АФС) и готовой продукции.

В фарминдустрии применяются различные виды технологического оборудования, которые могут использоваться для изготовления лекарственных средств, относящихся к различным классам фармакологических групп. В соответствии с ГОСТ Р 52249-2009 такое оборудование должно подвергаться полноценной и качественной очистке для исключения загрязнения препаратов разного рода контаминантами с целью производства безопасных лекарственных препаратов. Такая очистка оборудования особенно актуальна при производстве широкой номенклатуры препаратов, так как одна и та же технологическая линия может использоваться для различных продуктов, где перекрёстное загрязнение должно быть полностью исключено.

Для валидации очистки технологического оборудования чаще всего применяются анализаторы общего органического углерода, которые по показателю TOC (общий органический углерод) позволяют оценить суммарное загрязнение органическими соединениями.

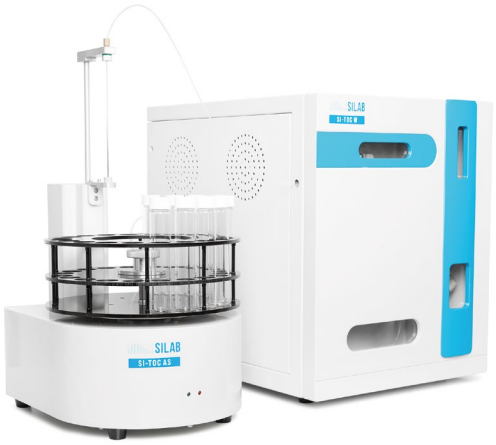
Для оценки полноты и качества проведенной очистки оборудования используют два метода отбора проб: отбор проб с поверхности (метод свабов – соскоб тампоном со стен технологического оборудования) и метод смывов (анализ промывных вод).

Данные методы анализа позволяют оценить не только наличие органической составляющей препаратов изготавливаемой партии продукта, но и другие загрязнения, например, моющие средства или остаточные содержания органики в промывных водах, которые применялись для очистки технологического оборудования.

Таким образом, чистота воды фармацевтического назначения (очищенной, ультрачистой, инъекционной), используемой как для очистки оборудования, так и для производства АФС и готовых лекарственных форм является одним из наиболее критичных факторов, способным повлиять на безопасность и эффективность готового продукта.

Анализаторы общего органического углерода серии SI-TOC, выпускаемые под собственной маркой SILab от ГК Лабконцепт, отлично подходят для анализа различных типов воды фармацевтического назначения и проведения валидации очистки оборудования.

Модель **SI-TOC W** сочетает химическое «мокрое» и УФ-окисление пробы с последующим бездисперсионным ИК-детектированием (NDIR). Такой принцип позволяет проводить полное окисление и добиться низких пределов обнаружения в 5 мкг/л (ppb) [для



TC (общий углерод), IC (неорганический углерод)], а также анализировать пробы даже с минимальным содержанием общего органического углерода (TOC) с высокой достоверностью, например, в ультрачистой и инъекционной воде. Для большинства фармпредприятий содержание TOC в воде не должно превышать 0,5 мг/л (ppm).

Модель **SI-TOC CA** работает по принципу каталитического окисления в широком диапазоне (от 680–1000 °C) с последующим бездисперсионным ИК-детектированием (NDIR). Такой принцип позволяет проводить полное окисление даже трудноокисляемых органических соединений, в то же время для менее требовательных и сложных образов можно использовать и низкие температуры окисления. Наличие 6-ти портового крана обеспечивает автоматическое разбавление образца, подкисление и промывку. Пределы обнаружения для данной модели составляют около TC 50 мкг/л (ppb), IC 20 мкг/л (ppb).

Модель **SI-TOC Line** работает по принципу УФ-окисления пробы и измерения электропроводности для количественного определения общего органического углерода TOC. Для полного окисления

органических соединений, содержащихся в исследуемых пробах воды, применяется двухволновая (185/254 нм) лампа, что обеспечивает низкие пределы обнаружения в 1 мкг/л (ppb).

Предназначена для экспресс-контроля качества воды фармацевтического назначения (ультрачистой и инъекционной).

Программное обеспечение моделей SI-TOC W и SI-TOC Line соответствует требованиям целостности и прослеживаемости данных, FDA 21 CFR part 11, GxP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение в фармацевтической промышленности анализаторов общего органического углерода для проведения валидации очистки оборудования позволяет быстро оценить общий уровень загрязнения оборудования таким суммарным показателем, как TOC (общий органический углерод). При превышении установленного на предприятии значения содержания TOC пользователем оперативно могут быть предприняты меры по дополнительной очистке оборудования для изготовления следующей партии продукта.

Анализатор общего органического углерода SI-TOC W прекрасно подходит для анализа TOC в очищенной, ультрачистой и инъекционной воде фармацевтического назначения согласно требованиям различных фармакопей (ГФ РФ, EP, USP)[1, 2, 3], которые предписывают вычислять общий органический углерод (TOC), как разницу между общим углеродом (TC) и неорганическим углеродом (IC), а анализатор общего органического углерода SI-TOC Line предназначен для экспресс-контроля воды фармацевтического назначения.

Тестеры растворения Haosoo Instruments обеспечат воспроизводимость результатов измерений, а высокая степень их автоматизации и простота управления позволит снизить нагрузку на персонал лаборатории. Линейка оборудования включает в себя разнообразные комплектации, от моделей с полностью ручным отбором проб для лабораторий с небольшим количеством тестов до полуавтоматических систем растворения, оснащенных автосамплерами для автоматизированного отбора проб, фильтрации образцов, добавления чистого растворителя в сосуды и хранением отобранных проб для последующего анализа.

[1] ОФС.1.2.1.0026.18 «Определение содержания общего органического углерода в воде для фармацевтического применения».

[2] EP 2.2.44 "Total Organic Carbon in Water for Pharmaceutical Use".

[3] USP 643 "Total Organic Carbon".

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1530
УДК 543.423.3

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Оптимизация способа спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанциях

Е. В. Вишняков[1]✉, А. А. Толстикова[1], Ю. Э. Генералова[1], А. К. Калдыбаева[2], И. И. Тернинко[1]

[1] 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, 14, лит. А
[2] Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова (КазНМУ). 050000, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Толе Би, д. 88, к. 4

✉ **Контактное лицо:** Вишняков Евгений Владимирович. **E-mail:** evgeniy.vishnyakov@pharminnotech.com

ORCID: Е. В. Вишняков – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866; А. А. Толстикова – http://orcid.org/0009-0007-6400-9951;
Ю. Э. Генералова – http://orcid.org/0000-0002-2573-6036; А. К. Калдыбаева – https://orcid.org/0000-0002-9328-457X;
И. И. Тернинко – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015.

Статья поступила: 21.08.2023 **Статья принята в печать:** 25.12.2023 **Статья опубликована:** 09.01.2024

Резюме

Введение. Оценка содержания примесей является важнейшим этапом в подтверждении безопасности и эффективности при контроле качества лекарственного средства. Алюминий, являясь допустимой примесью в ряде фармацевтических субстанций, способен пагубно воздействовать на организм человека, вследствие чего его содержание нормируется. Примесь алюминия в Государственной фармакопее РФ XV определяется спектрофлуориметрическим методом с применением лиганда – 8-гидроксихинолина в хлороформе. В настоящей работе предлагается заменить 8-гидроксихинолин на более доступный рутин, который также образует с металлами флуоресцирующие комплексы. Данный подход предполагает исключение из пробоподготовки этапа экстракции комплекса алюминия в хлороформ, что способствует повышению точности методики, а замена хлороформа положительным образом сказывается на безопасности.

Цель. Создание альтернативного метода спектрофлуориметрического определения примеси алюминия с помощью рутина на примере субстанции калия хлорид.

Материалы и методы. В качестве материалов исследования использовали следующие субстанции и реактивы: ГСО алюминий-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО железо-иона (II), 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО цинк-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО свинец-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО никель-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО медь-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); стандарт катиона хрома (III), 1 мг/мл (имп., Sigma-Aldrich, США); рутин (имп., Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., Китай); аммоний уксуснокислый (имп., Molekula GmbH, Германия), уксусная кислота ледяная (х. ч., АО «База № 1 Химреактивов», Россия); калия хлорид (ФС, ООО «МЗХР», Россия). Спектрофлуориметрическое исследование проводилось на приборе FL 6500 (PerkinElmer Inc., США). Содержание примеси алюминия также оценивалось с использованием атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) Optima 8000 (PerkinElmer Inc., США) и стандартного образца Multi-Element Solution (PerkinElmer Inc., США).

Результаты и обсуждение. Подход, приведенный в статье, исключает использование 8-гидроксихинолина в хлороформе и заменяет его на рутин в 70%-м спирте этиловом. Комплекс алюминия с рутином имеет длину волны возбуждения при 445 нм и длину волны эмиссии при 565 нм. Предложенная методика была апробирована на субстанции калия хлорид для оценки показателя «Алюминий», содержание которого не должно превышать 0,0001 %. Валидация методики осуществлялась по трем параметрам: «специфичность», «линейность» и «предел обнаружения» (ОФС.1.1.0012). Сопоставление полученных данных проводилось с применением атомно-эмиссионной спектроскопии, в ходе которой была доказана релевантность методики.

Заключение. Разработан эргономичный способ спектрофлуориметрического определения примеси алюминия с помощью рутина с апробацией на субстанции калия хлорид. Результаты, полученные в ходе эксперимента, были подтверждены методом АЭС-ИСП.

Ключевые слова: спектрофлуориметрия, рутин, алюминий, примеси, валидация, атомно-эмиссионная спектрометрия

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

Вклад авторов. И. И. Тернинко принадлежит идея и дизайн эксперимента. Е. В. Вишняков и И. И. Тернинко координировали все этапы эксперимента. А. А. Толстикова, Е. В. Вишняков провели спектрофлуориметрическое исследование и валидацию методики по определению допустимой примеси алюминия в субстанция «калия хлорид». Ю. Э. Генералова провела оценку содержания примеси алюминия в субстанции «калия хлорид» методом атомно-эмиссионной спектрометрии. А. К. Калдыбаева, Е. В. Вишняков осуществляли поиск научной литературы. 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: Вишняков Е. В., Толстикова А. А., Генералова Ю. Э., Калдыбаева А. К., Тернинко И. И. Оптимизация способа спектрофлуориметрического определения примеси алюминия в субстанциях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):18–25. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1530

© Вишняков Е. В., Толстикова А. А., Генералова Ю. Э., Калдыбаева А. К., Тернинко И. И., 2024
© Vishnyakov E. V., Tolstikova A. A., Generalova J. E., Kaldybaeva A. K., Terninko I. I., 2024

Optimization of the Method for Spectrofluorimetric Determination of Aluminum Impurities in Substances

Evgeniy V. Vishnyakov[1]✉, Alexandra A. Tolstikova[1], Julia E. Generalova[1], Aigul K. Kaldybaeva[2], Inna I. Terninko[1]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] Asfendiyarov Kazakh National Medical University. 88/4, Tole Bi str., Almaty, 050000, Republic of Kazakhstan

✉ **Corresponding author:** Evgeniy V. Vishnyakov. **E-mail:** evgeniy.vishnyakov@pharminnotech.com

ORCID: Evgeniy V. Vishnyakov – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866; Alexandra A. Tolstikova – http://orcid.org/0009-0007-6400-9951; Julia E. Generalova – http://orcid.org/0000-0002-2573-6036; Aigul K. Kaldybaeva – https://orcid.org/0000-0002-9328-457X; Inna I. Terninko – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015.

Received: 21.08.2023 **Revised:** 25.12.2023 **Published:** 09.01.2024

Abstract

Introduction. Evaluation of the content of impurities is the most important step in confirming the safety and efficacy in the quality control of the medicinal product. Aluminum, being an acceptable impurity in a number of pharmaceutical substances, can adversely affect the human body, as a result of which its content is normalized. The admixture of aluminum in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XV is determined by the spectrofluorimetric method using the ligand – 8-hydroxyquinoline in chloroform. In the present work, it is proposed to replace 8-hydroxyquinoline with the more accessible rutin, which also forms fluorescent complexes with metals. This approach involves the exclusion of the stage of extraction of the aluminum complex into chloroform from sample preparation, which improves the accuracy of the technique, and the replacement of chloroform has a positive effect on safety.

Aim. To create an alternative approach for the spectrofluorimetric determination of aluminum impurities using rutin and "potassium chloride" as an active pharmaceutical ingredient.

Materials and methods. The following substances and reagents were used as research materials: CRS of aluminum ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS of iron ion (II) 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS of zinc ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS of lead-ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS nickel-ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), CRS copper-ion 1 mg/ml (LLC "EKROSHIM", Russia), chromium (III) cation standard 1 mg/ml (imp., Sigma-Aldrich, USA) rutin (imp., Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., China), ammonium acetic acid (imp., Molekula GmbH, Germany), glacial acetic acid (chemically pure, JSC "Base No. 1 Himreaktivov", Russia), potassium chloride (pharmaceutical substance, LLC "MZHR", Russia). The spectrofluorimetric study was carried out on an FL 6500 instrument (PerkinElmer Inc., USA). The aluminum impurity content was also evaluated using an Optima 8000 inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP AES) (PerkinElmer Inc., USA) and a Multi-Element Solution standard sample (PerkinElmer Inc., USA).

Results and discussion. The approach given in the article eliminates the use of 8-hydroxyquinoline in chloroform and replaces it with rutin in 70 % ethyl alcohol. The aluminum-rutin complex has an excitation wavelength at 445 nm and an emission wavelength at 565 nm. The proposed method was tested on the substance "Potassium chloride" to assess the indicator "Aluminum", the content of which should not exceed 0.0001 %. Method validation was carried out according to three parameters "Specificity", "Linearity" and "Limit of detection". Comparison of the data obtained was carried out using atomic emission spectroscopy, during which the relevance of the technique was proved.

Conclusion. An ergonomic approach has been developed for the spectrofluorimetric determination of aluminum impurities using rutin with approbation on the substance "Potassium chloride". The results obtained during the experiment were confirmed by the ICP AES method.

Keywords: spectrofluorimetry, rutin, aluminum, impurities, validation, atomic emission spectrometry

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. Inna I. Terninko owns the idea and design of the experiment. Evgeniy. V. Vishnyakov and Inna I. Terninko coordinated all stages of the experiment. Alexandra A. Tolstikova, Evgeniy V. Vishnyakov conducted a spectrofluorimetric study and validation of the methodology for determining the permissible admixture of aluminum in the substance "potassium chloride". Julia E. Generalova assessed the content of aluminum impurities in the substance "potassium chloride" by atomic emission spectrometry. Aigul K. Kaldybaeva, Evgeniy V. Vishnyakov carried out a search for scientific literature. All authors participated in writing the text of the article and in discussing the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center" of the Federal State. Budgetary Educational University of Higher Education SPCPU of the Ministry of Health of Russia in the framework of agreement № 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Vishnyakov E. V., Tolstikova A. A., Generalova J. E., Kaldybaeva A. K., Terninko I. I. Optimization of the method for spectrofluorimetric determination of aluminum impurities in substances. *Drug development & registration*. 2024;13(1):18–25. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1530

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы стандартизации и контроля качества продолжают оставаться актуальным направлением фармацевтического анализа, так как являются основным способом оценки безопасности и эффективности лекарственного средства (ЛС) [1, 2]. Одним из основных элементов качества ЛС являются примеси, к оценке которых предъявляются строгие требования и реализуются новые регуляторные решения. Так, решение Коллегии ЕЭК от 4.10.2022 № 138 «Об

утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей»[1] содержит четкую алгоритмизацию действий при составлении спецификаций на новые и воспроизведенные лекарственные средства при определении примесей.

Примеси металлов на сегодняшний момент находятся в фокусе внимания специалистов аналитического сектора ввиду неоднозначных (полуколичественных) способов оценки, рекомендованных фармакопеей, а также ввиду возможного токсического действия на организм человека [3–5]. При этом вышеуказанный регуляторный документ выделяет примеси элементов в отдельную категорию и приводит их четкую классификацию в ЛС и подходы к оценке «польза – риск». Алюминий – металл, который относится к низкотоксичным элементам, поэтому для его примеси не установлен класс токсичности и не рассчитано допустимое суточное воздействие. Однако при контроле качества лекарственных препаратов, которые применяются для коррекции нарушения функции почек (например, «Вода для гемодиализа»), оценка содержания алюминия необходима. Кроме того, алюминий – экзогенный фактор развития анемии, рахита, а также болезни Альцгеймера [6].

В литературных источниках представлено большое количество методик, основанных на различных аналитических методах, которые позволяют определять примесь алюминия в ЛС и пищевых продуктах. Стоит отметить, что оценка элементных примесей исходя из требований руководства ICH Q3 должна осуществляться в первую очередь инструментальными методами. Например, примесь алюминия можно определять атомно-абсорбционной спектроскопией (ААС), атомно-эмиссионной спектроскопией (АЭС) с различными вариантами атомизации и детекции (спектрофотометрический, масс-селективный детекторы), рентгенофлуоресцентным анализом, спектрофлуориметрией и др. [7–9].

В литературе [10–12] представлены хроматографические методики обнаружения примеси алюминия с применением ион-парной хроматографии с детектором светорассеяния или со спектрофлуориметрическим детектором. В качестве лиганда рекомендованы алюминон, 8-гидроксихинолин. В работе [10] оценку содержания примесей алюминия в сточных водах проводили с применением обращенно-фазовой хроматографии с УФ-детектором. В качестве лиганда использовали кверцетин – агликон рутина.

Метод потенциометрического детектирования алюминия [13] основан на применении алюминиевого датчика, где в качестве нейтрального носителя используется AlMCM-41 в матрице из поливинилхлорида (ПВХ).

На данный момент в ГФ РФ XV представлена методика спектрофлуориметрического определения алюминия[2] с использованием 8-гидроксихинолина в хлороформе, которая применяется в анализе некоторых фармацевтических субстанций: лимонной кислоты[3], калия хлорида[4], натрия хлорида[5], воды для инъекций[6], воды очищенной[7]. Но, учитывая токсичность хлороформа и высокую стоимость лиганда (8-гидроксихинолина), а также наличие стадии экстракции полученного комплекса, что может приводить к количественным девиациям и увеличивать неопределенность методики, актуальным является вопрос о коррекции спектрофлуориметрической методики определения алюминия. Руководствуясь тем, что рутин может образовывать флуоресцирующие комплексы с катионами металлов [14] и при этом является более доступным и дешевым лигандом по сравнению с 8-гидроксихинолином, можно прийти к заключению, что целесообразность его использования для контроля содержания алюминия в различных лекарственных средствах с помощью спектрофлуориметрического метода является оправданной. Исходя из этого, **целью настоящего исследования** было создание альтернативного метода спектрофлуориметрического определения алюминия с помощью рутина с последующей апробацией оптимизированной методики на субстанции калия хлорид. Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**: определить длину волны возбуждения и эмиссии комплекса алюминия с рутином; подобрать условия анализа, опираясь на методику, представленную в ГФ; разработать альтернативную методику определения примеси алюминия; провести валидацию пред-

[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 10.09.2023.

[2] ОФС.1.2.2.2.0001 «Алюминий». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-2/1-2-2-2/alyuminiy/?sphrase_id=341995. Ссылка активна на 10.09.2023.

[3] ФС.2.1.0024.15 «Лимонная кислота». Государственная фармакопея РФ. XIV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/2/2-1/limonnaya-kislota-limonnaya-kislota-acidum-citricum/?sphrase_id=341997. Ссылка активна на 10.09.2023.

[4] ФС.2.2.0009 «Калия хлорид». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-2/kaliya-khlorid/?sphrase_id=341998. Ссылка активна на 10.09.2023.

[5] ФС.2.2.0014 «Натрия хлорид». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-2/natriya-khlorid/?sphrase_id=342000. Ссылка активна на 10.09.2023.

[6] ФС.2.2.0019 «Вода для инъекций». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-2/voda-dlya-inektsiy/?sphrase_id=342002. Ссылка активна на 10.09.2023.

[7] ФС.2.2.0020 «Вода очищенная». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-2/voda-ochishchennaya/?sphrase_id=342006. Ссылка активна на 10.09.2023.

ложенной методики; апробировать данную методику на субстанции калия хлорид; для подтверждения достоверности полученных данных сопоставить их с результатами другого аналитического метода, например атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследования применялись следующие субстанции и реактивы: ГСО алюминий-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО железо-иона (II), 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО цинк-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО свинец-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО никель-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); ГСО медь-иона, 1 мг/мл (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия); стандарт катиона хрома (III), 1 мг/мл (имп., Sigma-Aldrich, США); рутин (имп., Sichuan Guangsong Pharmaceutical Co., Ltd., Китай); аммоний уксуснокислый (имп., Molekula GmbH, Германия); уксусная кислота ледяная (х. ч., АО «База № 1 Химреактивов», Россия); калия хлорид (ФС, ООО «МЗХР», Россия). Подбор оптимальных условий с целью создания альтернативной методики определения содержания примеси алюминия в лекарственных средствах с дальнейшей ее апробацией опирался на уже имеющиеся подходы, представленные в ГФ РФ, ОФС.1.2.2.2.0001 «Алюминий» и ФС.2.2.0009 «Калия хлорид».

Определение оптимальной длины волны возбуждения и эмиссии комплекса алюминия с рутином проводилось с использованием спектрофлуориметра FL 6500 (PerkinElmer Inc., США) в режиме синхронизированного сканирования. Раствор комплекса готовили следующим образом: в мерную колбу объемом 50 мл помещали 10 мл стандартного раствора алюминий-иона (1 мкг/мл) (ОФС.1.2.2.2.0001 «Алюминий»), 10 мл ацетатного буферного раствора (pH 6,0) для создания среды, затем 10 мл раствора рутина в 70%-м спирте с концентрацией 0,5 мг/мл, перемешивали, доводили до метки буферным раствором (pH 6,0), приготовленным с использованием pH-метра (Mettler Toledo, Швейцария) по методике, приведенной в ОФС.1.3.0003 «Буферные растворы». Предварительно определяли интенсивность флуоресценции рутина с концентрацией 0,1 мг/мл при длине волны возбуждения и эмиссии комплекса.

Построение градуировочной зависимости интенсивности флуоресценции комплекса от содержания алюминия (мкг) осуществлялось для оценки валидационных параметров «предел обнаружения» и «линейность» (ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик»)[1]. В мерные колбы вместимостью 50 мл помещали стандартный раствор алюминий-иона (C = 1 мкг/мл): 2, 3, 4, 5 и 6 мл соответственно. В каждую колбу добавляли 10 мл ацетатного буфера (pH 6,0), затем 10 мл раствора рутина в 70%-м спирте с концентрацией 0,5 мг/мл, перемешивали и доводили до метки буферным раствором. Измеряли интенсивность флуоресценции комплекса рутина с алюминием при его характерной длине волны возбуждения (445 нм) и длине волны эмиссии (565 нм). Исходя из этого, линейный диапазон включал в себя пять точек, среди которых две (2, 3 мкг) были ниже, а две другие (5, 6 мкг) – выше предельной (4 мкг), установленной для субстанции калия хлорида (ФС.2.2.0009 «Калия хлорид»).

Для определения алюминия в образце хлорида калия методом АЭС-ИСП готовили и использовали следующие растворы.

Растворитель – 1%-й раствор азотной кислоты, для приготовления которой использована концентрированная азотная кислота (х. ч., ООО «НПФ Химмедсервис», Россия), свежеперегнанная.

Стандартный образец Multi-Element Solution (растворитель – 5%-й HNO_3, концентрация алюминия – 10 мг/л, производитель – PerkinElmer, США).

Градуировочные растворы готовили путем разбавления мультиэлементного стандартного раствора (C = 10 мг/л) до концентраций 0,1; 0,5; 1,0 мг/л.

Испытуемые растворы – образец хлорида калия массой 1 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли и доводили до метки растворителем. При норме содержания алюминия в образце не более 0,0001 % значение интенсивности эмиссии в испытуемом растворе не должно превышать нижней точки градуировки.

Раствор для проверки правильности – образец хлорида калия массой 1 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл растворителя, добавляли 1 мл градуировочного раствора с концентрацией 1,0 мг/л, доводили до метки растворителем. Измерения проводили в условиях, представленных в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены спектры возбуждения и эмиссии комплекса, на которых отмечены соответствующие максимумы. Исходя из этого можно сделать вывод о том, что наибольшая интенсивность флуоресценции при 565 нм возникает при длине волны возбуждения 445 нм.

Альтернативный подход к определению алюминия в субстанции калия хлорида опирался на методику, представленную в ГФ, ФС.2.2.0009 «Калия хлорид» (показатель «Алюминий»). Суть коррекции состоит в замене лиганда 8-гидроксихинолина в хлороформе на рутин в 70%-м спирте. Таким образом, в альтернативном подходе исключается использование токсичного растворителя, а также происходит замена дорогостоящего лиганда (8-гидроксихиноли-

[1] ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Государственная фармакопея РФ. XV изд. Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/?sphrase_id=342054. Ссылка активна на 10.09.2023.

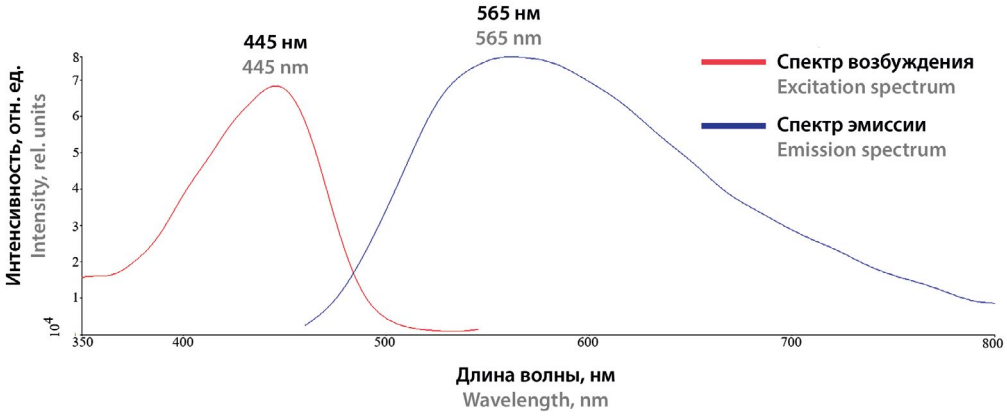


Рисунок 1. Спектры возбуждения и эмиссии комплекса рутина с алюминием

Figure 1. Excitation and emission spectra of the complex of rutin with aluminum

на) на более дешевый (рутин). Стоит отметить и экспрессность альтернативной методики по сравнению с предусмотренной ГФ методикой в связи с отсутствием этапа экстракции алюминия из водной фазы в хлороформ, содержащий лиганд. Кроме того, процесс экстракции не всегда сопровождается полным количественным переходом, что существенно отражается на точности полученных данных.

Таблица 1. Условия анализа методом АЭС-ИСП

Table 1. Conditions for ICP AES analysis

Длины волн Wavelengths	237,313 нм 394,401 нм 396,153 нм 237,313 nm 394,401 nm 396,153 nm
Время интегрирования Integration time	1 с 1 sec
Число повторов интегрирования Number of integration iterations	5
Скорость потока плазмообразующего газа Plasma gas flow rate	10 л/мин 10 L/min
Скорость потока дополнительного газа Additional gas flow rate	0,2 л/мин 0,2 L/min
Скорость потока газа для распыления пробы Sample spray gas flow rate	0,7 л/мин 0,7 L/min
Мощность плазмы Plasma power	1300 Вт 1300 W
Положение обзора эмиссии Emission statement	Аксиальный Axial
Скорость подачи образца Sample feed rate	1,5 мл/мин 1,5 ml/min

Экспериментально нами ранее было подтверждено, что оптимальным значением pH для связывания металла с лигандом является 6,0. При более высоких значениях водородного показателя увеличивается вероятность образования осадка гидроксида алюминия, что приводит к снижению интенсивности флуоресценции комплекса. При более низких значениях pH происходит недостаточное депротонирование лиганда (рутина), что уменьшает вероятность образования комплекса и, как следствие, также снижает интенсивность флуоресценции. Объем рутина (0,5 мг/мл), который необходимо добавить к навеске, содержащей алюминий-ион, составил 10 мл, что оптимально с точки зрения избытка лиганда и чувствительности методики.

Исходя из вышесказанного, мы предлагаем следующую альтернативную методику определения примеси алюминия в субстанции калия хлорида. В мерную колбу вместимостью 50 мл к испытуемому раствору (4,0 г субстанции калия хлорида в 10 мл ацетатного буферного раствора с pH 6,0) добавляют 10 мл раствора рутина в 70%-м спирте ($C = 0,5$ г/мл), доводят до метки ацетатным буферным раствором (pH 6,0). В мерные колбы вместимостью 50 мл к эталонному раствору (4 мл стандартного раствора алюминий-иона 1 мкг/мл) и контрольному раствору (10 мл ацетатного буферного раствора с pH 6,0) добавляли 10 мл буферного раствора (pH 6,0), затем 10 мл раствора рутина в 70%-м спирте ($C = 0,5$ мг/мл), доводили до метки ацетатным буферным раствором с pH 6,0. Измеряли интенсивность флуоресценции испытуемого, эталонного и контрольного растворов при характерной длине волны возбуждения (445 нм) и длине волны флуоресценции (565 нм) комплекса алюминия с рутином. Флуоресценция испытуемого раствора не должна превышать флуоресценцию эталонного раствора.

Валидацию методики проводили по параметрам «специфичность», «предел обнаружения», «линейность».

Линейность. Построение градуировочной зависимости проводилось на пяти пробах с различным содержанием алюминий-иона (2, 3, 4, 5, 6 мкг). Линейная зависимость интенсивности эмиссии комплекса от содержания алюминия с коэффициентом корреляции более 0,995 представлена на рисунке 2.

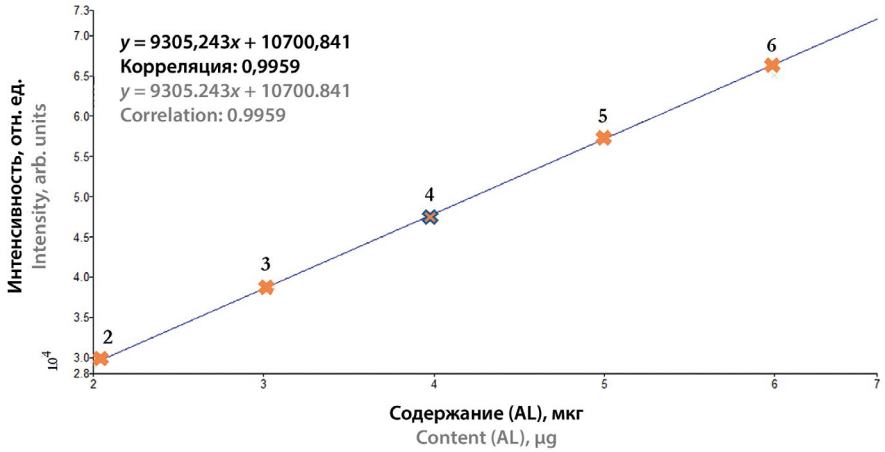


Рисунок 2. Градуировочная зависимость интенсивности флуоресценции комплекса алюминия с рутином от концентрации алюминий-иона

Figure 2. Calibration dependence of the fluorescence intensity of the complex of aluminum with rutin on the aluminum ion concentration

Специфичность. Значения максимумов на спектрах возбуждения и эмиссии составили (445 ± 2) нм и (565 ± 2) нм соответственно (см. рисунок 1). Для характеристики специфичности предложенной альтернативой методики также оценено влияние сопутствующих ионов (Zn^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+}) на определение примеси алюминия при возможном совместном присутствии (таблица 2).

Данные таблицы 2 дают возможность экспериментально подтвердить отсутствие влияния других катионов (Zn^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+}) при заданных условиях на результат анализа примеси алюминия. Однако необходимо отметить, что при совместном присутствии всех анализируемых катионов возможно частичное уменьшение интенсивности флуоресценции комплекса алюминия, что приводит к незначительному снижению количественных характеристик результатов анализа.

Исходя из данных таблицы 3 также показано, что матрица субстанции калия хлорида не мешает обнаружению катиона алюминия после добавления стандартной добавки (4 мкг).

Предел обнаружения. Предел обнаружения (ПО) рассчитывали по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту градуировочного графика:

$$\text{ПО} = 3{,}3 \cdot \frac{S}{b} = \frac{3{,}3 \cdot 1785{,}23}{9305{,}243} = 0{,}7 \text{ мкг},$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала; b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой). Стандартное отклонение аналитического сигнала оценивалось путем определения интенсивности флуоресценции раствора рутина с концентрацией 0,1 мг/мл (контрольный раствор) в пяти повторностях.

Таблица 2. Оценка влияния катионов Zn^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+} на количественное определение примеси алюминия

Table 2. Evaluation of the effect of Zn^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+} cations on the quantitative determination of aluminum impurity

Растворы (состав). Содержание ионов в мкг Solutions. Ion content in μg	Интенсивность флуоресценции, отн. ед. Fluorescence intensity, arb. units	Измеренное содержание Al, мкг Measured Al content, μg	Доверительный интервал Confidence interval X ± SD
Al^{3+}, 4 мкг Zn^{2+}, 4 мкг Al^{3+}, 4 μg Zn^{2+}, 4 μg	50062	4,23	4,21 ± 0,04
	49783	4,20	
	49876	4,21	
Al^{3+}, 4 мкг Fe^{2+}, 4 мкг Al^{3+}, 4 μg Fe^{2+}, 4 μg	49783	4,20	4,19 ± 0,03
	49597	4,18	
	49689	4,19	
Al^{3+}, 4мкг Pb^{2+}, 4 мкг Al^{3+}, 4 μg Pb^{2+}, 4 μg	49410	4,16	4,16 ± 0,04
	49597	4,18	
	49318	4,15	
Al^{3+}, 4 мкг Cr^{3+}, 4 мкг Al^{3+}, 4 μg Cr^{3+}, 4 μg	49465	4,17	4,16 ± 0,02
	49603	4,18	
	49201	4,14	
Al^{3+}, 4 мкг Ni^{2+}, 4 мкг Al^{3+}, 4 μg Ni^{2+}, 4 μg	49803	4,20	4,19 ± 0,02
	49744	4,20	
	49500	4,17	
Al^{3+}, 4мкг Cu^{2+}, 4 мкг Al^{3+}, 4 μg Cu^{2+}, 4 μg	49404	4,16	4,14 ± 0,02
	49186	4,14	
	49005	4,12	
Al^{3+}, 4 мкг Zn^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+}, по 4 мкг Al^{3+}, 4 μg Zn^{2+}, Fe^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+}, 4 μg each	48504	4,06	4,04 ± 0,03
	48333	4,04	
	48015	4,01	

Таблица 3. Оценка влияния матрицы субстанции калия хлорида на количественное определение примеси алюминия

Table 3. Evaluation of the influence of the substance matrix of potassium chloride on the quantitative determination of aluminum impurities

№	Интенсивность флуоресценции, отн. ед. Fluorescence intensity, arb. units	Содержание, мкг Content, μg	Доверительный интервал Confidence interval X ± SD
KCl 4,0 г + Al^{3+} 4 мкг KCl 4.0 g + Al^{3+} 4 μg			
I	48201	4,03	4,03 ± 0,05
II	48387	4,05	
III	48015	4,01	

Апробация методики осуществлялась на субстанции калия хлорида. В таблице 4 представлены значения интенсивности флуоресценции эталонного, контрольного и испытуемых растворов.

Таблица 4. Значения интенсивности флуоресценции эталонного, контрольного и испытуемых растворов

Table 4. Intensities of reference, control and test solutions

№	Интенсивность эталонного раствора (I_2) (0,0001 %), отн. ед. Reference solution intensity (I_2) (0,0001 %), arb. units	Интенсивность контрольного раствора (I_3), отн. ед. Control solution intensity (I_3), arb. units	Интенсивность испытуемого раствора (I_1), отн. ед. Test solution intensity (I_1), arb. units	Заключение Conclusion
1	47720,18	1785,23	6353,78	$I_2 - I_3 > I_1 - I_3$
2			7324,28	$I_2 - I_3 > I_1 - I_3$
3			7208,78	$I_2 - I_3 > I_1 - I_3$

Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать заключение о том, что содержание алюминия в субстанции калия хлорида не превышает содержания алюминия в эталонном растворе (*не более 0,0001 %*).

Достоверность данных подтверждали сравнением результатов анализа, полученных скорректированным спектрофлуориметрическим методом, с данными, полученными методом АЭС-ИСП. Для анализа использовали несколько длин волн, для которых характерны разные значения пределов обнаружения, величины шумов и мешающего влияния других компонентов пробы. На каждой длине волны были записаны спектры эмиссии и измерены интенсивности эмиссии растворителя и градуировочных растворов, рассчитаны метрологические характеристики. Результаты расчетов представлены в таблице 5.

Следует отметить, что, несмотря на приемлемые результаты коэффициента корреляции на всех длинах волн, измерения при 308,215 и 309,271 нм отличаются высокими пределами обнаружения, высоким сигналом шума, наложением спектральных линий марганца и железа соответственно (указанные элементы могут содержаться в следовых количествах в растворителе и перекрывать спектр эмиссии стандартного образца алюминия в низких концентрациях). При этом длина волны 396,153 нм характеризуется наибольшей чувствительностью и выбрана как основная для дальнейших исследований.

Таблица 5. Метрологические характеристики измерений при разных длинах волн

Table 5. Metrological characteristics of measurements at different wavelengths

Длина волны, нм Wavelength, nm	Коэффициент корреляции, r Correlation coefficient, r	Предел обнаружения, мкг/л Limit of detection, μg/L	Предел обнаружения, % Limit of detection, %
237,313	0,9984	10	1×10^{-5}
308,215	0,9960	400	4×10^{-4}
309,271	0,9996	90	1×10^{-4}
394,401	0,9999	5	5×10^{-6}
396,153	0,9999	1,3	1.3×10^{-6}

Анализ испытуемых образцов показал отсутствие максимума на спектре эмиссии на трех аналитических длинах волн, то есть содержание алюминия не превышает нормируемого значения. При этом при анализе раствора для проверки правильности полученных результатов спектр имел максимум эмиссии на установленных длинах волн. Следовательно, очень высокий сигнал фона основного вещества не мешает определению алюминия в образцах хлорида калия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы была предложена альтернативная методика определения примеси алюминия с помощью рутина спектрофлуориметрическим методом. Были определены длины волн возбуждения и эмиссии для комплекса рутина с алюминием при 445 и 565 нм соответственно. Предложенная методика прошла валидационную оценку по параметрам «специфичность», «предел обнаружения», «линейность». Специфичность характеризуется конкретными значениями длин волн возбуждения и флуоресценции комплекса и отсутствием постороннего влияния других ионов, наличие которых в субстанциях возможно. В ходе построения калибровочной зависимости интенсивности эмиссии от концентрации алюминий-иона был рассчитан коэффициент регрессии 0,9959 (>0,99) и получено уравнение графика линейной функции. Предел обнаружения составил 0,7 мкг. Данная методика была апробирована на субстанции калия хлорида. Результаты исследования показали, что содержание алюминия в субстанции не превышает предельную концентрацию (не более 0,0001 %), установленную в

фармакопейной статье (т. е. интенсивность флуоресценции испытуемого раствора меньше интенсивности флуоресценции эталона). Способность методики давать достоверные результаты подтверждена сопоставимостью с данными, полученными методом АЭС-ИСП.

Предложенная методика эргономична, экспрессна, экономически более выгодна и безопасна по сравнению с подходом, представленным в ГФ РФ. Это связано с тем, что исключена стадия экстракции комплекса алюминия с рутином в органический слой. В результате этого нивелируется токсическое влияние хлороформа на организм человека и окружающую среду. Кроме того, альтернативный подход способствует повышению точности полученных данных ввиду отсутствия стадии экстракции и уменьшения потерь комплекса.

Данная методика в предложенном варианте может быть рекомендована для включения в ГФ РФ и использована фармацевтическими предприятиями при анализе АФС на предмет содержания примеси алюминия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эпштейн Н. А. Трансфер методик определения примесей: сравнительное испытание, валидация, критерии приемлемости (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):137–146. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146.
2. Внешние стандартные образцы или относительные факторы отклика: вопросы количественного определения примесей в фармацевтических препаратах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):16–20.
3. Rajagopalan R. Review of regulatory guidance on impurities. *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals*. 2004;27–37. DOI:10.1016/s0149-6395(03)80004-1.
4. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B. B., Beeregowda K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. I*nterdisciplinary Toxicology*. 2014;7(2):60–72. DOI: 10.2478/intox-2014-0009.
5. Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z., Khazdair M. R., Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12. DOI: 10.3389/fphar.2021.643972.
6. Kushwaha P. Metallic Impurities in Pharmaceuticals: An Overview. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2021;17(8):960–968. DOI: 10.2174/1573412916999200711151147.
7. Robert T. Elemental Impurities in Pharmaceuticals. *Measuring Elemental Impurities in Pharmaceuticals*. 2018;29:11–29. DOI: 10.1201/b21952-2.
8. Balaram V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – Status, challenges and moving frontiers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;80:83–95. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.001.
9. Aleluia A. C. M., de Souza Nascimento M., dos Santos A. M. P., dos Santos W. N.cL., de Freitas Santos Júnior A., Costa Ferreira S. L. Analytical approach of elemental impurities in pharmaceutical products: A worldwide review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2023;205:106689. DOI: 10.1016/j.sab.2023.106689.
10. Rekhi H., Kaur R., Rani S., Malik A. K., Kabir A., Furton K. G. Direct Rapid Determination of Trace Aluminum in Various Water Samples with Quercetin by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Based on Fabric Phase Sorptive Extraction Technique. *Journal of Chromatographic Science*. 2018;56(5):452–460. DOI: 10.1093/chromsci/bmy015.
11. Giordano R., Ciaralli L., Ciprotti M., Camoni I., Costantini S. Applicability of High-Performance Ion Chromatography (HPIC) to the Determination of Fosetyl-Aluminum in Commercial Formulations. *Microchemical Journal*. 1995;52(1):68–76. DOI: 10.1006/mchj.1995.1068.
12. Tria J., Haddad P. R., Nesterenko P. N. Determination of aluminium using high performance chelation ion chromatography. *Journal of Separation Science*. 2008;31(12):2231–2238. DOI: 10.1002/jssc.200800046.
13. Arvand M., Kermanian M., Zanjanchi M. A. Direct determination of aluminium in foods and pharmaceutical preparations by potentiometry using an AlMCM-41 modified polymeric membrane sensor. *Electrochimica Acta*. 2010;55(23):6946–6952. DOI: 10.1016/j.electacta.2010.06.083.
14. Kasprzak M. M., Erxleben A., Ochocki J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Advances*. 2015;5(57):45853–45877. DOI: 10.1039/c5ra05069c.

REFERENCES

1. Epshtein N. A. Transfer of Impurities Determination Methods: Comparative Testing, Validation, Acceptance Criteria (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(2):137–146. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146.
2. External Reference Standards or Relative Response Factors: Considerations for Quantitation of Impurities in Pharmaceuticals. *Drug development & registration.* 2021;10(3):16–20. (In Russ.)
3. Rajagopalan R. Review of regulatory guidance on impurities. *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals*. 2004;27–37. DOI:10.1016/s0149-6395(03)80004-1.
4. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B. B., Beeregowda K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. I*nterdisciplinary Toxicology*. 2014;7(2):60–72. DOI: 10.2478/intox-2014-0009.
5. Balali-Mood M., Naseri K., Tahergorabi Z., Khazdair M. R., Sadeghi M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12. DOI: 10.3389/fphar.2021.643972.
6. Kushwaha P. Metallic Impurities in Pharmaceuticals: An Overview. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2021;17(8):960–968. DOI: 10.2174/1573412916999200711151147.
7. Robert T. Elemental Impurities in Pharmaceuticals. *Measuring Elemental Impurities in Pharmaceuticals*. 2018;29:11–29. DOI: 10.1201/b21952-2.
8. Balaram V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals – Status, challenges and moving frontiers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;80:83–95. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.001.
9. Aleluia A. C. M., de Souza Nascimento M., dos Santos A. M. P., dos Santos W. N.cL., de Freitas Santos Júnior A., Costa Ferreira S. L. Analytical approach of elemental impurities in pharmaceutical products: A worldwide review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2023;205:106689. DOI: 10.1016/j.sab.2023.106689.
10. Rekhi H., Kaur R., Rani S., Malik A. K., Kabir A., Furton K. G. Direct Rapid Determination of Trace Aluminum in Various Water Samples with Quercetin by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Based on Fabric Phase Sorptive Extraction Technique. *Journal of Chromatographic Science*. 2018;56(5):452–460. DOI: 10.1093/chromsci/bmy015.
11. Giordano R., Ciaralli L., Ciprotti M., Camoni I., Costantini S. Applicability of High-Performance Ion Chromatography (HPIC) to the Determination of Fosetyl-Aluminum in Commercial Formulations. *Microchemical Journal*. 1995;52(1):68–76. DOI: 10.1006/mchj.1995.1068.
12. Tria J., Haddad P. R., Nesterenko P. N. Determination of aluminium using high performance chelation ion chromatography. *Journal of Separation Science*. 2008;31(12):2231–2238. DOI: 10.1002/jssc.200800046.
13. Arvand M., Kermanian M., Zanjanchi M. A. Direct determination of aluminium in foods and pharmaceutical preparations by potentiometry using an AlMCM-41 modified polymeric membrane sensor. *Electrochimica Acta*. 2010;55(23):6946–6952. DOI: 10.1016/j.electacta.2010.06.083.
14. Kasprzak M. M., Erxleben A., Ochocki J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Advances*. 2015;5(57):45853–45877. DOI: 10.1039/c5ra05069c.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1615
УДК 615.45; 615.014; 616-006

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Гефитиниб: комбинированная терапия и комплексные системы доставки (обзор)

Л. Л. Николаева[1, 2]✉, Е. В. Санарова[1], А. В. Ланцова[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23
[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:** Николаева Людмила Леонидовна. **E-mail:** alima91@yandex.ru

ORCID: Л. Л. Николаева – https://orcid.org/0000-0001-8003-8241; Е. В. Санарова – https://orcid.org/0000-0002-5592-5137; А. В. Ланцова – https://orcid.org/0000-0002-0650-2023.

Статья поступила: 17.10.2023 **Статья принята в печать:** 11.01.2024 **Статья опубликована:** 12.01.2024

Резюме

Введение. Поиск новых методов терапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) является актуальной задачей современной науки. Гефитиниб – таргетный препарат, широко применяемый при терапии НМРЛ у пациентов с мутацией в домене тирозинкиназы рецепторов эпидермального фактора роста. Однако применение гефитиниба и других препаратов из группы ингибиторов тирозинкиназы ограничено быстроразвивающейся резистентностью, поэтому исследования, направленные на поиск путей преодоления лекарственной устойчивости, представляют огромный интерес.

Текст. Обзор посвящен применению гефитиниба в современных разработках: введению в различные системы направленной доставки (липосомы, мицеллы, микросферы и др.), изучению его в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами, а также в комбинации с фото- или термочувствительными соединениями в составе различных микро- и наноструктурированных комплексов.

Заключение. В результате проведенного анализа литературных данных показано, что, несмотря на то, что гефитиниб является препаратом первого поколения, зарубежные и российские исследователи считают его достаточно перспективным для дальнейшего применения при терапии НМРЛ. При этом разработки ведутся как в области расширения комбинированной терапии, так и в области создания комплексных структур направленного действия, в которые, кроме гефитиниба, введены фотосенсибилизаторы или другие соединения, обладающие фото- или термочувствительными эффектами.

Ключевые слова: ингибиторы тирозинкиназы, преодоление резистентности, носители, фотодинамическая терапия

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

Вклад авторов. Л. Л. Николаева и Е. В. Санарова – проведение патентно-информационного и литературного поиска, анализ и обработка полученных баз данных, написание статьи. А. В. Ланцова – внесение значимых исправлений в содержание работы, поиск и обработка зарубежных научных исследований, окончательное утверждение публикуемой рукописи.

Финансирование. Грант РНФ 23-75-01026 «Разработка адресных комбинированных структур на основе фосфолипидных наносистем для терапии рака легкого».

Для цитирования: Николаева Л. Л., Санарова Е. В., Ланцова А. В. Гефитиниб: комбинированная терапия и комплексные системы доставки. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):26–33. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1615

Gefitinib: Combination Therapy and Complex Delivery Systems (Review)

Lyudmila L. Nikolaeva[1, 2]✉, Ekaterina V. Sanarova[1], Anna V. Lantsova[1]

[1] Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (N. N. Blokhin NMRCO), 23, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia
[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:** Lyudmila L. Nikolaeva. **E-mail:** alima91@yandex.ru

ORCID: Lyudmila L. Nikolaeva – https://orcid.org/0000-0001-8003-8241; Ekaterina V. Sanarova – https://orcid.org/0000-0002-5592-5137;
Anna V. Lantsova – https://orcid.org/0000-0002-0650-2023.

Received: 17.10.2023 **Revised:** 11.01.2024 **Published:** 12.01.2024

Abstract

Introduction. The search for new methods of therapy for non-small cell lung cancer (NSCLC) is an urgent task of modern science. Gefitinib is a targeted drug widely used in the treatment of NSCLC in patients with a mutation in the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain. However, using of gefitinib and other drugs from the group of tyrosine kinase inhibitors is to limited by rapidly developing resistance, for this reason finding of a ways overcome drug resistance is actual part of research interests.

Text. The review is devoted to the use of gefitinib in modern developments: introduction to various targeted delivery systems (liposomes, micelles, microspheres, etc.), studying it in combination with other chemotherapeutic agents, as well as in combination with photo- or thermosensitive compounds in various micro- and nanostructured complexes.

© Николаева Л. Л., Санарова Е. В., Ланцова А. В., 2024
© Nikolaeva L. L., Sanarova E. V., Lantsova A. V., 2024

Conclusion. As a result of the analysis of literature data, it was shown that, despite the fact that gefitinib is a first-generation drug, foreign and Russian researchers consider it quite promising for further use in the treatment of NSCLC. At the same time, developments are being carried out both in the field of expanding combination therapy and in the field of creating complex structures of targeted action, into which, in addition to gefitinib, photosensitizers or other compounds with photo- or thermosensitive effects are introduced.

Keywords: tyrosine kinase inhibitors, overcoming resistance, carriers, photodynamic 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. Lyudmila L. Nikolaeva, Ekaterina V. Sanarova – conducting patent information and literary searches, analysis and processing of the obtained databases, writing an article. Anna V. Lantsova – making significant corrections to the content of the work, searching and processing scientific research, editing, final approval of the published manuscript.

Funding. This study was supported by Russian Science Foundation grant No. 23-75-01026 «Development of targeted combined structures based on phospholipid nanosystems for lung cancer therapy».

For citation: Nikolaeva L. L., Sanarova E. V., Lantsova A. V. Gefitinib: combination therapy and complex delivery systems. *Drug development & registration*. 2024;13(1):26–33. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1615

ВВЕДЕНИЕ

Еще несколько десятилетий назад комбинированная химиотерапия на основе препаратов платины и другого химиотерапевтического агента, такого как пеметрексед, гемцитабин, винорелбин и таксан, была единственным вариантом лечения распространенного немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [1]. Однако ее эффективность ограниченна, а медиана выживаемости больных составляет менее года. Развитие молекулярной генетики и выявление мишеней в опухолевой ткани принципиально изменило подход к разработке новых препаратов и терапии.

В 2004 г. впервые были идентифицированы специфические активирующие мутации в домене тирозинкиназы рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) и было показано, что они коррелируют с благоприятной клинической реакцией у пациентов с распространенным НМРЛ. Пациенты с НМРЛ, несущие сенсибилизирующие мутации EGFR, продемонстрировали значительно более длительную выживаемость без прогрессирования при терапии ингибиторами тирозинкиназы (ИТК) по сравнению с пациентами, получающими обычную химиотерапию [2]. В настоящее время молекулярная таргетная терапия с использованием ИТК признана многообещающей стратегией лечения НМРЛ. Сейчас на российском фармацевтическом рынке представлены пять препаратов данной группы: гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб, осимертиниб и дакомитиниб.

Гефитиниб – противоопухолевое соединение, обратимый ингибитор тирозинкиназы EGFR, экспрессия которых наблюдается в ряде солидных опухолей, ингибирует рост опухоли, метастазирование и ангиогенез, а также ускоряет апоптоз опухолевых клеток [3].

Субстанция гефитиниба растворима в диметилформамиде, мало растворима в этаноле и метаноле, практически нерастворима в воде, в связи с чем препарат выпускается в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой, содержащих 250 мг действующего вещества. В качестве вспомогательных веществ в таблетки введены: лактозы моногидрат, целлюлоза микрокристаллическая, повидон К30, кроскармеллоза натрия, натрия лаурилсульфат, магния стеарат, в качестве пленочной оболочки использовали покрытие IC-S-2269, содержащее в основном гипромеллозу (60 %) и полиэтиленгликоль (12 %).

Применяются таблетки гефитиниба перорально в дозе 250 мг/сут вне зависимости от приема пищи при лечении местнораспространенного или метастатического НМРЛ, рефрактерного к режимам химиотерапии, содержащим дуплеты платины и доцетаксел. Многочисленные исследования показывают, что гефитиниб статистически достоверно увеличивает время до прогрессирования заболевания у пациентов с местнораспространенным или метастатическим НМРЛ [4, 5]. Применение гефитиниба ограничено различными побочными действиями, низкой биодоступностью (59 %), а также быстроразвивающейся резистентностью.

Так, несмотря на наличие у пациентов с НМРЛ EGFR-мутаций, примерно 30 % из них не реагируют на лечение или через 9,7–13 мес. после начала терапии у них отмечается прогрессирование заболевания (рецидив) из-за первичной и приобретенной резистентности [6]. Для преодоления резистентности к ИТК, помимо разработки новых препаратов данной группы, перспективными стратегиями являются включение препаратов ИТК в направленный носитель и

использование комбинированной терапии. Эти подходы направлены на то, чтобы преодолеть лекарственную устойчивость с помощью так называемого обходного сигнального механизма, воздействуя на горизонтальные и/или вертикальные пути, а также на изменение механизма действия [7].

Гефитиниб в различных системах доставки

Уже несколько десятилетий ряд классических химиопрепаратов (доксорубицин, винкристрин и др.), введённых в носитель, успешно применяются в клинике, продемонстрировав достоверное увеличение накопления субстанций в опухолевых тканях и уменьшение цитотоксических побочных эффектов [8]. Большой интерес ученых по всему миру к созданию наносистем с ИТК [9–12], описанный в самых различных публикациях, доказывает перспективность разработки систем направленной доставки с гефитинибом, в том числе в сочетании с другими химиотерапевтическими агентами.

Так, исследователи из Саудовской Аравии успешно разработали термочувствительные полимерные частицы с гефитинибом на основе хитозана и плюроника F127 с помощью сшивающего β-глицерофосфата. Применение этих носителей в опытах *in vitro* на клетках рака печени HepG2 показало увеличение противоопухолевой активности и изменение фармакокинетических параметров по сравнению со свободным гефитинибом (IC_{50} 17,783 и 10,0 мкг/мл соответственно) [9].

Индийские ученые получили нанокомпозиции с гефитинибом методом модифицированного эмульгирования и УЗ-воздействия с эффективностью включения около 90 %. Анализ цитотоксичности показал, что наночастицы, нагруженные гефитинибом, обладают пониженной цитотоксичностью по сравнению со свободным препаратом (IC_{50} $1,92 \pm 0,86$) в клетках рака легкого A549 и H1299 (IC_{50} $9,32 \pm 1,25$ и $8,54 \pm 1,08$ мкМ соответственно), что связано с замедленным высвобождением гефитиниба из нанокомпозиций [10].

В Parul University (Индия) изучали высвобождение гефитиниба из двух видов частиц (твердых липидных и наноструктурированных липидных) *in vivo*. В результате продемонстрировали, что введение препарата в носитель вызывает модификацию высвобождения – замедление до 24 ч [10, 11].

Гефитиниб, модифицированный графеновыми квантовыми точками с полиэтиленгликолем, успешно включали в микросферы на основе полимера молочной кислоты методом испарения растворителя и однократного эмульгирования. Быстрое высвобождение гефитиниба из частиц наблюдалось только в кислой среде (pH 4,5), а так как раковые клетки демонстрируют устойчивый рост только в кислой среде, эта форма является довольно перспективной для адресной доставки. При этом показатель IC_{50} на линии НМРЛ NCI-H522 составил 1,21 мкг/мл [12].

Одним из примеров комбинированной терапии является разработка гибридных наноструктурированных липидных носителей, нагруженных гефитинибом и симвастатином, так как статины усиливают цитотоксический эффект ИТК против резистентных рака молочной железы и НМРЛ [13, 14]. В опытах *in vitro* на линии рака молочной железы MCF-7 гибридная структура оказалась более активной по сравнению с монопрепаратами: IC_{50} гибридной структуры – 2,24, гефитиниба – 5,04 и симвастатина – 3,46 мкг/мл [13].

Преимущество комбинированной терапии продемонстрировано при сравнении гефитиниба с комбинацией гефетиниб + карбоплатин + пеметрексед, выживаемость пациентов с метастатическим НМРЛ без прогрессирования составила 11,9 и 20,9 мес. соответственно [15].

Иранские и канадские ученые успешно разработали композицию с MnO_2, гефитинибом и бевацизумабом (рисунок 1). Часть наностержней MnO_2 на липидной оболочке обладала чувствительностью к pH и глутатиону (содержится в больших количествах в раковых клетках). Эффективность данной структуры была успешно подтверждена *in vitro* на клетках A549 и *in vivo* в/в, коэффициент апоптоза достигал 22,4 %, а ингибирование роста опухоли составило 78,54 % [16].

В Венгрии ученые создали нанокомпозиции на основе дипальмитоилфосфатидилхолина, холестерина, урсоловой кислоты (УК) и пегилированного фосфолипида. Композиции были получены с использованием структурных преимуществ УК: спонтанно присоединяясь к липидным группам, она вызывает искривление на внешней стороне бислоя везикулы, тем самым образуя везикулы нужного размера без экструзии. С помощью флуоресцентной иммуногистохимии было обнаружено, что везикулы, содержащие УК, накапливаются в опухоли через 3 ч у ксенотрансплантированных мышей, что позволяет предположить потенциальное использование этих везикул для пассивного нацеливания на опухоль. Нанокомпозиции на основе УК и различных ингибиторов киназ (кризотиниб, эрлотиниб, форетиниб, гефитиниб, рефаметиниб, траметиниб) были протестированы на семи линиях раковых клеток: толстой кишки (HCT116, SW480), легких (H358, HCC827) и эпителиальных (A431, A431-OATP1B1, A431-ABCG2). Композиция с гефитинибом на 4 линиях проявляла незначительный синергический эффект [17].

Наночастицы на основе золота с гефитинибом и красителем IR780 получили в Китае. Поверхностно-модифицированный слой нанооболочки золота оказывал фототермический эффект, вызывая термически инициируемое высвобождение препарата, а уникальное связывание циклической аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты с рецептором $\alpha_v\beta_3$ осуществляло целевой транспорт наночастиц к раковым клеткам. Благодаря сонодинамическим свойствам IR780 под действием УЗ происходило образование активных

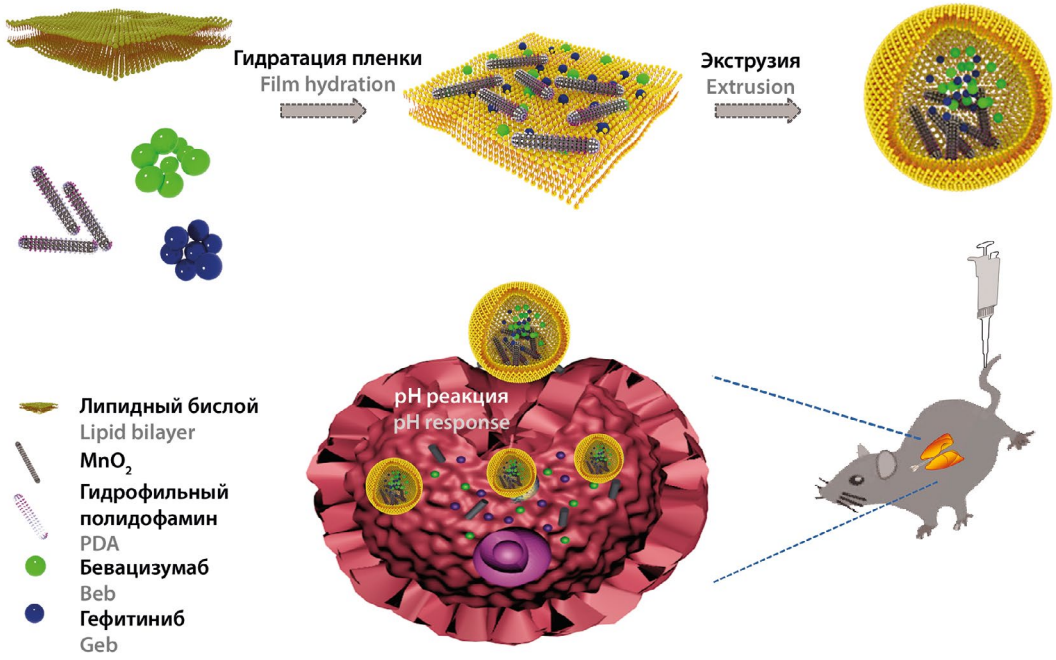


Рисунок 1. **Комплексные липосомы с наностержнями MnO_2, гефитинибом и бевацузимабом и их механизм действия [16]**

Figure 1. **Schematic diagram of nanocomposite preparation with MnO_2, gefitinib and bevacuzimab and anti-tumor mechanism [16]**

форм кислорода, при этом низкотемпературная фототермическая терапия не только способствовала высвобождению лекарственного вещества, но и еще больше усиливала цитотоксические эффекты [18].

В отечественной науке публикации и исследования в области лечения НМРЛ за последние 5 лет связанны в основном с применением гефитиниба в комплексе с ингибиторами тирозинкиназы рецептора MET [19, 20], эффективными против рака, резистентного к гефитинибу. Интегрированная химиотерапия с паклитакселом и карбоплатином перспективна в качестве способа преодоления развития резистентности опухоли к ИТК 1–2 поколения [21].

Комбинированное применение гефитиниба с фотодинамической терапией

Фотодинамическая терапия (ФДТ) зарекомендовала себя эффективным методом лечения злокачественных опухолей, в том числе внутригрудной локализации. По сравнению с традиционными методами лечения ФДТ обладает потенциалом двойной селективности за счет ограничения освещения определенной области и избирательного поглощения фотосенсибилизатора (ФС) опухолевыми клетками [22]. ФДТ у всех групп больных НМРЛ обладает рядом особенностей относительно других методов лечения. Она имеет более благоприятный профиль безопасности по сравнению с дистанционной лучевой терапией, хирургией, эндобронхиальной брахитерапией и цитостатической химиотерапией. Процедура хорошо переносится больными, и сейчас терапия чаще всего проводится в амбулаторных условиях [23].

Основными перспективами развития ФДТ может быть ее применение в комбинации с другими методами противораковой терапии. Проведен целый ряд исследований по созданию и изучению наночастиц с ФС, которые направлены на улучшение доставки ФС к опухоли при воздействии на нее облучением в ближней ИК-области. Показаны возможности использования наночастиц при комбинировании ФДТ с другими методами терапии опухолей, в частности с иммунотерапией, фототермической терапией и химиотерапией [24].

В научной среде уже представлено несколько успешных разработок по созданию комплексных систем, включающих в себя химиотерапевтический агент (в том числе из группы ИТК) и ФС, заключенные в микро- или наноноситель [25–28]. При этом высвобождение из носителя и активизация химиотерапевтического агента инициируется облучением зоны опухоли световым излучением, поглощаемым ФС. Кроме того, при облучении ФС высвобождает высокоактивный атомарный кислород, который провоцирует некроз и апоптоз органических тканей, то есть гибель опухолевых клеток происходит по нескольким механизмам.

В Японии на базе департамента нейрохирургии провели исследование по изучению влияния гефитиниба на действие ФС – аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) в клеточных линиях опухолей мозга. Показано, что при совместном применении гефитиниб

ингибировал ABCG2-опосредованный отток протопорферина IX из клеток злокачественной опухоли головного мозга, повышая внутриклеточный уровень протопорфирина IX, и тем самым усиливал эффект ФДТ [25].

Применение ФДТ при лечении НМРЛ описано в отечественных публикациях: так, эндобронхиальная ФДТ (с применением отечественных ФС хлоринового ряда), проводимая совместно с химиотерапией (двухкомпонентные платиносодержащие комбинации), не вызывала серьезных осложнений и позволяла достичь большей частоты ремиссий и улучшить выживаемость нерезектабельных больных центральным НМРЛ III–IV стадий и больных, перенесших R1-резекцию с положительном краем резекции бронха [26, 27].

Китайские ученые провели изучение комбинированного действия химиотерапевтического агента (гефитиниб) и ФС (гематопорфирин) в составе дендример для химиофотодинамической терапии (ХФДТ) первичного рака легкого крыс с внешним лазерным световым облучением (рисунок 2). При этом быстрое высвобождение соединений из дендример происходит при pH 5,4 и значительно замедляется при pH 7,4. Противоопухолевые эффекты комплексного препарата и монотерапии (применение ФДТ или гефитиниба) исследовали на клетках A549 и крысах с первичным раком легкого. Внешнее световое облучение было применено в связи с его большей безопасностью по сравнению с внутренним световым облучением, которое может привести к травмам после интубации лазерного оптического волокна в легкое. Значения IC_{50} дендример в клетках PC-9 (гефитиниб-чувствительные) и H1975 (гефитиниб-резистентные) составили 0,64 и 19,96 мкг/мл соответственно. Заметный синергитический эффект ХФДТ был подтвержден, хотя отдельные методы лечения также были эффективны, наблюдалось значительное снижение типичных маркеров рака легких (CD31, VEGF, NF-κB p65 и Bcl-2). Кроме того, лечение ослабляло воспаление за счет подавления TNF-α [28].

Также в Китае был успешно синтезирован нанокомпозит, содержащий в своей структуре гефитиниб с фталоцианином Zn. Нанокомпозит ZnPc-UCNPs-PEG-G проявляет превосходную фотосенсибилизирующую способность, генерируя активные формы кислорода посредством эффективной передачи энергии от наночастицы к фталоцианину цинка. Кроме того, композит обладает специфическим сродством к раковым клеткам HepG2 и высокой противоопухолевой активностью, жизнеспособность клеток составила 32 % при 640 мкг/мл [29].

I. Meerovich и его коллеги из Крейтонского университета разработали липидные наночастицы с паклитакселом и хлоридом алюминия 1,8,15,22-тетракис(фенилтио)-29H,31H-фталоцианином. В опытах *in vitro* при малоинтенсивном (23 мВт/см^2) ближнем инфракрасном (около 730 нм) освещении было

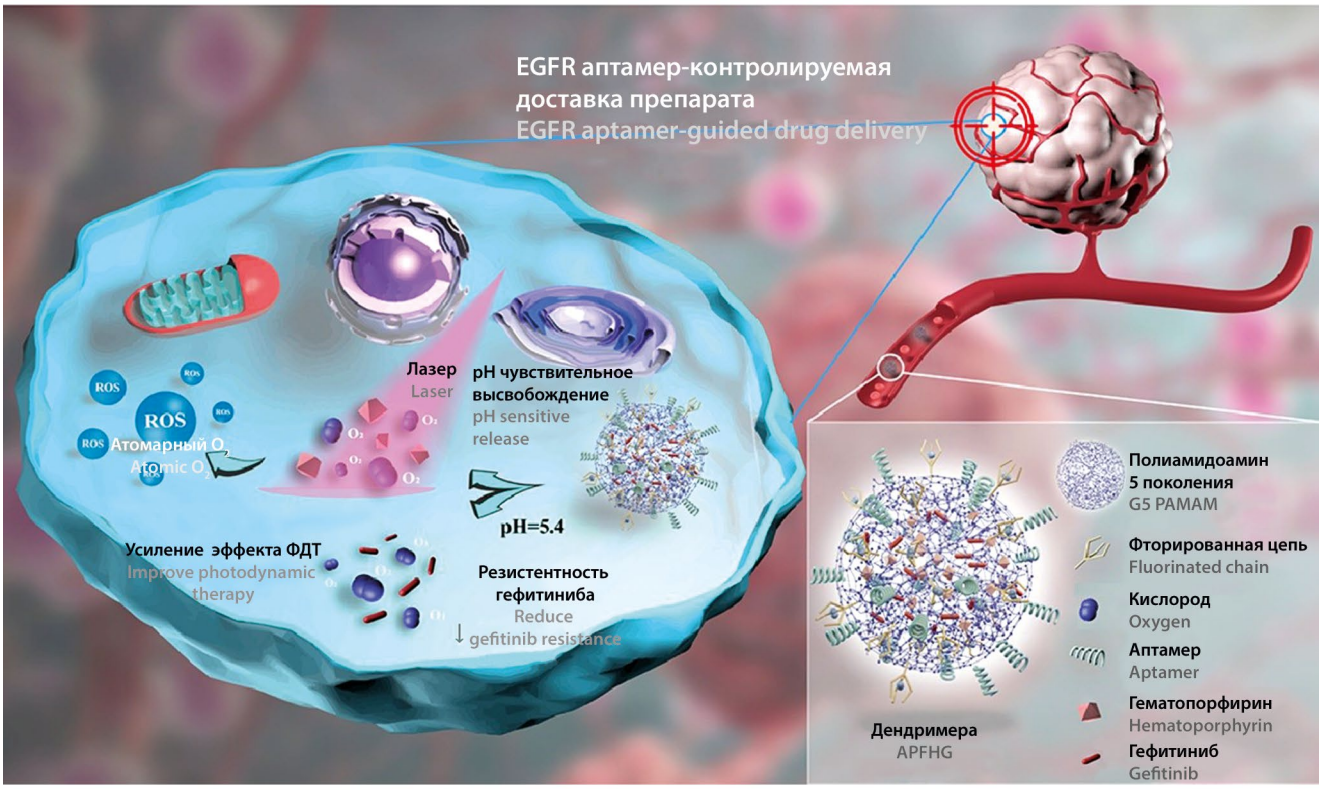


Рисунок 2. Механизм фотовысвобождения гепатопорфирина и гефитиниба из дендример [28]

Figure 2. Mechanism of photorelease of hematoporphyrin and gefitinib from dendrimer [28]

доказано преимущество комбинации по сравнению с монотерапией, при этом активность была выше в 11–37 раз при различных дозах [30]. Однако паклитаксел, несмотря на свою эффективность, существенно уступает таргетным препаратам, поэтому исследование по разработке комбинированного препарата гефитиниба или другого таргетного агента является более перспективным.

В Университете Лобачевского уже несколько лет проводят исследования по получению комбинированных агентов для ФДТ и таргетной терапии, представляющих собой конъюгаты цинкового комплекса хлорина е6 с производным мальтозы (ZnChl) и присоединенным кабозантинибом или вандетанибом (ZnChl-Cbz и ZnChl-Vd). Соединения обладают интенсивным поглощением, в экспериментах *in vivo* с помощью измерений флуоресценции было установлено, что конъюгаты преимущественно накапливается в опухолевой ткани. В опытах *in vitro* ZnChl-Cbz проявляет темновую и фотоиндуцированную цитотоксичность, наблюдалось его повышенное накопление в клетках A431 с высоким уровнем экспрессии EGFR по сравнению с клетками CHO и HeLa с низкой экспрессией EGFR [31]. ZnChl-Vd демонстрировал низкие уровни темновой цитотоксичности и выраженную фотоиндуцированную цитотоксичность при субмикромолярных концентрациях *in vitro* с соотношением IC_{50} (темновая) / IC_{50} (световая) ~368 и квантовым выходом синглетного кислорода около 20 %. У голых мышей Balb/c ZnChl-Vd преимущественно накапливается в опухолевой ткани. Облучение голых мышей с ксенотрансплантатными опухолями A431 после внутривенного введения приготовленного конъюгата относительно низкой дозой света (50 Дж/см^2) дало отличный терапевтический эффект с глубокой регрессией опухоли и низкой системной токсичностью [32].

Перспективные исследования в области разработки комплексных систем на основе гефитиниба и ФС из группы алюминия фталоцианина начаты на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Отобранные для дальнейшего исследования композиции представлены в виде мицеллярной и липосомальной формы и предназначены для парентерального введения [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гефитиниб – пероральный противоопухолевый низкомолекулярный ингибитор EGFR первого поколения, разрешенный для терапии местнораспространенного или метастатического НМРЛ. Несмотря на таргетное действие, его применение ограничено низкой биодоступностью и быстрым рецидивом заболевания после терапии. Стремительное появление резистентности после применения как классических химиопрепаратов, так и селективных таргетных соединений диктует необходимость поиска новых путей преодоления лекарственной устойчивости. Наиболее перспективной стратегией для решения данной проблемы является создание обходного сигнального механизма действия. Современные исследования, проводимые в этой области, имеют три направления. Первое – введение вещества в направленный носитель с изменением селективности, механизма действия и фармакокинетических параметров. Второе – применение комбинированной терапии, включающей использование нескольких химиотерапевтических агентов или применение химиопрепарата в сочетании с другой терапией, например ФДТ. И третье – создание комплексных направленных структур, содержащих химиотерапевтический агент и ФС или другое соединение, обладающее фото- или термочувствительным действием, которые активируются после светового воздействия. Третье направление более интересное, так как сочетает в себе первые два, а примеры, представленные в литературном обзоре по данной тематике, указывают на то, что применение комплексных структур эффективно и, кроме ожидаемых механизмов действия, дополнительно активирует другие пути гибели опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федяев Д. В., Зырянов С. К. Клинико-экономический анализ применения афатиниба и гефитиниба при лечении рака легкого. *Медицинские технологии. Оценка и выбор*. 2018;1(31):68–84.
2. Ряженов В. В., Горохова С. Г. Клинико-экономическая оценка разных стратегий лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого и наличием мутаций в гене EGFR. *Современная онкология*. 2016;18(3):84–89.
3. Санарова Е. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Литвиненко Я. Е., Соловьева Н. Л. Создание модели комплексной наносистемы доставки, содержащей ингибитор тирозинкиназ и фотосенсибилизатор. *Химико-фармацевтический журнал*. 2023;57(7):43–46. DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-7-43-465.
4. Mitsudomi T., Morita S., Yatabe Y., Negoro S., Okamoto I., Tsurutani J., Seto T., Satouchi M., Tada H., Hirashima T., Asami K., Katakami N., Takada M., Yoshioka H., Shibata K., Kudoh S., Shimizu E., Saito H., Toyooka S., Nakagawa K., Fukuoka M. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(2):121–1288. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
5. Maemondo M., Inoue A., Kobayashi K., Sugawara S., Oizumi S., Isobe H., Gemma A., Harada M., Yoshizawa H., Kinoshita I., Fujita Y., Okinaga S., Hirano H., Yoshimori K., Harada T., Ogura T., Ando M., Miyazawa H., Tanaka T., Saijo Y., Hagiwara K., Morita S., Nukiwa T. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *New England Journal of Medicine*. 2010;24;362(25):2380–2388. DOI: 10.1056/NEJMoa0909530.
6. Кузьмина В. А., Лактионов К. К., Реутова Е. В., Ардзинба М. С., Денисова Е. С. Клинический случай длительного контроля над заболеванием у пациентки с EGFR-позитивным немелкоклеточным раком легкого. *Медицинский совет*. 2022;16(22):154–159. DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-22-154-159.
7. Tong C. W. S., Wu W. K. K., Loong H. H. F., Cho W. C. S., Kenneth K. W. To K. K. W. Drug combination approach to overcome resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Cancer Letters*. 2017;405:100–110. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.07.023.

8. Бурдаев Н. И., Николаева Л. Л., Косенко В. В., Шпрах З. С., Бунятян Н. Д. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2–1):316–332. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508.
9. Abdellatif A. A. H., Al-Subaiyel A., Mohammed A. M. Thermosensitive polymers-based injectable hydrogels: a quantitative validations design utilized for controlled delivery of gefitinib anticancer drug. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2023;27(6):2646–2658. DOI: 10.26355/eurrev_202303_31802.
10. Rohilla S., Awasthi R., Mehta M., Chellappan D. K., Gupta G., Gulati M., Singh S. K., Anand K., Oliver B. G., Dua K., Dureja H. Preparation and Evaluation of Gefitinib Containing Nanoliposomal Formulation for Lung Cancer Therapy. *BioNanoSci.* 2022;12:241–255. DOI: 10.1007/s12668-022-00938-6.
11. Shah A., Patel A., Dharamsi A.Optimization of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipidic Carriers as Promising Delivery for Gefitinib: Characterization and Invitro Evaluation. *Current Drug Therapy.* 2021;16(2):170–183. DOI: 10.2174/1574885516666210125111945.
12. Gautam A., Pal K. Gefitinib conjugated PEG passivated graphene quantum dots incorporated PLA microspheres for targeted anticancer drug delivery. *Heliyon.* 2022;8(12):e12512. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12512.
13. Sherif A. Y., Harisa G. I., Shahba A. A., Nasr F. A., Taha E. I. Assembly of nanostructured lipid carriers loaded gefitinib and simvastatin as hybrid therapy for metastatic breast cancer: Codelivery and repurposing approach. *Drug Development Research*. 2023;84(7):1453–1467. DOI: 10.1002/ddr.22097.
14. Han J. Y., Lee S. H., Yoo N. J., Hyung L. S., Moon Y. J., Yun T., Kim H. T., Lee J. S. A randomized phase II study of gefitinib plus simvastatin versus gefitinib alone in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(6):1553–1560. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2525.
15. Tillyashaikhov M. N., Yusupbekov A. A., Kamishov S., Crowley G. Gefitinib alone versus gefitinib plus chemotherapy for non-smallcell lung Cancer with mutated Epidermal growth factor receptor. *Clinical and experimental oncology*. 2020;(1):5–15.
16. Zhang J., Xu L., Hu H., Chen E. The combination of MnO_2@Lipo-coated gefitinib and bevacizumab inhibits the development of non-small cell lung cancer. *Drug Delivery.* 2022;29(1):466–477. DOI: 10.1080/10717544.2022.2032872.
17. Lőrincz A., Mihály J., Wacha A., Németh Cs., Besztercei B., Gyulavári P., Varga Z., Peták I., Bóta A. Combination of multifunctional ursolic acid with kinase inhibitors for anti-cancer drug carrier vesicles. *Materials Science and Engineering: C.* 2021;131:112481. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112481.
18. Lv W., Wu H., Zhang Y., Li H., Shu H., Su C., Zhu Y., Wang T., Nie F. cRGD-targeted gold-based nanoparticles overcome EGFR-TKI resistance of NSCLC via low-temperature photothermal therapy combined with sonodynamic therapy. *Biomaterials Science*. 2023;11(5):1677–1691. DOI: 10.1039/D2BM01825J.
19. Тидт Р., Шатене-риводе К., Ито М., Пэн Б., Гун И., Акимов М. Комбинированные продукты, содержащие ингибиторы тирозинкиназ, и их применение. Патент РФ RU 2660354. 05.07.2018.
20. Хао Х., Хуан С., Там Э., Касибхатла С. Сочетанная терапия. Патент РФ RU 2695230. 22.07.2019.
21. Лактионов К. К., Юдин Д. И., Маевская Ю. Н., Владимирова Л. Ю., Маринов Д. Т., Ардзинба М. С., Абдулаев А. Г., Попова И. Л. Эффективность интегрированной химиотерапии с ингибиторами тирозинкиназы рецептора EGFR у пациентов с немелкоклеточным раком легкого и активирующей мутацией гена EGFR. *Вопросы онкологии*. 2021;67(2):246–253. DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-2-246-253.
22. Wang C., Cheng L., Liu Z. Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. *Theranostics*. 2013;3(5):317–330. DOI: 10.7150/thno.5284.
23. Рагулин Ю. А., Галкин В. Н. Фотодинамическая терапия при раке легкого: основные показания к применению. *Сибирский онкологический журнал*. 2016;15(4):79–87. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-4-79-87.
24. Kostryukova L. V., Plyutinskaya A. D., Pankratov A. A., Korotkevich E. I., Prozorovskiy V. N., Tikhonova E. G., Torkhovskaya T. I., Teryoshkina Yu. A. Chlorine e6 in Phospholipid Nanoparticles with Specific Targeting and Penetrating Peptides as Prospective Composition for Photodynamic Therapy of Malignant Neoplasms. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2020;14:174–179. DOI: 10.1134/S1990750820020080.
25. Sun W., Kajimoto Y., Inoue H., Miyatake S.-I., Ishikawa T., Kuroiwa T. Gefitinib enhances the efficacy of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in malignant brain tumor cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(1):42–50. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2012.06.003.
26. Акопов А., Русанов А., Уртенова М., Казаков Н., Черемных А., Чистяков И., Герасин А., Романихин А. Эффективность эндобронхиальной фотодинамической терапии в сочетании с химиотерапией при немелкоклеточном раке легкого. *Вопросы онкологии*. 2017;63(6):882–885. DOI: 10.37469/0507-3758-2017-63-6-882-885.
27. Акопов А. Л., Русанов А. А., Казаков Н. В., Папаян Г. В., Чистяков И. В. Фотодинамическая терапия при R1 нерадикальных резекциях по поводу рака легкого. *Вестник хирургии имени И. И. Грекова*. 2019;178(1):21–24. DOI: 10.24884/0042-4625-2019-178-1-21-24.
28. Zhu F., Xu L., Li X., Li Z., Wang J., Chen H., Li X., Gao Yu. Co-delivery of gefitinib and hematoporphyrin by aptamer-modified fluorinated dendrimer for hypoxia alleviation and enhanced synergistic chemo-photodynamic therapy of NSCLC. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;167:106004. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106004.
29. Jia X., Ye H.-N., Weng H., Huang N., Yu Y., Xue J.-P. Small molecular target-based multifunctional upconversion nanocomposites for targeted and in-depth photodynamic and chemo-anticancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;104:109849. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109849.
30. Meerovich I., Nichols M. G., Dash A. Low-intensity light-induced paclitaxel release from lipid-based nano-delivery systems. *Journal of Drug Targeting*. 2019;27(9):971–983. DOI: 10.1080/1061186X.2019.1571066.
31. Otvagin V. F., Nyuchev A. V., Kuzmina N. S., Grishin I. D., Gavryushin A. E., Romanenko Y. V., Koifman O. I., Belykh D. V., Peskova N. N., Shilyagina N. Y., Balalaeva I. V., Fedorov A. Y. Synthesis and biological evaluation of new water-soluble photoactive chlorin conjugate for targeted delivery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;144:740–750. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.12.062.
32. Otvagin V. F., Kuzmina N. S., Krylova L. V., Volovetsky A. B., Nyuchev A. V., Gavryushin A. E., Meshkov I. N., Gorbunova Y. G., Romanenko Y. V., Koifman O. I., Balalaeva I. V., Fedorov A. Y. Water-Soluble Chlorin/Arylaminoquinazoline Conjugate for Photodynamic and Targeted Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;62(24):11182–11193. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01294.

REFERENCES

1. Fedyayev D. V., Zyryanov S. K. Pharmacoeconomic Analysis of Afatinib and Gefitinib for the Treatment of Lung Cancer. *Medical Technologies. Assessment and Choice*. 2018;1(31): 68–84. (In Russ.)
2. Ryazhenov V. V., Gorokhova S. G. Clinico-economic evaluation of different treatment strategies in patients with non-small cell lung cancer and mutations in the EGFR gene. *Journal of Modern Oncology*. 2016;18(3):84–89. (In Russ.)
3. Sanarova E. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Litvinenko Ya. E., Solovyova N. L. Creation of a model of complex nanodelivery systems containing a tyrosine kinase inhibitor and a photosensitizer. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2023;57(7):43–46. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-7-43-46.
4. Mitsudomi T., Morita S., Yatabe Y., Negoro S., Okamoto I., Tsurutani J., Seto T., Satouchi M., Tada H., Hirashima T., Asami K., Katakami N., Takada M., Yoshioka H., Shibata K., Kudoh S., Shimizu E., Saito H., Toyooka S., Nakagawa K., Fukuoka M. Gefitinib

versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(2):121–1288. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.

5. Maemondo M., Inoue A., Kobayashi K., Sugawara S., Oizumi S., Isobe H., Gemma A., Harada M., Yoshizawa H., Kinoshita I., Fujita Y., Okinaga S., Hirano H., Yoshimori K., Harada T., Ogura T., Ando M., Miyazawa H., Tanaka T., Saijo Y., Hagiwara K., Morita S., Nukiwa T. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *New England Journal of Medicine*. 2010;24;362(25):2380–2388. DOI: 10.1056/NEJMoa0909530.
6. Kuzmina V. A., Laktionov K. K., Reutova E. V., Ardzinba M. A., Denisova E. S. Clinical case of long-term disease control in a patient with EGFR-positive non-small cell lung cancer. *Medical Council*. 2022;(22):154–159. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-22-154-159.
7. Tong C. W. S., Wu W. K. K., Loong H. H. F., Cho W. C. S., Kenneth K. W. To K. K. W. Drug combination approach to overcome resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Cancer Letters*. 2017;405:100–110. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.07.023.
8. Burdaev N. I., Nikolaeva L. L., Kosenko V. V., Shprakh Z. S., Bunyatyan N. D. Liposomes as Drug Carriers: Classification, Preparation Methods, and Medicinal Use. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2–1):316–332. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508.
9. Abdellatif A. A. H., Al-Subaiyel A., Mohammed A. M. Thermosensitive polymers-based injectable hydrogels: a quantitative validations design utilized for controlled delivery of gefitinib anticancer drug. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2023;27(6):2646–2658. DOI: 10.26355/eurrev_202303_31802.
10. Rohilla S., Awasthi R., Mehta M., Chellappan D. K., Gupta G., Gulati M., Singh S. K., Anand K., Oliver B. G., Dua K., Dureja H. Preparation and Evaluation of Gefitinib Containing Nanoliposomal Formulation for Lung Cancer Therapy. *BioNanoSci*. 2022;12:241–255. DOI: 10.1007/s12668-022-00938-6.
11. Shah A., Patel A., Dharamsi A.Optimization of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipidic Carriers as Promising Delivery for Gefitinib: Characterization and Invitro Evaluation. *Current Drug Therapy*. 2021;16(2):170–183. DOI: 10.2174/1574885516666210125111945.
12. Gautam A., Pal K. Gefitinib conjugated PEG passivated graphene quantum dots incorporated PLA microspheres for targeted anticancer drug delivery. *Heliyon*. 2022;8(12):e12512. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12512.
13. Sherif A. Y., Harisa G. I., Shahba A. A., Nasr F. A., Taha E. I. Assembly of nanostructured lipid carriers loaded gefitinib and simvastatin as hybrid therapy for metastatic breast cancer: Codelivery and repurposing approach. *Drug Development Research*. 2023;84(7):1453–1467. DOI: 10.1002/ddr.22097.
14. Han J. Y., Lee S. H., Yoo N. J., Hyung L. S., Moon Y. J., Yun T., Kim H. T., Lee J. S. A randomized phase II study of gefitinib plus simvastatin versus gefitinib alone in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(6):1553–1560. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2525.
15. Tillyashaikhov M. N., Yusupbekov A. A., Kamishov S., Crowley G. Gefitinib alone versus gefitinib plus chemotherapy for non-smallcell lung Cancer with mutated Epidermal growth factor receptor. *Clinical and experimental oncology*. 2020;(1):5–15.
16. Zhang J., Xu L., Hu H., Chen E. The combination of MnO_2@Lipo-coated gefitinib and bevacizumab inhibits the development of non-small cell lung cancer. *Drug Delivery*. 2022;29(1):466–477. DOI: 10.1080/10717544.2022.2032872.
17. Lőrincz A., Mihály J., Wacha A., Németh Cs., Besztercei B., Gyulavári P., Varga Z., Peták I., Bóta A. Combination of multifunctional ursolic acid with kinase inhibitors for anti-cancer drug carrier vesicles. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;131:112481. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112481.
18. Lv W., Wu H., Zhang Y., Li H., Shu H., Su C., Zhu Y., Wang T., Nie F. cRGD-targeted gold-based nanoparticles overcome EGFR-TKI resistance of NSCLC via low-temperature photothermal therapy combined with sonodynamic therapy. *Biomaterials Science*. 2023;11(5):1677–1691. DOI: 10.1039/D2BM01825J.
19. Tidt R., Shatene-Rivode K., Ito M., Pen B., Gun I., Akimov M. Combined products containing tyrosine kinase inhibitors and their use. Russian Federation patent RU 2660354. (In Russ.)
20. Hao H., Huang X., Tam A., Kasibhatla S. Combined therapy. Russian Federation patent RU 2695230. (In Russ.)
21. Laktionov K. K., Yudin D. I., Maevskaya Yu. N., Vladimirova L. Yu., Marinov D. T., Ardzinba M. S., Abdullaev A. G., Popova I. L. Efficiency integrated chemotherapy with EGFR receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer and an activating EGFR gene mutation. *Problems in oncology*. 2021;67(2):246–253. (In Russ.) DOI: 10.37469/0507-3758-2021-67-2-246-253.
22. Wang C., Cheng L., Liu Z. Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. *Theranostics*. 2013;3(5):317–330. DOI: 10.7150/thno.5284.
23. Ragulin Yu. A., Galkin V. N. Photodynamic therapy for lung cancer: major indications. *Siberian journal of oncology*. 2016;15(4):79–87. (In Russ.) DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-4-79-87.
24. Kostryukova L. V., Plyutinskaya A. D., Pankratov A. A., Korotkevich E. I., Prozorovskiy V. N., Tikhonova E. G., Torkhovskaya T. I., Teryoshkina Yu. A. Chlorine e6 in Phospholipid Nanoparticles with Specific Targeting and Penetrating Peptides as Prospective Composition for Photodynamic Therapy of Malignant Neoplasms. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2020;14:174–179. DOI: 10.1134/S1990750820020080.
25. Sun W., Kajimoto Y., Inoue H., Miyatake S.-I., Ishikawa T., Kuroiwa T. Gefitinib enhances the efficacy of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in malignant brain tumor cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2013;10(1):42–50. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2012.06.003.
26. Akopov A. L., Rusanov A. A., Urtenova M. A., Cheremnykh A. O., Chistyakov I. V., Kazakov N. V., Gerasin A. V., Romanikhin A. I. Effectiveness of endobronchial photodynamic therapy in combination with chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Problems in oncology*. 2017;63(6):882–885. (In Russ.) DOI: 10.37469/0507-3758-2017-63-6-882-885.
27. Akopov A. L., Rusanov A. A., Kazakov N. V., Papaian G. V., Chistiakov I. V. Photodynamic therapy for R1 lung cancer resections. *Grekov's Bulletin of Surgery*. 2019;178(1):21–24. (In Russ.) DOI: 10.24884/0042-4625-2019-178-1-21-24.
28. Zhu F., Xu L., Li X., Li Z., Wang J., Chen H., Li X., Gao Yu. Co-delivery of gefitinib and hematoporphyrin by aptamer-modified fluorinated dendrimer for hypoxia alleviation and enhanced synergistic chemo-photodynamic therapy of NSCLC. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;167:106004. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106004.
29. Jia X., Ye H.-N., Weng H., Huang N., Yu Y., Xue J.-P. Small molecular target-based multifunctional upconversion nanocomposites for targeted and in-depth photodynamic and chemo-anticancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;104:109849. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109849.
30. Meerovich I., Nichols M. G., Dash A. Low-intensity light-induced paclitaxel release from lipid-based nano-delivery systems. *Journal of Drug Targeting*. 2019;27(9):971–983. DOI: 10.1080/1061186X.2019.1571066.
31. Otvagin V. F., Nyuchev A. V., Kuzmina N. S., Grishin I. D., Gavryushin A. E., Romanenko Y. V., Koifman O. I., Belykh D. V., Peskova N. N., Shilyagina N. Y., Balalaeva I. V., Fedorov A. Y. Synthesis and biological evaluation of new water-soluble photoactive chlorin conjugate for targeted delivery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;144:740–750. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.12.062.
32. Otvagin V. F., Kuzmina N. S., Krylova L. V., Volovetsky A. B., Nyuchev A. V., Gavryushin A. E., Meshkov I. N., Gorbunova Y. G., Romanenko Y. V., Koifman O. I., Balalaeva I. V., Fedorov A. Y. Water-Soluble Chlorin/Arylaminoquinazoline Conjugate for Photodynamic and Targeted Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;62(24):11182–11193. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01294.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1468
УДК 616-77; 543.544; 615.477.8; 615.076

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Хроматографические методы контроля биологически активных добавок в смывах с имитационных моделей силиконовых лайнеров

С. В. Грибанова[1], И. Л. Удянская[1], В. Г. Янкова[1], Т. К. Слонская[1]✉, Н. Б. Эпштейн[2], А. А. Жукова[1], О. Н. Плахотная[1], В. Н. Кузина[1]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

✉ **Контактное лицо:** Слонская Татьяна Кимовна. **E-mail:** slonskaya_t_k@staff.sechenov.ru

ORCID: С. В. Грибанова – https://orcid.org/0000-0003-2005-2425; И. Л. Удянская – https://orcid.org/0000-0002-2564-1846; В. Г. Янкова – https://orcid.org/0000-0002-8233-5087; Т. К. Слонская – https://orcid.org/0000-0001-6963-9804; Н. Б. Эпштейн – https://orcid.org/0000-0002-3118-2252; А. А. Жукова – https://orcid.org/0000-0003-4511-1882; О. Н. Плахотная – https://orcid.org/0000-0001-7266-2933; В. Н. Кузина – https://orcid.org/0000-0003-2972-5331.

Статья поступила: 26.04.2023 **Статья принята в печать:** 19.01.2024 **Статья опубликована:** 19.01.2024

Резюме

Введение. В современной медицине ужесточаются требования к качеству используемых материалов, серьезное беспокойство вызывает проблема бактериальной и грибковой контаминации, возникающая при использовании полимерных изделий на основе силиконов, находящихся в тесном контакте с тканями и биологическими жидкостями организма. В связи с этим представляется актуальным введение в силиконовые изделия медицинского назначения различных биологически активных веществ (БАВ), в том числе с антимикробными свойствами.

Цель. В работе была изучена целесообразность введения БАВ в силиконовые изделия медицинского назначения для улучшения их качества и предотвращения негативных последствий их использования. Авторы статьи ставили перед собой задачу доказать возможность высвобождения выбранных БАВ из силиконовых изделий в процессе контакта с кожей и, как следствие, возникающий в ходе высвобождения БАВ бактериостатический эффект. Для этого важно было подтвердить факт присутствия БАВ в смывах с силиконовых дисков, что, в свою очередь, является доказательством того, что биологически активные добавки, первоначально равномерно распределенные в объеме силиконового диска, способны диффундировать к поверхности и далее высвобождаться с нее при механическом воздействии, а также при обработке спиртом и спиртосодержащими растворами.

Материалы и методы. В качестве БАВ выбраны симдиол и бисаболол – вещества с доказанными антимикробными, противовоспалительными и увлажняющими свойствами. Использовали бисаболол в виде препарата «Драгосантол 100» и симдиол в виде «SymDiol 68T». В качестве имитационной модели силиконовых лайнеров использовали силиконовые диски (СД), импрегнированные БАВ (0,2 % от объема). Высвобождение БАВ из имитационных моделей силиконовых лайнеров контролировали методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии.

Результаты и обсуждение. Была отработана методика введения БАВ в СД, подобраны оптимальные концентрации этих веществ для введения в силиконовую основу. Подтверждена возможность высвобождения импрегнированных добавок из изделия. Полученные в ходе эксперимента данные позволяют с уверенностью утверждать, что из силиконового диска даже при кратковременном и малоинтенсивном механическом контакте с кожей происходит высвобождение введенного препарата (симдиола и бисаболола), обладающего стабильным бактериостатическим действием на широкий спектр микроорганизмов. Процессу высвобождения БАВ из СД также способствует периодическая обработка изделия спиртосодержащими растворами, необходимость которой предусмотрена правилами эксплуатации. Полученные результаты хроматографических исследований вполне коррелируют с данными предшествующих микробиологических опытов по изучаемой проблеме. Высвобождение изученных БАВ из полимерных изделий в процессе эксплуатации в течение не менее 3 месяцев подтверждает целесообразность введения БАВ в силиконовую основу.

Заключение. В исследовании было подтверждено высвобождение биологически активных добавок из силиконовых изделий, применяемых в ортопедии. Введение БАВ в имитационные модели силиконовых лайнеров, безусловно, улучшает качество этих продуктов медицинского назначения и делает целесообразным их применение в различных областях протезирования и ортезирования.

Ключевые слова: силиконовые лайнеры, высвобождение биологически активных веществ, протезирование, капиллярная газожидкостная хроматография, тонкослойная хроматография

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

Вклад авторов. С. В. Грибанова, И. Л. Удянская и В. Г. Янкова придумали, разработали и провели эксперимент (тонкослойная хроматография). Т. К. Слонская принимала участие в разработке эксперимента, оформлении результатов, осуществляла написание текста статьи. Н. Б. Эпштейн и В. Н. Кузина принимали участие в проведении эксперимента (газожидкостная хроматография). А. А. Жукова осуществляла подбор литературы, участвовала в работе над текстом статьи. О. Н. Плахотная участвовала в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено независимым локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И. М. Сеченова.

© Грибанова С. В., Удянская И. Л., Янкова В. Г., Слонская Т. К., Эпштейн Н. Б., Жукова А. А., Плахотная О. Н., Кузина В. Н., 2024
© Gribanova S. V., Udyanskaya I. L., Yankova V. G., Slonskaya T. K., Epshtein N. B., Zhukova A. A., Plakhotnaya O. N., Kuzina V. N., 2024

Для цитирования: Грибанова С. В., Удянская И. Л., Янкова В. Г., Слонская Т. К., Эпштейн Н. Б., Жукова А. А., Плахотная О. Н., Кузина В. Н. Хроматографические методы контроля биологически активных добавок в смывах с имитационных моделей силиконовых лайнеров. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):34–44. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1468

Release Control of Biologically Active Substances from Simulation Model of Silicone Liners

Svetlana V. Gribanova[1], Irina L. Udyanskaya[1], Viktoriya G. Yankova[1], Tatiana K. Slonskaya[1]✉, Natalia B. Epshtein[2], Anna A. Zhukova[1], Olga N. Plakhotnaya[1], Vera N. Kuzina[1]

[1] I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[2] National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute). 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

✉ **Corresponding author:** Tatiana K. Slonskaya. **E-mail:** slonskaya_t_k@staff.sechenov.ru

ORCID: Svetlana V. Gribanova – https://orcid.org/0000-0003-2005-2425; Irina L. Udyanskaya – https://orcid.org/0000-0002-2564-1846; Viktoriya G. Yankova – https://orcid.org/0000-0002-8233-5087; Tatiana K. Slonskaya – https://orcid.org/0000-0001-6963-9804; Natalia B. Epshtein – https://orcid.org/0000-0002-3118-2252; Anna A. Zhukova – https://orcid.org/0000-0003-4511-1882; Olga N. Plakhotnaya – https://orcid.org/0000-0001-7266-2933; Vera N. Kuzina – https://orcid.org/0000-0003-2972-5331.

Received: 26.04.2023 **Revised:** 19.01.2024 **Published:** 19.01.2024

Abstract

Introduction. In modern medicine, the requirements for the quality of used materials are getting stricter. There is serious concern about bacterial and fungal contamination related to the use of silicone polymeric products, especially those that are in direct contact with human tissues and body fluids. In this regard, the issue of impregnating silicone medical products with various biologically active substances (BAS), particularly with antimicrobial properties, appears relevant.

Aim. The research studies the relevance of adding BAS into silicone medical devices to improve their quality and prevent negative consequences of their use. The authors of the article aimed at proving prolonged release of the chosen BAS from silicone products during their contact with skin and the bacteriostatic effect emerging as a result of the BAS release. That required verifying the existence of BAS in the washouts from silicone disks, which, in turn, proves the fact that BAS initially distributed evenly in the volume of a silicone disk are capable of diffusing to the surface and then releasing from it under mechanical action, as well as when treating it with alcohol or alcohol-containing solutions.

Materials and methods. Symdiol and bisabolol were selected as the BAS for this study due to their proved antibacterial, anti-inflammatory and moisturizing properties. Bisabolol and symdiol were used in the form of Dragosantol 100 and SymDiol 68T preparations correspondingly. Silicone disks (SDs), impregnated with BAS (0,2 % of the volume) were used as a simulation model of silicone liners. The BAS release from silicone liner models was assessed using highly sensitive chromatographic methods of thin-layer and gas-liquid chromatography.

Results and discussion. The method of impregnating SDs with BAS was worked out, the optimal concentration of these substances to add them into the silicone base was selected. The release of the impregnated additives, as well as prolonged stable releasing effect, were confirmed. The data obtained during the experiment allows saying with confidence that the impregnated preparation (symdiol and bisabolol) releases from a SD even upon short and low-intensity mechanical contact with skin, which produces stable bacteriostatic effect on a wide range of microorganisms. The process of BAS release from SDs is also facilitated when treating the product periodically with alcohol-containing solutions, which is necessary according to the operating rules. The obtained results of the chromatographic research quite correlate with the data of the previous microbiological experiments regarding the studied topic. Release of the studied BAS from polymer products during their contact with the skin within the period of not less than 3 months justifies feasibility of adding these BAS into the silicone base.

Conclusions. The study confirmed the release of biologically active substances from silicone medical products. Adding BAS into silicone liners undoubtedly improves the quality of these medical products, which can be applied in prosthetics and orthoses.

Keywords: silicone liners, release of biologically active substances, prosthetics, capillary gas-liquid chromatography, thin-layer chromatography

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

Contribution of the authors. Svetlana V. Gribanova, Irina L. Udyanskaya and Viktoriya G. Yankova devised, designed and conducted the experiment (thin-layer chromatography). Tatiana K. Slonskaya both participated in designing the experiment and arranging the results, and wrote the text of the article. Natalia B. Epshtein and Vera N. Kuzina participated in conducting the experiment (gas-liquid chromatography). Anna A. Zhukova selected literature and participated in writing the text of the article. Olga N. Plakhotnaya participated in writing the text of the article. All the authors discussed the results.

Compliance with the principles of ethics. The study was approved by the independent local ethics committee of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.

For citation: Gribanova S. V., Udyanskaya I. L., Yankova V. G., Slonskaya T. K., Epshtein N. B., Zhukova A. A., Plakhotnaya O. N., Kuzina V. N. Release control of biologically active substances from simulation model of silicone liners. *Drug development & registration*. 2024;13(1):34–44. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1468

ВВЕДЕНИЕ

Многообразие физических и химических свойств полимеров открывает широчайшие возможности их применения во всех областях медицины, а именно: в гастроэнтерологии, дерматологии, урологии, гинекологии, стоматологии, хирургии, ортопедии и т. д. [1–3]. В современной медицине ужесточаются требования к качеству используемых материалов, в связи с чем большое количество исследований направлено на улучшение потребительских свойств клинических

продуктов [4–10]. Серьезное беспокойство вызывает проблема бактериальной и грибковой контаминации, возникающая при использовании полимерных изделий на основе силиконов, в первую очередь находящихся в тесном контакте с тканями и биологическими жидкостями организма. На поверхности силиконового изделия при его длительном нахождении в организме образуются устойчивые бактериальные биопленки, резистентные к различным антимикробным препаратам [11, 12]. Анализ литературных источников позволил выделить два основных способа решения этой проблемы на современном этапе. Первый – модифицирование поверхности силикона антибактериальным агентом [13, 14]. Здесь подавляющее число исследователей предлагает вводить ионы серебра в поверхностный слой полимерных изделий. Контроль высвобождения ионов Ag^+ методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой показал [15], что относительно слабая адгезия обеспечивает быстрое высвобождение Ag^+, в то время как сильная адгезия дает более низкую кумулятивную концентрацию Ag^+. Покрытия давали кинетику замедленного высвобождения с максимальной кумулятивной концентрацией Ag^+ всего 0,45 мг/л после 45 дней выдерживания их в фосфатном буферном растворе, что было намного ниже токсичной концентрации для клеток человека. Недостатком этого метода является довольно слабая адгезия ионов Ag^+ к силиконовым поверхностям [15, 16], поэтому для увеличения ионной адгезии предлагаются различные способы обработки поверхностей [17–19].

Второй способ – введение и распределение антисептика по всему объему изделия. Здесь возможно использование широкого спектра веществ с доказанными биологически активными свойствами. Кроме того, введение данных веществ улучшает свойства самого силикона, повышая его устойчивость, эластичность и проч. [4, 20–22].

Важной задачей исследователей, работающих в данной области науки, является подтверждение и контроль высвобождения биологически активных веществ из объема или с поверхности силиконового медицинского изделия. В работе [17] за выделением ионов Ag^+ следили методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Высвобождение триклозана, введенного в силиконовые эластомеры с целью предотвращения образования биопленок и снижения случаев катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей, проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детекцией [19]. Антибактериальная активность подтверждалась микробиологическими исследованиями. В работе [23] был исследован S-нитрозо-трет-додецилмеркаптан как источник долгосрочного донора NO в изделиях из силиконовой резины. Высвобождение оксида азота контролировали методом хемилюминесценции.

В работе [24] было проведено модифицирование поверхности полидиметилсилоксана комбинированными физико-химическими методами. Метод заключался в ионно-лучевой обработке с последующим введением акриловой кислоты и ее взаимодействием с имеющимися химическими веществами. В результате поверхность полимера модифицировалась аминогруппами и координационными соединениями цинка(II). Прикрепление клинических штаммов *Staphylococcus epidermidis* и *Klebsiella pneumonia* к исходной и модифицированной поверхностям исследовали с помощью оптической микроскопии. Полученные результаты показали, что бактериальная контаминация поверхности модифицированного силиконового каучука значительно уменьшилась. Следовательно, можно предложить данный способ для антибактериальной обработки поверхностей медицинских изделий из силиконовой резины. В работе [25] предлагается вводить в полимерный субстрат в качестве биологически активного агента с контролируемым высвобождением повидон-йод.

В связи с ростом в современном обществе активности людей с ограниченными возможностями увеличивается частота и интенсивность использования изделий ортопедического назначения, в частности протезов конечностей. На сегодняшний день наиболее востребованным вариантом крепления протеза конечности к культе является крепление с помощью силиконовых лайнеров (рисунок 1) [26–28].

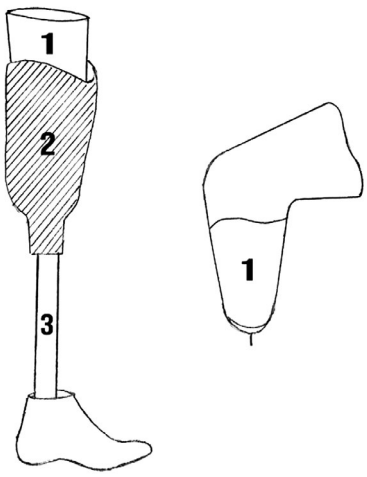


Рисунок 1. Силикон в изделиях медицинского назначения:
1 – силиконовый вкладыш; 2 – чехол для остаточной конечности; 3 – опорный модуль

Figure 1. Silicone in medical products:
1 – silicone liner; 2 – case for the residual limb; 3 – support module

Тем не менее длительный контакт лайнера с поверхностью кожи при систематическом ношении изделий ортопедического назначения вызывает различные побочные эффекты: натертости, воспаления и т. д.

В связи с этим представлялось целесообразным введение в основу при изготовлении силиконового чехла культей верхних и нижних конечностей биологически активных веществ с дезинфицирующими и ранозаживляющими свойствами. Предполагается, что при механическом контакте лайнера с поверхностью кожи культи будет происходить высвобождение введенных веществ из силиконовой основы лайнера и их благоприятное воздействие на кожу. Очевидно, что доказательство высвобождения добавок биологически активных веществ из силиконовых материалов в процессе эксплуатации является обоснованием целесообразности их введения в силиконовые изделия для протезирования. Интерес представляет исследование возможности диффузии БАВ к поверхности изделия и дальнейшего высвобождения с нее при механическом контакте с кожей.

Целью данного исследования являлось доказательство возможности высвобождения выбранных биологически активных добавок из силиконовых изделий медицинского назначения в процессе их эксплуатации в течение срока годности.

Задача исследования состояла в подтверждении присутствия БАВ в смывах с силиконовых дисков высокочувствительными методами, что, в свою очередь, доказывает возможность высвобождения добавок из силиконов.

Для введения в силиконовую основу в качестве биологически активных добавок были выбраны два вещества: бисаболол (1-метил-4-(1,5-диметил-1-гидрокси-4-гексенил)-циклогекс-1-ен) и симдиол – смесь 1,2-гександиола и 1,2-октандиола в соотношении 1:1 (98 %) и трополона (2 %). Ранее авторами была разработана и апробирована методика введения этих веществ в силиконовую основу [29]. Эти вещества были выбраны как удовлетворяющие требованиям к добавкам по воздействию на кожу, токсикологической безопасности и доступности [30, 31].

По сведению авторов, в научной литературе практически не сообщается о методах исследования процессов высвобождения бисаболола и симдиола из содержащих эти БАВ силиконовых изделий медицинского назначения. В работе [32] авторы исследовали бактерицидное и бактериостатическое действие указанных БАВ при их высвобождении из имитационной модели силиконовых лайнеров. Принимая во внимание низкое содержание введенных в силиконы веществ и их химическую природу, для контроля высвобождения БАВ обосновано применение хроматографических методов анализа, а именно методов тонкослойной хроматографии (ТСХ) и газожидкостной хроматографии (ГЖХ) [33–37]. Методы ГЖХ и ТСХ выбраны как наиболее перспективные для решения задачи исследования, так как обладают достаточно высокой чувствительностью для обнаружения следовых количеств органических веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор БАВ определялся следующими требованиями:

1) хорошая смешиваемость препарата с компонентами силиконовых дисков (СД);
2) устойчивость к температурам, применяемым при изготовлении имитационной модели СД;
3) наличие антимикробного, противовоспалительного, увлажняющего, антиоксидантного, смягчающего действия;
4) доказанная токсикологическая безопасность препарата;
5) доступность.

Указанным требованиям в полной мере отвечали следующие БАВ [32–33]:

1) бисаболол (1-methyl-4-(1,5-dimethyl-1-hydroxy-4-hexenyl)-cyclohex-1-ene) в форме «Драгосантол 100» компании Symrise (Германия).

В качестве имитационной модели силиконовых лайнеров использовали СД, полученные из компонентов, предоставленных Реутовским экспериментальным заводом средств протезирования.

Выбранные активные добавки хорошо смешивались с компонентами силиконовой композиции и равномерно распределялись в объеме пластинки.

Введение БАВ в силиконовые лайнеры

Для изготовления имитационных моделей силиконовых лайнеров, импрегнированных БАВ, смешивали силиконовую основу с определенным количеством активной добавки (0,2 % по объему) в соответствии с ранее описанной методикой [29]. Смесь тщательно перемешивали для удаления пузырьков воздуха и термостатировали до полного застывания массы при температуре 80 °С в течение 60 минут. Качество готовых СД оценивали по полноте застывания и отсутствию липкости.

Методика введения добавок в имитационные модели силиконовых лайнеров отработана и описана авторами ранее [29]. В данном исследовании была предпринята попытка увеличить концентрации вводимых БАВ. Это потребовало корректировки температурного режима и времени вулканизации.

Для изготовления имитационных моделей силиконовых прокладок в чашках Петри смешивали по 10 мл вязких силиконовых компонентов А и В, затем мерной пипеткой добавляли в смесь необходимое количество активной добавки. Смесь тщательно перемешивали для удаления пузырьков воздуха и термостатировали до полного застывания массы при температуре 80 °С в течение 60 минут. Наблюдали полную гомогенизацию смесей БАВ и компонентов силиконовой композиции. Качество готовых прокладок оценивали по полноте застывания прокладок и отсутствию липкости. Результаты ввода активных добавок в силиконовые прокладки представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты ввода различных концентраций активных добавок в имитационные модели СД

Table 1. Results of adding various concentrations of active additives into SD simulation models

Активные добавки Active Additives	Концентрации введенных добавок, об.% Concentration of Added Additives, volume %				
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Симдиол Symdiol	++	++	+	–	–
Драгосантол Dragosantol	++	++	+	–	–

Примечание. «++» – полное застывание, без липкости, «+» – полное застывание, с липкостью.

Note. "++" – complete freezing, without stickiness, "+" – complete freezing, with stickiness.

Как следует из данных таблицы 1, заданным качествам полностью удовлетворяли имитационные модели СД при введении всех активных добавок в концентрации не более 0,2 %. Застывание прокладок с концентрацией 0,3 % было удовлетворительным, но при соприкосновении с кожей ощущалась неприятная липкость.

Попытки внести изменения в технологические параметры процесса вулканизации (повышение температуры до 100–110 °С и увеличение времени вулканизации до 1,5–2,0 часов) с целью изготовления имитационных моделей силиконовых лайнеров с повышенным содержанием БАВ не привели к удовлетворительным результатам. При введении активных добавок в концентрациях, превышающих 0,2 %, полного затвердевания и отсутствия липкости получить не удалось.

Поэтому для дальнейших исследований для всех активных компонентов использовали концентрацию введения 0,2 %. Важно отметить, что эта концентрация входит в диапазон рекомендуемого производителем процентного ввода для всех испытуемых добавок.

Приготовление смывов с имитационных моделей СД, содержащих и не содержащих добавки БАВ, для проведения хроматографии

Для проведения испытаний использовались СД, приготовленные промышленным способом, с 0,2 % бисаболола, с 0,2 % симдиола и без введения добавок.

В целях максимального приближения условий опыта к реальным условиям эксплуатации СД предварительно выдерживали в термостате при $t = 37$ °С в течение часа. Смыв производили в одноразовых латексных перчатках ватным тампоном, смоченным 5 мл этилового спирта. СД обрабатывали ватным тампоном в течение 30 секунд. Ватный тампон отжимали в мерную пробирку. Объем смыва доводили этанолом до 5 мл.

Аналогичным образом получали смывы с СД с введенным бисабололом и симдиолом. Опыты проводили в трех повторностях.

Анализ высвобождения бисаболола и симдиола из СД методами ТСХ и ГЖХ

Тонкослойную хроматографию осуществляли на пластинах марки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А» размером 50 × 70 мм с закрепленным слоем силикагеля в качестве адсорбента. ТСХ бисаболола проводили согласно методике, описанной в [33]: подвижная фаза представляла собой смесь равных объемов гексана и 5%-го раствора этилацетата в бензоле. Детектирование хроматографических зон осуществляли путем последовательного опрыскивания пластины 30%-м раствором сурьмы(III) хлорида в хлороформе и реактивом ЕР по Шталю (раствор парадиметиламинобензальдегида в бензоле) [33]. Для ТСХ симдиола использовали систему из н-бутанола, ледяной уксусной кислоты, диэтилового эфира и воды в соотношении 9:6:3:1, детектирование проводили опрыскиванием 1 моль/л водным раствором перманганата калия.

Газожидкостное хроматографирование исследуемых образцов бисаболола в смывах с СД проводили на газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000М» (Россия) с использованием стеклянной капиллярной колонки HP-FFAP (Agilent Technologies, США) с полиэтиленгликолем, модифицированным нитротерефталевой кислотой, в качестве высокополярной неподвижной фазы. Колонка длиной 15 м с внутренним диаметром 0,53 мм, толщиной неподвижной фазы 1 мкм, температура колонки – 200 °С, газ-носитель – азот.

Хроматографирование образцов симдиола в смывах с СД проводили на газовом хроматографе «Кристалл 2000М» (ООО НПФ «Мета-хром», Россия) с использованием стеклянной капиллярной колонки длиной 60 м с внутренним диаметром 0,32 мм, толщиной неподвижной фазы 1 мкм, с неполярной неподвижной фазой марки DB-1 (Agilent Technologies, США), газ-носитель – гелий. В качестве температурного режима использовали программирование температуры от 60 до 250 °С со скоростью подъема температуры 8 °С/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ТСХ бисаболола

После опрыскивания хроматографической пластины 30%-м раствором сурьмы(III) хлорида в хлороформе на пластине появлялись оранжево-красные пятна, соответствующие хроматографическим зонам бисаболола, которые после применения реактива ЕР по Шталю окрашивались в сине-зеленый цвет, а по мере высыхания пластины превращались из темно-розовых в темно-бордовые в зависимости от концентрации бисаболола.

Хроматограммы стандарта бисаболола и пробы спиртовых смывов с имитационных моделей СД, импрегнированных бисабололом, непосредственно после изготовления, через 3 месяца и через 6 месяцев после изготовления СД с БАВ приведены на рисунке 2.

Идентичность бисабололу хроматографических зон в пробах спиртовых смывов (пробы 1, 2 и 3) доказывали сравнением значений относительных коэффициентов подвижности (R_s) стандартного раствора бисаболола и компонентов в изучаемых пробах. Коэффициент подвижности бисаболола в стандартном растворе составлял 0,26.

Результаты расчетов R_s приведены в таблице 2.

Таблица 2. Значения R_s хроматографических зон компонентов в пробах смывов относительно стандарта бисаболола

Table 2. R_s values of chromatographic zones in washout samples as to the bisabolol standard

Анализируемый объект Analyzed object	**Проба 1 (спиртовой смыв непосредственно после изготовления)** Sample 1 (alcohol washout right after preparation)	**Проба 2 (спиртовой смыв через 3 месяца)** Sample 2 (alcohol washout in three months)	**Проба 3 (спиртовой смыв через 6 месяцев)** Sample 2 (alcohol washout in six months)
$R_s \pm \Delta R_s$	1,07 ± 0,04	1,05 ± 0,05	1,00 ± 0,04

Представленные в таблице 2 данные показывают возможность применения данной методики для обнаружения низких концентраций бисаболола в спиртовых смывах с СД, импрегнированных этим веществом. Кроме того, важно отметить присутствие биологически активной добавки в спиртовых смывах с СД в течение всего срока годности изделия (до 6 месяцев).

ТСХ симдиола. При проведении ТСХ спиртовых смывов с СД, импрегнированных симдиолом, хроматографическая зона «стандарта» легко обнаруживалась сразу после достижения подвижной фазой линии финиша в виде бликующего на свету пятна на влажном поле. После термического детектирования хроматографическую зону «стандарта» обнаруживали по бурому пятну на светлом фоне пластины. После опрыскивания пластинки 1 моль/л раствором перманганата калия хроматографическую зону чистого симдиола обнаруживали по желтому пятну каплеобразной формы на розовом фоне пластинки.

Во всех случаях детектирования в нескольких повторностях на пластинке обнаруживалось пятно симдиола только в пробе «стандарта», т. е. в чистом симдиоле. При этом в данных условиях хроматографирования компоненты симдиола – гександиол и октандиол – не разделялись, а элюировались общей хроматографической зоной в виде вытянутого пятна с коэффициентом подвижности Rf = 0,30.

Для повышения чувствительности детектирования хроматографических зон в пробах растворов симдиола предпринимались попытки обработки пластинки более разбавленными растворами перманганата калия, чтобы обесцвечивание розовой окраски в зоне симдиола с низкой концентрацией было бы заметно. Однако положительных результатов не удалось достигнуть: зоны симдиола в пробах растворов не проявлялись.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что метод ТСХ в апробированных его экспериментальных вариантах недостаточно чувствителен к симдиолу и не позволяет регистрировать симдиол в спиртовых смывах с СД, в которых он находится в очень низкой концентрации. Очевидно, следует использовать более чувствительные и эффективные хроматографические методы анализа.

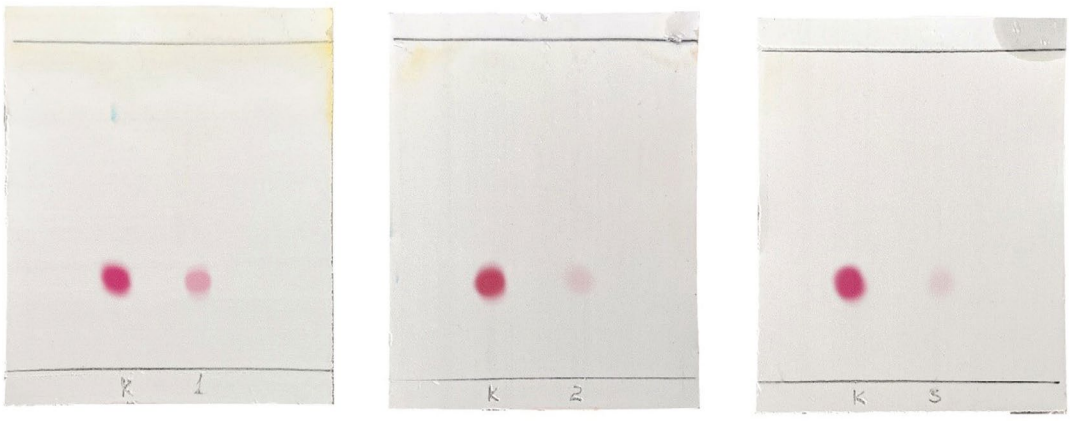


Рисунок 2. ТСХ спиртовых смывов с СД с 0,2 % бисаболола:
проба 1 – непосредственно после изготовления СД; проба 2 – через 3 месяца; проба 3 – через 6 месяцев

Figure 2. TLC of alcohol washouts from SDs with bisabolol 0,2 %:
sample 1 – right after preparation of a SD; sample 2 – in three months; sample 3 – in six months

При хроматографировании спиртовых смывов с СД без добавления БАВ («холостой опыт») в использованных системах не было обнаружено никаких хроматографических зон, что позволяет говорить об отсутствии высвобождения посторонних примесных веществ.

Метод капиллярной ГЖХ является высокоэффективным методом разделения многокомпонентных смесей близких по свойствам летучих веществ. Метод обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Поэтому представлялось целесообразным применение этого метода для анализа присутствия анализируемых БАВ в спиртовых смывах с СД, и в первую очередь симдиола, присутствие которого не удалось обнаружить методом ТСХ.

Задачей метода ГЖХ также являлось разделение симдиола на составляющие его компоненты, их идентификация и определение в смывах с СД.

Идентификацию бисаболола в пробах смывов проводили сравнением значений времен удерживания пика бисаболола в стандарте (рисунок 3 – 3,10 мин) с временем удерживания пиков на хроматограммах смывов (рисунок 4 – 3,09 мин). Сравнение хроматограмм показывает, что бисаболол однозначно обнаруживается в пробах смывов с СД, импрегнированных бисабололом, даже спустя 6 месяцев после изготовления изделия. В качестве «холостого опыта» была получена хроматограмма спиртового смыва с СД без введения бисаболола, показывающая отсутствие пика с временем удерживания около 3 минут. Полученные результаты указывают на пригодность метода ГЖХ при проведении исследования по использованной методике для обнаружения бисаболола в пробах с низкой концентрацией.

На хроматограмме стандарта симдиола было получено два раздельных пика с временами удержи-

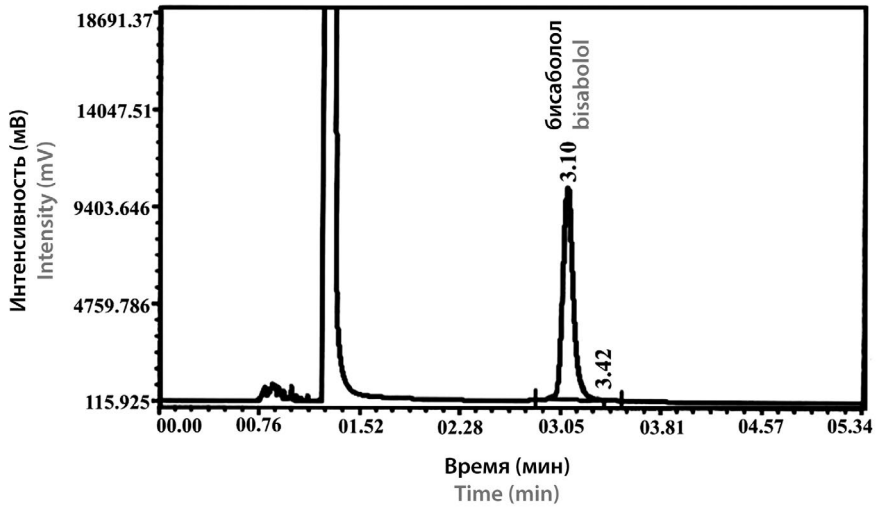


Рисунок 3. **Хроматограмма стандарта бисаболола**

Figure 3. **Bisabolol standard chromatogram**

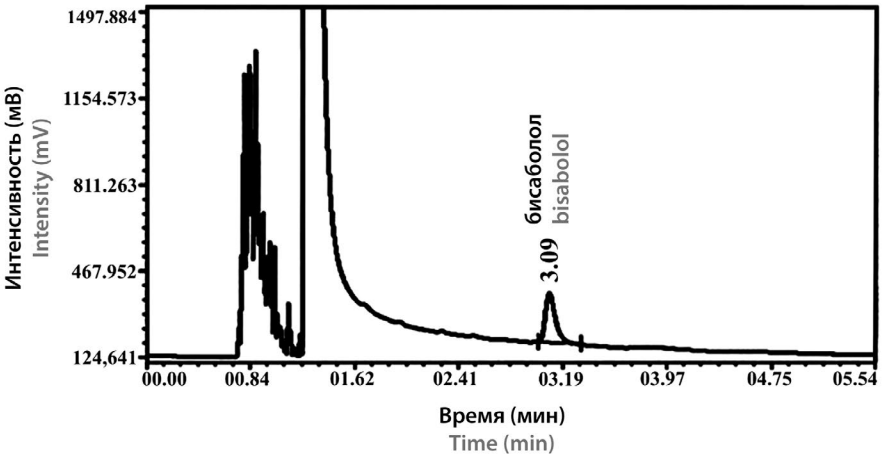


Рисунок 4. **Хроматограмма пробы спиртового смыва с СД, импрегнированного бисабололом, через 3 месяца после изготовления**

Figure 4. **The chromatogram of the alcohol washout from a SD impregnated with bisabolol three months after preparation**

вания 9,45 мин и 13,53 мин, что подтверждает присутствие в анализируемой пробе основных составляющих компонентов: гександиола и октандиола соответственно (рисунок 5).

Третий компонент симдиола – трополон – не идентифицировался по причине того, что является примесным компонентом в составе симдиола. Количественный расчет методом внутренней нормализации показал, что соотношение диолов в симдиоле составляет 48,6 : 51,4 %, т. е. примерно 1 : 1.

Рисунок 6 демонстрирует, что проба спиртового смыва представляла собой многокомпонентную смесь, поэтому для анализа образцов смывов целесообразно было использование режима ускоренного программирования температуры: от 60 до 250 °С со скоростью подъема температуры 8 °С/мин. Гександиол и октандиол были идентифицированы путем сравнения значений времен удерживания пиков на хроматограммах смывов с СД и хроматограмме стандартного образца симдиола, зарегистрированной в том же режиме программирования температуры. Были зафиксированы небольшие пики с временами удерживания 9,45 и 13,53 мин, что подтверждает наличие в спиртовых смывах компонентов, составляющих симдиол: гександиола и октандиола соответственно. Все остальные пики на хроматограммах смывов могут быть объяснены присутствием посторонних веществ, вымытых с поверхности изделия. Судя по симметричности пиков, это неполярные вещества, похожие по своему хроматографическому поведению на углеводороды. Было сделано предположение, что эти вещества представляют собой низкомолекуляр-

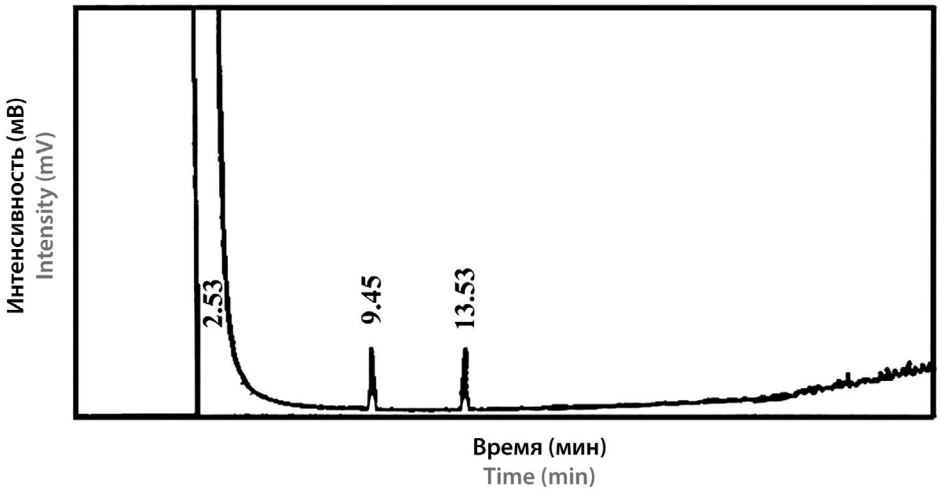


Рисунок 5. **Хроматограмма стандарта симдиола**

Figure 5. **Symdiol standard chromatogram**

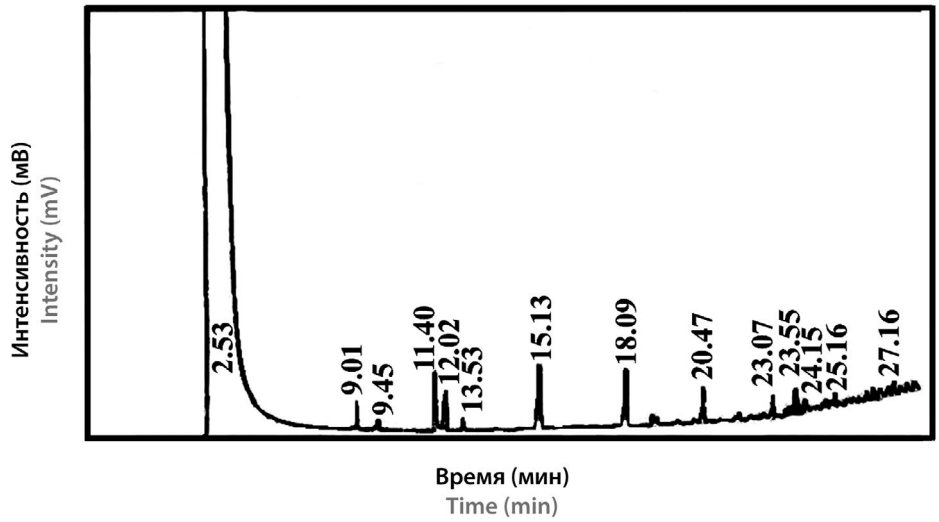


Рисунок 6. **Хроматограмма пробы спиртового смыва с СД, импрегнированного симдиолом, через 3 месяца после изготовления**

Figure 6. **Chromatogram of the alcohol washout from a SD impregnated with symdiol three months after preparation**

ную фракцию изделиеобразующего силикона. Хроматограмма «холостого опыта» – смыва с СД без введения симдиола – не содержала пики с временами удерживания, соответствующими компонентам симдиола.

Результаты хроматографического анализа стандартов бисаболола и симдиола, а также их спиртовых смывов с силиконовых дисков, полученные через 6 месяцев, идентичны аналогичным образцам, исследованным через 3 месяца.

Полученные методом ГЖХ данные анализа спиртовых смывов свидетельствуют о пригодности этого метода для обнаружения симдиола и бисаболола в растворах с низкой его концентрацией. Симдиол однозначно обнаруживается на хроматограммах смывов, так как пики его компонентов не перекрываются пиками посторонних веществ, присутствующих в смывах.

Полученные результаты хроматографических исследований вполне коррелируют с результатами микробиологических опытов по данной проблеме, в которых было наглядно показано бактериостатическое действие изучаемых биологически активных добавок при их высвобождении из имитационных моделей силиконовых лайнеров при механическом контакте с кожей [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была предложена и реализована на практике идея введения биологически активных добавок в силиконовые изделия медицинского назначения, применяемые при протезировании, для чего отработана методика введения в силиконовую основу различных БАВ, подобраны оптимальные концентрации бисаболола и симдиола для введения в имитационные модели силиконовых лайнеров.

При введении БАВ в силиконовые лайнеры нельзя исключить возможности образования прочных физико-химических связей вводимых веществ с основой изделия. При этом использование силиконовых прокладок с введенными в них биологически активными добавками целесообразно лишь при возможности диффузии БАВ к поверхности изделия и последующем высвобождении с данной поверхности для контакта с кожей в процессе ношения, т. е. при механическом контакте СД с кожей остаточных конечностей или при обработке СД перед применением этанолом или этанолсодержащими жидкостями, которая предусмотрена инструкцией по эксплуатации изделий, импрегнированных БАВ.

Высокочувствительными хроматографическими методами (ТСХ и ГЖХ) исследована и подтверждена возможность высвобождения из силиконовых изделий медицинского назначения биологически активных добавок (симдиола и бисаболола) – веществ с доказанными антимикробными, противовоспалительными и увлажняющими свойствами.

Обоснована возможность применения метода ТСХ для контроля высвобождения бисаболола. При этом метод ТСХ в апробированных его экспериментальных вариантах оказался недостаточно чувствителен к симдиолу и не позволял регистрировать симдиол в спиртовых смывах с СД из-за очень низких концентраций. Очевидно, следует использовать более чувствительные и эффективные хроматографические методы анализа.

Метод ГЖХ для решения поставленных экспериментальных задач оказался более пригодным, поскольку позволил контролировать присутствие как бисаболола, так и симдиола в спиртовых смывах с имитационных моделей СД несмотря на очень низкие концентрации указанных БАВ.

Достоверно подтверждено, что постепенное высвобождение импрегнированных добавок с поверхности имитационной модели силиконового изделия происходит в течение не менее 6 месяцев, что соответствует среднему сроку годности силиконовых изделий медицинского назначения, применяемых при протезировании.

Результаты данного исследования подтверждают целесообразность введения бисаболола и симдиола (веществ, обладающих смягчающим и увлажняющим действием на кожу, а также бактериостатическим действием на широкий спектр микроорганизмов) в силиконовые изделия медицинского назначения для улучшения их потребительских свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Singh B., Bembalagi M., Nagmoti J. M., Patil R., Patil A. Comparison of effectiveness of silver zeolite as an antimicrobial agent in acrylic and silicone soft liners in complete denture patients: An in vivo study. *Indian Journal of Health Sciences and Biomedical Research*. 2018;11(2):170–174. DOI: 10.4103/kleuhsj.kleuhsj_243_17.
2. Azpiazu-Flores F. X., Leyva del Rio D., Schricker S. R., Johnston W. M., Lee D. J. Effect of three-dimensionally printed surface patterns on the peak tensile load of a plasticized acrylic-resin resilient liner. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2022. DOI: 10.1016/j.prosdent.2022.04.012.
3. Cagle J. C., Hafner B. J., Taflin N. B. S., Sanders J. E. Characterization of Prosthetic Liner Products for People with Transtibial Amputation. *JPO Journal of Prosthetics and Orthotics*. 2018;30(4):187–199. DOI: 10.1097/JPO.0000000000000205.
4. Yang X., Li Z., Jiang Z., Wang S., Liu H., Xu X., Wang D., Miao Y., Shang S., Song Z. Mechanical reinforcement of room-temperature-vulcanized silicone rubber using modified cellulose nanocrystals as cross-linker and nanofiller. *Carbohydrate Polymers*. 2020;229:115509. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115509.
5. Sanders J. E., Redd C. B., Larsen B. G., Vamos A. C., Brzostowski J. T., Hafner B. J., Allyn K. J., Henrikson K. M., McLean J. B., Hinrichs P. A. Novel Method for Assessing Prosthesis Use and Accommodation Practices of People with Transtibial Amputation. *JPO Journal of Prosthetics and Orthotics*. 2018;30(4):214–230. DOI: 10.1097/jpo.0000000000000209.
6. Zhu Y., Ke J., Zhang L. Anti-biofouling and Antimicrobial Biomaterials for Tissue Engineering. In: Li B., Moriarty Th. F., Webster Th., Xing M. eds. Racing for the Surface. Cham: Springer International Publishing. 2020. P. 333–354. DOI: 10.1007/978-3-030-34471-9.

7. Rai P., Jankiraman V., Teacher M., Velu R., Kumar S. A., Binedell T., Subburaj K. Design and optimization of a 3D printed prosthetic socket for transtibial amputees. *Materials Today: Proceedings*. 2022;70:454–464. DOI: 10.1016/j.matpr.2022.09.365.
8. Sathya S., Shanmuganathan B., Manirathinam G., Ruckmani K., Devi K. P. α-Bisabolol loaded solid lipid nanoparticles attenuates Aβ aggregation and protects Neuro-2a cells from Aβ induced neurotoxicity. *Journal of Molecular Liquids*. 2018;264:431–441. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.05.075.
9. Antoniac I., Sinescu C., Antoniac A. Adhesion aspects in biomaterials and medical devices. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2016;30(16):1711–1715. DOI: 10.1080/01694243.2016.1170959.
10. Chooi W. H., Yee S. COVID 19: The safety profile of common disinfectants used for sanitization. *Progress in Drug Discovery & Biomedical Science*. 2020;3(1):a0000112. DOI: 10.36877/pddbs.a0000112.
11. Francolini I., Vuotto C., Piozzi A., Donelli G. Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview. *APMIS*. 2017;125(4):392–417. DOI: 10.1111/apm.12675.
12. Erathodiyil N., Chan H.-M., Wu H., Ying J. Y. Zwitterionic polymers and hydrogels for antibiofouling applications in implantable devices. *Materials Today*. 2020;38:84–98. DOI: 10.1016/j.mattod.2020.03.024.
13. Chladek G., Barszczewska-Rybarek I., Lukaszczyk J. Developing the procedure of modifying the denture soft liner by silver nanoparticles. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2012;14(1):23–29.
14. Deng J., Ren L., Pan Y, Gao H., Meng X. Antifungal property of acrylic denture soft liner containing silver nanoparticles synthesized in situ. *Journal of Dentistry*. 2021;106:103589. DOI: 10.1016/j.jdent.2021.103589.
15. Guo R. J., Yin G. D., Sha X. J., Zhao Q., Wei L. Q., Wang H. F. The significant adhesion enhancement of Ag-polytetrafluoroethylene antibacterial coatings by using of molecular bridge. *Applied Surface Science*. 2015;341:13–18. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.02.131.
16. Zhu A., Wang Y. F.. Momentive Performance Materials Inc, assignee. Silicone rubber exhibiting effective antimicrobial activity. EP Patent EP2254421A1. 2010-12-01. Available at: https://patents.google.com/patent/EP2254421A1/en. Accessed: 29.09.2023.
17. Guo R., Wen J., Gao Y., Li T., Yan H., Wang H., Niu B., Jiang K. Effect of the adhesion of Ag coatings on the effectiveness and durability of antibacterial properties. *Journal of Materials Science*. 2018;53:4759–4767. DOI: 10.1007/s10853-017-1939-z.
18. Jordan R. P. C., Malic S., Waters M. G., Sticker D. J., Williams D. W. Development of an antimicrobial urinary catheter to inhibit urinary catheter encrustation. *Microbiology Discovery*. 2015;3(1):1–7. DOI: 10.7243/2052-6180-3-1.
19. Aoki S., Yamakawa K., Kubo K., Takeshita J. Antibacterial Properties of Silicone Membranes after a Simple Two-Step Immersion Process in Iodine and Silver Nitrate Solutions. *Biocontrol Science*. 2018;23(3):97–105. DOI: 10.4265/bio.23.97.
20. Aysa N. H., Al-Maamori M. H., Al-Maamori N. A. A. Effect of the Unmodified and Modified ZnO Nanoparticles on the Mechanical and Antibacterial Properties of Silicone Rubber Using in Medical Applications. *Journal of NanoScience, NanoEngineering & Applications*. 2015;1(3):119–124.
21. McBride M. C., Malcolm R. K., Woolfson A. D., Gorman S. P. Persistence of antimicrobial activity through sustained release of triclosan from pegylated silicone elastomers. *Biomaterials*. 2009;30(35):6739–6747. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.047.
22. Mustacich R. V., Lucas D. S., Stone R. L., inventors. Procter and Gamble Co, assignee. Antimicrobial polymer compositions. US Patent 4479795A. 30.10.1984.
23. Ketchum A. R., Kappler M. P., Wu J., Xi C., Meyerhoff M. E. The preparation and characterization of nitric oxide releasing silicone rubber materials impregnated with S-nitroso-tert-dodecyl mercaptan. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;4(3):422–430. DOI: 10.1039/C5TB01664A.
24. Карпунина Т. И., Якушева Д. Э., Кисельков Д. М., Великанова М. С., Якушев Р. М. Модификация поверхности медицинских изделий из силиконового каучука: проблемы и перспективы. *Вестник «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2015;17(11):1–6.
25. Usala A. L. Immunix Inc, assignee. Polymeric substrates containing povidone-iodine as a control release biologically active agent. Jp Patent CA2003169A1. 17.05.1990.
26. Shit S. C., Shah P. A. Review on Silicone Rubber. *National Academy Science Letters*. 2013;36(4):355–365. DOI: 10.1007/s40009-013-0150-2.
27. Schäfer M. Silikone in der technischen Orthopädie. *Medizinisch-Orthopädische Technik MOT*. 2008;32:7–16.
28. Ватолинский, Л. Е., Хмелевская, И. О., Щетинина, Л. Г., Белевцова Л. О., Гришко Е. К. Силиконы в протезировании и ортезировании. *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2010;1:41–45.
29. Удянская И. Л., Янкова В. Г., Слонская Т. К., Грибанова С. В., Плахотная О. Н., Краснюк-мл. И. И., Хлопонина А. В., Рыбина А. Д. Биологически активные вещества как добавки в силиконовые изделия медицинского назначения. *Фармация*. 2016;65:37–39.
30. Sandasi M., Kamatou G. P., Viljoen A. M. An untargeted metabolomic approach in the chemotaxonomic assessment of two Salvia species as a potential source of α-bisabolol. *Phytochem*. 2012;84:94–101. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.08.009.
31. De Lucca A. J., Pauli A., Schilcher H., Sien T., Bhatnagar D., Walsh T. J. Fungicidal and Bactericidal Properties of Bisabolol and Dragosantol. *Journal of Essential Oil Research*. 2011;23(3):47–54. DOI: 10.1080/10412905.2011.9700457.
32. Ma Y., Li W., Mai J., Wang J., Wei Y., Ledesma-Amaro R., Ji X.-J. Engineering Yarrowia lipolytica for sustainable production of the chamomile sesquiterpene (–)-α-bisabolol. *Green Chemistry*. 2021;23:780–787. DOI: 10.1039/D0GC03180A.
33. Stahl E. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag. 1969. 1041 p.
34. Holloway T., Rios A., Okoro C., van Dam R. M. SP-053 – Replacing high-performance liquid chromatography (HPLC) with high-resolution thin layer chromatography (TLC) for rapid radiopharmaceutical analysis. *Nuclear Medicine and Biology*. 2021;96–97:S63. DOI: 10.1016/S0969-8051(21)00370-X.
35. Xu L., Liu S. Forecasting structure of natural products through color formation process by thin layer chromatography. *Food Chemistry*. 2021;334:127496. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127496.
36. Makowska M., Pellinen T. Thin layer chromatography performed in stages to identify the presence of aromatic like fraction in chosen bitumen modifiers. *Journal of Traffic and Transportation Engineering (English Edition)*. 2021;8(3):453–466. DOI: 10.1016/j.jtte.2019.09.008.
37. Dlamini B., Rangarajan V., Clarke K. G. A simple thin layer chromatography based method for the quantitative analysis of biosurfactant surfactin vis-a-vis the presence of lipid and protein impurities in the processing liquid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;25:101587. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101587.

REFERENCES

1. Singh B., Bembalagi M., Nagmoti J. M., Patil R., Patil A. Comparison of effectiveness of silver zeolite as an antimicrobial agent in acrylic and silicone soft liners in complete denture patients: An in vivo study. *Indian Journal of Health Sciences and Biomedical Research*. 2018;11(2):170–174. DOI: 10.4103/kleuhsj.kleuhsj_243_17.
2. Azpiazu-Flores F. X., Leyva del Rio D., Schricker S. R., Johnston W. M., Lee D. J. Effect of three-dimensionally printed surface patterns on the peak tensile load of a plasticized acrylic-resin resilient liner. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2022. DOI: 10.1016/j.prosdent.2022.04.012.
3. Cagle J. C., Hafner B. J., Taflin N. B. S., Sanders J. E. Characterization of Prosthetic Liner Products for People with Transtibial Amputation. *JPO Journal of Prosthetics and Orthotics*. 2018;30(4):187–199. DOI: 10.1097/JPO.0000000000000205.
4. Yang X., Li Z., Jiang Z., Wang S., Liu H., Xu X., Wang D., Miao Y., Shang S., Song Z. Mechanical reinforcement of room-temperature-vulcanized silicone rubber using modified cellulose nanocrystals as cross-linker and nanofiller. *Carbohydrate Polymers*. 2020;229:115509. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115509.
5. Sanders J. E., Redd C. B., Larsen B. G., Vamos A. C., Brzostowski J. T., Hafner B. J., Allyn K. J., Henrikson K. M., McLean J. B., Hinrichs P. A. Novel Method for Assessing Prosthesis Use and Accommodation Practices of People with Transtibial Amputation. *JPO Journal of Prosthetics and Orthotics*. 2018;30(4):214–230. DOI: 10.1097/jpo.0000000000000209.

6. Zhu Y., Ke J., Zhang L. Anti-biofouling and Antimicrobial Biomaterials for Tissue Engineering. In: Li B., Moriarty Th. F., Webster Th., Xing M. eds. Racing for the Surface. Cham: Springer International Publishing. 2020. P. 333–354. DOI: 10.1007/978-3-030-34471-9.
7. Rai P., Jankiraman V., Teacher M., Velu R., Kumar S. A., Binedell T., Subburaj K. Design and optimization of a 3D printed prosthetic socket for transtibial amputees. *Materials Today: Proceedings*. 2022;70:454–464. DOI: 10.1016/j.matpr.2022.09.365.
8. Sathya S., Shanmuganathan B., Manirathinam G., Ruckmani K., Devi K. P. α-Bisabolol loaded solid lipid nanoparticles attenuates Aβ aggregation and protects Neuro-2a cells from Aβ induced neurotoxicity. *Journal of Molecular Liquids*. 2018;264:431–441. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.05.075.
9. Antoniac I., Sinescu C., Antoniac A. Adhesion aspects in biomaterials and medical devices. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2016;30(16):1711–1715. DOI: 10.1080/01694243.2016.1170959.
10. Chooi W. H., Yee S. COVID 19: The safety profile of common disinfectants used for sanitization. *Progress in Drug Discovery & Biomedical Science*. 2020;3(1):a0000112. DOI: 10.36877/pddbs.a0000112.
11. Francolini I., Vuotto C., Piozzi A., Donelli G. Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview. *APMIS*. 2017;125(4):392–417. DOI: 10.1111/apm.12675.
12. Erathodiyil N., Chan H.-M., Wu H., Ying J. Y. Zwitterionic polymers and hydrogels for antibiofouling applications in implantable devices. *Materials Today*. 2020;38:84–98. DOI: 10.1016/j.mattod.2020.03.024.
13. Chladek G., Barszczewska-Rybarek I., Lukaszczyk J. Developing the procedure of modifying the denture soft liner by silver nanoparticles. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2012;14(1):23–29.
14. Deng J., Ren L., Pan Y, Gao H., Meng X. Antifungal property of acrylic denture soft liner containing silver nanoparticles synthesized in situ. *Journal of Dentistry*. 2021;106:103589. DOI: 10.1016/j.jdent.2021.103589.
15. Guo R. J., Yin G. D., Sha X. J., Zhao Q., Wei L. Q., Wang H. F. The significant adhesion enhancement of Ag-polytetrafluoroethylene antibacterial coatings by using of molecular bridge. *Applied Surface Science*. 2015;341:13–18. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.02.131.
16. Zhu A., Wang Y. F.. Momentive Performance Materials Inc, assignee. Silicone rubber exhibiting effective antimicrobial activity. EP Patent EP2254421A1. 2010-12-01. Available at: https://patents.google.com/patent/EP2254421A1/en. Accessed: 29.09.2023.
17. Guo R., Wen J., Gao Y., Li T., Yan H., Wang H., Niu B., Jiang K. Effect of the adhesion of Ag coatings on the effectiveness and durability of antibacterial properties. *Journal of Materials Science*. 2018;53:4759–4767. DOI: 10.1007/s10853-017-1939-z.
18. Jordan R. P. C., Malic S., Waters M. G., Sticker D. J., Williams D. W. Development of an antimicrobial urinary catheter to inhibit urinary catheter encrustation. *Microbiology Discovery*. 2015;3(1):1–7. DOI: 10.7243/2052-6180-3-1.
19. Aoki S., Yamakawa K., Kubo K., Takeshita J. Antibacterial Properties of Silicone Membranes after a Simple Two-Step Immersion Process in Iodine and Silver Nitrate Solutions. *Biocontrol Science*. 2018;23(3):97–105. DOI: 10.4265/bio.23.97.
20. Aysa N. H., Al-Maamori M. H., Al-Maamori N. A. A. Effect of the Unmodified and Modified ZnO Nanoparticles on the Mechanical and Antibacterial Properties of Silicone Rubber Using in Medical Applications. *Journal of NanoScience, NanoEngineering & Applications*. 2015;1(3):119–124.
21. McBride M. C., Malcolm R. K., Woolfson A. D., Gorman S. P. Persistence of antimicrobial activity through sustained release of triclosan from pegylated silicone elastomers. *Biomaterials*. 2009;30(35):6739–6747. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.047.
22. Mustacich R. V., Lucas D. S., Stone R. L., inventors. Procter and Gamble Co, assignee. Antimicrobial polymer compositions. US Patent 4479795A. 30.10.1984.
23. Ketchum A. R., Kappler M. P., Wu J., Xi C., Meyerhoff M. E. The preparation and characterization of nitric oxide releasing silicone rubber materials impregnated with S-nitroso-tert-dodecyl mercaptan. *Journal of Materials Chemistry B*. 2016;4(3):422–430. DOI: 10.1039/C5TB01664A.
24. Karpunina T. I., Yakusheva D. E., Kisel'kov D. M., Velikanova M. S., Yakushev R. M. Surface modification of silicon rubber medical devices: problems and perspectives. *Bulletin "Health and Education Millennium"*. 2015;17(11):1–6. (In Russ.)
25. Usala A. L. Immunix Inc, assignee. Polymeric substrates containing povidone-iodine as a control release biologically active agent. Jp Patent CA2003169A1. 17.05.1990.
26. Shit S. C., Shah P. A. Review on Silicone Rubber. *National Academy Science Letters*. 2013;36(4):355–365. DOI: 10.1007/s40009-013-0150-2.
27. Schäfer M. Silikone in der technischen Orthopädie. *Medizinisch-Orthopädische Technik MOT*. 2008;32:7–16.
28. Vatolinskiy, L. E., Khmelevskaya, I. O., Shchetinina, L. G., Belevtsova L. O., Grishko E. K. Silicones in prosthetics and orthotics. *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics*. 2010;1:41–45. (In Russ.)
29. Udyanskaya I. L., Yankova V. G., Slonskaya T. K., Gribanova S. V., Plakhotnaya O. N., Krasnyuk I. I. (Jr.), Khloponina A. V., Rybina A. D. Biologically Active Substances as Additives in Silicone Medical Products. *Pharmacy*. 2016;65:37–39. (In Russ.)
30. Sandasi M., Kamatou G. P., Viljoen A. M. An untargeted metabolomic approach in the chemotaxonomic assessment of two Salvia species as a potential source of α-bisabolol. *Phytochem*. 2012;84:94–101. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.08.009.
31. De Lucca A. J., Pauli A., Schilcher H., Sien T., Bhatnagar D., Walsh T. J. Fungicidal and Bactericidal Properties of Bisabolol and Dragosantol. *Journal of Essential Oil Research*. 2011;23(3):47–54. DOI: 10.1080/10412905.2011.9700457.
32. Ma Y., Li W., Mai J., Wang J., Wei Y., Ledesma-Amaro R., Ji X.-J. Engineering Yarrowia lipolytica for sustainable production of the chamomile sesquiterpene (–)-α-bisabolol. *Green Chemistry*. 2021;23:780–787. DOI: 10.1039/D0GC03180A.
33. Stahl E. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag. 1969. 1041 p.
34. Holloway T., Rios A., Okoro C., van Dam R. M. SP-053 – Replacing high-performance liquid chromatography (HPLC) with high-resolution thin layer chromatography (TLC) for rapid radiopharmaceutical analysis. *Nuclear Medicine and Biology*. 2021;96–97:S63. DOI: 10.1016/S0969-8051(21)00370-X.
35. Xu L., Liu S. Forecasting structure of natural products through color formation process by thin layer chromatography. *Food Chemistry*. 2021;334:127496. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127496.
36. Makowska M., Pellinen T. Thin layer chromatography performed in stages to identify the presence of aromatic like fraction in chosen bitumen modifiers. *Journal of Traffic and Transportation Engineering (English Edition)*. 2021;8(3):453–466. DOI: 10.1016/j.jtte.2019.09.008.
37. Dlamini B., Rangarajan V., Clarke K. G. A simple thin layer chromatography based method for the quantitative analysis of biosurfactant surfactin vis-a-vis the presence of lipid and protein impurities in the processing liquid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;25:101587. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101587.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1630
УДК 615.326

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Ультразвуковая активация минеральных сорбентов

А. В. Бондарев[1]✉, Е. Т. Жилякова[1], Н. В. Автина[1], Н. Б. Демина[2], К. К. Размахнин[3]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), кафедра фармацевтической технологии. 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85
[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] Читинский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института горного дела им. Н. А. Чинакала Сибирского отделения Российской академии наук (ЧФ ИГД СО РАН). 672032, г. Чита, Александро-Заводская, д. 30

✉ **Контактное лицо:** Бондарев Александр Васильевич. **E-mail:** alexbond936@yandex.ru

ORCID: А. В. Бондарев – https://orcid.org/0000-0003-0077-7031; Е. Т. Жилякова – https://orcid.org/0000-0002-8685-1601;
Н. В. Автина – https://orcid.org/0000-0001-5506-515X; Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791;
К. К. Размахнин – https://orcid.org/0000-0003-2944-7642.

Статья поступила: 09.02.2023 **Статья принята в печать:** 17.01.2024 **Статья опубликована:** 19.01.2024

Резюме

Введение. Медицинские глины представлены полиминеральными сорбентами с преобладанием основополагающего глинистого минерала, от концентрации которого зависит качество минерального сырья и его адсорбционная активность. Одним из методов повышения качества минерального сырья является его активация при помощи ультразвуковой обработки.

Цель. Изучение влияния ультразвука на активацию и адсорбционную активность минеральных сорбентов.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали клиноптилолитовое минеральное сырье Холинского месторождения (Забайкальский край), монтмориллонитовое минеральное сырье Белгородского месторождения (Белгородская область) и каолинитовое минеральное сырье Еленинского месторождения (Челябинская область). Для ультразвуковой обработки использовали высокочастотную установку УЗДН-1. Определение адсорбционной активности проводили по метиленовому синему.

Результаты и обсуждение. Исследовано влияние ультразвука на активацию минеральных сорбентов при частоте ультразвуковой волны 40 кГц в течение пяти минут. Установлено, что среднее содержание клиноптилолита с учетом всех фракций в глине Холинского месторождения увеличивается на 20 %, среднее содержание монтмориллонита с учетом всех фракций в глине Белгородского месторождения увеличивается на 14 %, среднее содержание каолинита с учетом всех фракций в глине Еленинского месторождения увеличивается на 18 %. Исследовано влияние ультразвука на адсорбционную активность минеральных сорбентов. Использование ультразвуковой обработки повышает адсорбционную активность минеральных сорбентов на 12–19 %.

Заключение. Разработанную методику активации минеральных сорбентов посредством ультразвуковой обработки возможно применять для активации минеральных сорбентов путем повышения концентрации основополагающего минерала (клиноптилолита, монтмориллонита, каолинита), а также увеличения их адсорбционной активности.

Ключевые слова: лекарственное минеральное сырье, ультразвуковая обработка, сорбент, монтмориллонит, каолинит, клиноптилолит

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

Вклад авторов. А. В. Бондарев, Е. Т. Жилякова и Н. В. Автина придумали и разработали алгоритм эксперимента по ультразвуковой обработке минеральных сорбентов и участвовали в написании текста статьи. А. В. Бондарев и К. К. Размахнин проводили термохимический анализ образцов и исследование их сорбционных характеристик. А. В. Бондарев и Н. Б. Демина участвовали в обработке данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Читинскому филиалу Института горного дела им. Н. А. Чинакала СО РАН за помощь в проведении комплексного термического анализа глин.

Для цитирования: Бондарев А. В., Жилякова Е. Т., Автина Н. В., Демина Н. Б., Размахнин К. К. Ультразвуковая активация минеральных сорбентов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):45–51. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1630

Ultrasonic Activation of Mineral Sorbents

Alexander V. Bondarev[1]✉, Elena T. Zhilyakova[1], Natalya V. Avtina[1], Natalya B. Demina[2], Konstantin K. Razmakhnin[3]

[1] Belgorod National Research University, Department of Pharmaceutical Technology. 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, 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
[2] Chita Division of Chinakal Institute of Mining of the Siberian Branch of the RAS. 30, Aleksandro-Zavodskaya str., Chita, 672032, Russia

✉ **Corresponding author:** Alexander V. Bondarev. **E-mail:** alexbond936@yandex.ru

ORCID: Alexander V. Bondarev – https://orcid.org/0000-0003-0077-7031; Elena T. Zhilyakova – https://orcid.org/0000-0002-8685-1601;
Natalya V. Avtina – https://orcid.org/0000-0001-5506-515X; Natalya B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791;
Konstantin K. Razmakhnin – https://orcid.org/0000-0003-2944-7642.

Received: 09.02.2023 **Revised:** 17.01.2024 **Published:** 19.01.2024

© Бондарев А. В., Жилякова Е. Т., Автина Н. В., Демина Н. Б., Размахнин К. К., 2024
© Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Avtina N. V., Demina N. B., Razmakhnin K. K., 2024

Abstract
Introduction. Medical clays are polymineral sorbents with a predominance of the underlying clay mineral, the concentration of which determines the quality of mineral raw materials and its adsorption activity. One of the methods of improving the quality of mineral raw materials is its activation by means of ultrasonic treatment.
Aim. To study the effect of ultrasound on the activation and adsorption activity of mineral sorbents.
Materials and methods. Clinoptilolite mineral raw materials of the Kholinsky deposit, montmorillonite mineral raw materials of the Belgorod deposit and kaolinite mineral raw materials of the Eleninsky deposit were used as objects of research. A high-frequency UZDN-1 unit was used for ultrasonic treatment. Determination of adsorption activity was carried out by methylene blue.
Results and discussion. The effect of ultrasound on the activation of mineral sorbents at an ultrasonic wave frequency of 40 kHz for five minutes has been studied. It was found that the average content of Clinoptilolite, taking into account all fractions in the clay of the Kholinsky deposit, increases by 20 %, the average content of Montmorillonite, taking into account all fractions in the clay of the Belgorod deposit, increases by 14 %, the average content of Kaolinite, taking into account all fractions in the clay of the Eleninsky deposit, increases by 18 %. The effect of ultrasound on the adsorption activity of mineral sorbents has been investigated. The use of ultrasonic treatment increases the adsorption activity of mineral sorbents by 12–19 %.
Conclusion. The developed method of activation of mineral sorbents by ultrasonic treatment can be used to activate mineral sorbents by increasing the concentration of the underlying mineral (Clinoptilolite, Montmorillonite, Kaolinite), as well as increasing their adsorption activity.

Keywords: medicinal mineral raw materials, ultrasonic treatment, sorbent, montmorillonite, kaolinite, clinoptilolite

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

Contribution of the authors. Alexander V. Bondarev, Elena T. Zhilyakova and Natalya V. Avtina came up with and developed an algorithm for an experiment on ultrasonic treatment of mineral sorbents and participated in writing the text of the article. Alexander V. Bondarev and Konstantin K. Razmakhnin carried out a thermochemical analysis of samples and a study of their sorption characteristics. Alexander V. Bondarev and Natalya B. Demina participated in data processing. All the authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the Chita branch of the Institute of Mining. N. A. Chinakala SB RAS for assistance in the separation of complex therapeutic analysis of clays.

For citation: Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Avtina N. V., Demina N. B., Razmakhnin K. K. Ultrasonic activation of mineral sorbents. *Drug development & registration*. 2024;13(1):45–51. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1630

ВВЕДЕНИЕ

Медицинские глины являются полиминеральными сорбентами с преобладанием основополагающего глинистого минерала, от концентрации которого зависит качество минерального сырья и его адсорбционная активность. В настоящее время для повышения качества минерального сырья используют различные способы активации и модификации глин: химический (Е. В. Кормош, 2011; А. И. Везенцев, 2008), физический (Ж. А. Сапронова, 2015; М. Ж. Гомес, 2015), механический (Е. Т. Жилякова, 2012, П. О. Юрьев, 2014) [1–3]. Активация подразумевает механическое, электромагнитное или ультразвуковое воздействие на структуру глины без применения реагентов. Модификация направлена на введение в глину веществ, которые могут изменять ее кристаллическую структуру.

Ультразвуковая активация основана на кавитационном процессе, а также возникающих при нем звукокапиллярном и диспергирующем эффектах. Под кавитацией в глинистой суспензии понимают образование заполненных паром полостей при локальном понижении давления в жидкости до давления насыщенных паров. В фазе разрежения акустической волны образуется разрыв в виде полости, которая заполняется насыщенным паром данной жидкости. Возникает звукокапиллярный эффект. В фазе сжатия под действием повышенного давления и сил поверхностного натяжения полость захлопывается. Возникает диспергирующий эффект [4].

Соответствующая активация природного минерального сырья имеет первостепенное значение для получения медицинских глин. По сорбционным характеристикам минеральное сырье природного происхождения уступает другим сорбентам из-за наличия примесей, которые блокируют доступ адсорбата в пористое пространство. При наличии соответствующих доступных технологий активации минеральных сорбентов становится достижимым достаточно высокое качество, которое позволяет их использовать в медицинских и фармацевтических целях. В этой связи для получения высококачественного лекарственного минерального сырья, удовлетворяющего требованиям разрабатываемой нормативной документации, требуется проведение исследований по изучению методов активации с учетом его минералогических особенностей.

Цель работы – изучение влияния ультразвука на активацию и адсорбционную активность минеральных сорбентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали клиноптилолитовое минеральное сырье Холинского месторождения (Забайкальский край), монтморил-

лонитовое минеральное сырье Белгородского месторождения (Белгородская область) и каолинитовое минеральное сырье Еленинского месторождения (Челябинская область). Для исследований использовали следующие фракции минерального сырья: 1–2 мм, 0,5–1 мм, 0,3–0,5 мм, 0,1–0,3 мм, 0,074–0,1 мм, 0,05–0,074 мм. Измельчение и подготовку образцов проводили в мельнице лабораторной МЛ-1 (ООО «Лабтех», Россия).

Для ультразвуковой обработки использовали высокочастотную установку УЗДН-1, в которой в качестве преобразователей высокочастотного напряжения генератора в механические колебания ультразвуковой частоты использованы магнитострикционные преобразователи с частотой 40 кГц и временем воздействия пять минут. Выбор частоты ультразвука обусловлен наибольшей оптимальностью для активации глинистых суспензий и возможностью обеспечения максимального кавитационного воздействия при минимальных энергетических затратах [5]. Выбор продолжительности воздействия ультразвука обусловлен максимальным диспергирующим эффектом на основе фотоседиментационных свойств минеральных суспензий [6]. Установка позволяет работать в непрерывном режиме длительное время. Максимальная удельная акустическая мощность на конце трубчатого излучателя достигает 50–70 Вт · см$^{-2}$. Методика: навески сырья, расклассифицированного на классы крупности, массой по 20 г заливали водой очищенной (200 мл), нагревали на водяной бане до 40 °С в течение 1 часа для набухания минерального сырья. После чего суспензию подвергали воздействию ультразвука на генерирующей ультразвуковые волны установке УЗДН-1, продолжительность воздействия составляла 5 минут, частота ультразвука – 40 кГц. Далее проводилась декантация с последующим анализом осадка и слива на содержание мономинералов методом комплексного термического анализа с использованием дериватографа системы F. Paulik – J. Paulik – L. Erdey фирмы МОМ (Венгрия). Во всех исследованиях скорость нагрева составляла 10 °С/мин, чувствительность потенциометров дифференциально-термического анализа – 250 мА, дифференциальной термогравиметрии – 500 мА, навеска образца – 0,5–0,7 г, температура съемок – до 1000 °С. Концентрация (%) мономинералов округлялась до целых чисел. Комплексный термический анализ глин проведен на базе Читинского филиала Института горного дела им. Н. А. Чинакала СО РАН.

Определение адсорбционной активности проводили по метиленовому синему (ТУ 2463-044-0501520, ООО «Мосреактив», Россия). Методика: навеску сорбента массой 0,8 г помещали в 35 мл 0,15 % раствора метиленового синего в воде. Перемешивали на магнитной мешалке со скоростью 50 об/мин в течение 20 мин. Центрифугировали 15 мин со скоростью 3000 об/мин, затем 5 мл центрифугированного раствора помещали в мерную колбу объемом 50 мл, доводили водой до метки. Измеряли оптическую плотность при 667 нм. Адсорбционную активность определяли путем построения изотерм адсорбции методом переменных концентраций: в мерные колбы объемом 50 мл вносили по 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 мл 0,15 % раствора метиленового синего в воде, доводили водой до метки. Измеряли оптическую плотность при 667 нм. Количество адсорбционного метиленового синего рассчитывали по формуле (1):

$$A = C_0 - C/m, \quad (1)$$

где A – адсорбционная активность, мг/г; C_0 – концентрация красителя начальная, мг/мл; C – концентрация красителя после адсорбции, мг/мл; m – масса навески адсорбента, г.

С целью оценки точности и воспроизводимости метода определения адсорбционной активности проведено 6 параллельных измерений адсорбционной активности для каждого образца. Ошибка единичного определения во всех случаях не превышала 5,0 % при относительной погрешности $P = 95$ %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Теоретические основы ультразвукового воздействия описаны в отечественной и зарубежной научной литературе. В ряде работ авторы [7] изучали влияние воздействия ультразвуковых волн и микроволн на минеральные частицы монтмориллонита. В исследованиях [8] использовали ультразвук для изменения пористых характеристик вермикулита. В сорбционных лекарственных формах на основе медицинских глин основополагающий минерал оказывает основное терапевтическое действие – адсорбционное [9]. При ультразвуковой активации глины, помимо повышения концентрации основополагающего глинистого минерала, происходит изменение ее физико-химических свойств, в частности улучшение адсорбционных характеристик.

При воздействии высоких импульсов ультразвуковых волн глинистые минеральные частицы монтмориллонита и каолинита в водной среде измельчаются. В полученной суспензии увеличивается вязкость, устойчивость к осаждению частиц, число дефектов на внешней поверхности кристалла также повышается [10–12]. По данным [13–14], ультразвуковое воздействие приводит к разрушению агрегатов и достройке кристаллической структуры, что напрямую влияет на адсорбционные характеристики. Среда, в которой распространяется ультразвук, вступает во взаимодействие с проходящей через него энергией и часть ее поглощает, вызывая в передающем веществе необратимые структурные изменения [15–16]. В начальный момент времени работы ультразвуковой установки наблюдается разрушение минеральной структуры глины. Ультразвук разрушает тонкодисперсные монтмориллонитовые «ру-

башки» на поверхности клиноптилолита и примесей, что значительно изменяет адсорбционную емкость природного клиноптилолита, а также снижает контрастность минералов, входящих в состав минерального сырья, что существенным образом влияет на эффективность процессов переработки, обогащения и модификации минерального сырья [17–18]. Данные процессы можно объяснить диспергирующими и звукокапиллярными эффектами, возникающими за счет протекающих кавитационных процессов [19]. В процессе диспергирования частиц глины происходит изменение поверхностной энергии и увеличение удельной поверхности. При этом возросшие силы молекулярного действия начинают препятствовать дальнейшему разрушению кристаллов.

Ранее нами проведен фотоседиментационный анализ, наглядно демонстрирующий изменение размера минеральных частиц, применимый для оценки ультразвукового воздействия на минеральное сырье. Степень диспергирования частиц при ультразвуковой обработке определялась коэффициентом светопропускания через суспензию минерального сырья. Коэффициент светопропускания непосредственно связан с долей осевших минеральных частиц за определенный промежуток времени. Через две минуты ультразвуковой обработки начинается диспергация структурных элементов глины с максимальным эффектом при пятиминутном воздействии. Увеличение продолжительности ультразвуковой обработки на срок более пяти минут приводит к склеиванию частиц и появлению более крупных агрегатов. Возрастает коэффициент светопропускания, что связано в первую очередь с коагуляцией частиц при продолжении ультразвуковой обработки после проведения процесса диспергирования. При этом резко увеличивается скорость осаждения образовавшихся агрегатов, возрастает прозрачность суспензии и, как следствие, процесс декантации становится малоэффективным [6].

В эксперименте при изучении механизма воздействия ультразвука на минеральные сорбенты уделяли внимание выходу основополагающего минерала после обработки в зависимости от размера фракции (0,074–2 мм). Основополагающим минералом в минеральном сырье Холинского месторождения является клиноптилолит, в минеральном сырье Белгородского месторождения – монтмориллонит, в минеральном сырье Еленинского месторождения – каолинит. Влияние на минеральные сорбенты ультразвукового воздействия с частотой 40 кГц и временем воздействия пять минут представлено в таблице 1.

В глине Холинского месторождения основополагающим минералом является клиноптилолит. Фракции данной глины 0,3–0,5, 0,1–0,3 и 0,05–0,074 мм имеют наибольшую концентрацию клиноптилолита после ультразвуковой обработки (89–90 %). В глине Белгородского месторождения основополагающим минералом является монтмориллонит. Фракции данной глины 0,074–0,1 и 0,05–0,074 мм имеют наибольшую концентрацию монтмориллонита после ультразвуковой обработки (86–87 %). В глине Еленинского месторождения основополагающим минералом является каолинит. Фракции данной глины 0,1–0,3 и 0,074–0,1 мм имеют наибольшую концентрацию каолинита после ультразвуковой обработки (97–98 %).

Таблица 1. Влияние на минеральные сорбенты ультразвука с частотой 40 кГц и временем воздействия пять минут

Table 1. The effect of ultrasound on mineral sorbents with a frequency of 40 kHz and an exposure time of five minutes

Размер, мм Size, mm	**Фракция** Fraction	**Состав, %** Composition, %	
		До обработки Before processing	**После обработки** After processing
1	2	3	4
Холинское месторождение (минерал – клиноптилолит) Kholinskoye deposit (mineral – clinoptilolite)			
1–2	Минерал Mineral	65,0	80,0
	Примеси Impurities	35,0	20,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,5–1	Минерал Mineral	73,0	83,0
	Примеси Impurities	27,0	17,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,3–0,5	Минерал Mineral	67,0	89,0
	Примеси Impurities	33,0	11,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,1–0,3	Минерал Mineral	58,0	90,0
	Примеси Impurities	42,0	10,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,074–0,1	Минерал Mineral	68,0	83,0
	Примеси Impurities	32,0	17,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,05–0,074	Минерал Mineral	65,0	89,0
	Примеси Impurities	35,0	11,0
	Итого Total	100,0	100,0
Белгородское месторождение (минерал – монтмориллонит) Belgorod deposit (mineral – montmorillonite)			
1–2	Минерал Mineral	40,0	51,0
	Примеси Impurities	60,0	49,0
	Итого Total	100,0	100,0

Размер, мм Size, mm	**Фракция** Fraction	**Состав, %** Composition, %	
		До обработки Before processing	**После обработки** After processing
1	2	3	4
0,5–1	Минерал Mineral	43,0	52,0
	Примеси Impurities	57,0	48,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,3–0,5	Минерал Mineral	55,0	68,0
	Примеси Impurities	45,0	32,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,1–0,3	Минерал Mineral	59,0	75,0
	Примеси Impurities	41,0	25,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,074–0,1	Минерал Mineral	68,0	87,0
	Примеси Impurities	32,0	13,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,05–0,074	Минерал Mineral	69,0	86,0
	Примеси Impurities	31,0	14,0
	Итого Total	100,0	100,0
Елениинское месторождение (минерал – каолинит) Eleninskoye deposit (mineral – kaolinite)			
1–2	Минерал Mineral	52,0	59,0
	Примеси Impurities	48,0	41,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,5–1	Минерал Mineral	70,0	87,0
	Примеси Impurities	30,0	13,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,3–0,5	Минерал Mineral	72,0	94,0
	Примеси Impurities	28,0	6,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,1–0,3	Минерал Mineral	75,0	97,0
	Примеси Impurities	25,0	3,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,074–0,1	Минерал Mineral	76,0	98,0
	Примеси Impurities	24,0	2,0
	Итого Total	100,0	100,0
0,05–0,074	Минерал Mineral	75,0	94,0
	Примеси Impurities	25,0	6,0
	Итого Total	100,0	100,0

Представленные в таблице 1 данные показывают, что среднее содержание клиноптилолита с учетом всех фракций в глине Холинского месторождения увеличивается на 20 %, среднее содержание монтмориллонита с учетом всех фракций в глине Белгородского месторождения увеличивается на 14 %, среднее содержание каолинита с учетом всех фракций в глине Елениинского месторождения увеличивается на 18 %.

В минеральных сорбентах адсорбция протекает во внешнем слое и внутри кристаллической структуры, трехслойные слои которой связаны слабыми электростатическими взаимодействиями [20–21]. Адсорбция может проходить путем замещения катионов между слоями кристалла, посредством внешних гидроксильных групп, а также возникновения валентных связей по краям кристаллов. Указанные процессы происходят одновременно без преобладания какого-либо одного процесса [22]. Для определения адсорбционной активности минеральных сорбентов в качестве сорбтива использовали краситель метиленовый синий. Как ранее было отмечено, молекула метиленового синего относится к катионным красителям, которые обладают сродством к отрицательной поверхности глинистых частиц [23]. Для фракций с наибольшим содержанием основополагающего глинистого минерала были проведены исследования адсорбционной активности. Сравнительные данные адсорбционной активности минеральных сорбентов представлены в таблице 2.

Согласно данным, представленным в таблице 2, после ультразвуковой обработки глины Холинского месторождения фракции 0,1–0,3 мм ее адсорбционная активность составила (164 ± 0,3) мг/г, глины Белгородского месторождения фракции 0,074–0,1 мм – (72,2 ± 0,2) мг/г, глины Елениинского месторождения фракции 0,074–0,1 мм – (19,9 ± 0,3) мг/г. Низкая адсорбционная активность каолинита обусловлена строением его кристаллической решетки и отсутствием межслоевого пространства. Таким образом, установлено, что использование ультра-

звуковой обработки повышает адсорбционную активность минеральных сорбентов на 12–19 %. Показатель адсорбционной активности согласуется с научными данными (А. И. Везенцев, 2011; П. В. Соколовский, 2014) и является удовлетворительным для минеральных сорбентов.

Таблица 2. Сравнительные данные адсорбционной активности минеральных сорбентов

Table 2. Information on the comparison of the adsorption activity of mineral sorbents

Месторождение (минерал) Deposit (mineral)	Адсорбционная активность, мг/г Adsorption activity, mg/g	
	До обработки Before processing	После обработки After processing
Холинское (клиноптилолит), фракция 0,1–0,3 мм Kholinskoye (clinoptilolite), fraction 0.1–0.3 mm	147 ± 0,3	164 ± 0,3
Белгородское (монтмориллонит), фракция 0,074–0,3 мм Belgorod (montmorillonite), fraction 0.074–0.3 mm	61,7 ± 0,2	72,2 ± 0,2
Еленинское (каолинит), фракция 0,074–0,3 мм Eleninskoe (kaolinite), fraction 0.074–0.3 mm	16,8 ± 0,3	19,9 ± 0,3

Разработанную методику активации минеральных сорбентов посредством ультразвуковой обработки возможно применять для активации минеральных сорбентов путем повышения концентрации основополагающего минерала (клиноптилолита, монтмориллонита, каолинита), а также увеличения их адсорбционной активности. Используемый метод позволяет управлять технологическими свойствами минеральных сорбентов и рассматривать его дальнейшее применение при производстве сорбционных лекарственных форм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследовано влияние ультразвука на активацию минеральных сорбентов при частоте ультразвуковой волны 40 кГц в течение пяти минут. Установлено, что среднее содержание клиноптилолита с учетом всех фракций в глине Холинского месторождения увеличивается на 20 %, среднее содержание монтмориллонита с учетом всех фракций в глине Белгородского месторождения увеличивается на 14 %, среднее содержание каолинита с учетом всех фракций в глине Еленинского месторождения увеличивается на 18 %.
2. Исследовано влияние ультразвука на адсорбционную активность минеральных сорбентов. Использование ультразвуковой обработки повышает адсорбционную активность минеральных сорбентов на 12–19 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарев А. В., Жилякова Е. Т., Демина Н. Б., Тимошенко Е. Ю. Перспективы использования медицинских глин. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(4):27–31. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-27-31.
2. Везенцев А. И., Королькова С. В., Воловичева Н. А. Установление кинетических закономерностей сорбции ионов нативными и магний-замещенными формами монтмориллонитовых глин. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2010;10(1):115–120.
3. Сапронова Ж. А., Гомес М. Г, Свергузова С. В. Ультрафиолетовая активация природных глин Ангольских месторождений для повышения их сорбционной активности в процессах водоочистки. Белгород: Белгородский государственный технологический университет им. В. Г. Шухова; 2015. 159 с.
4. Чекмарев А. С., Скворцов А. В., Сулейманова А. З., Хацринов А. И., Байгузин Ф. А., Петухова Е. А. Ультразвуковая обработка глинистого сырья. *Вестник Казанского технологического университета*. 2010;8:277–283.
5. Хмелев В. Н., Сливин А. Н., Барсуков Р. В., Цыганок С. Н., Шалунов А. В. Применение ультразвука высокой интенсивности в промышленности. Бийск: Алтайский государственный технологический университет; 2010. 203 с.
6. Размахнин К. К., Хатькова Н. Н. Современные технологии переработки и модификации цеолитсодержащих пород Восточного Забайкалья. Чита: Забайкальский государственный университет; 2014. 309 с.
7. Jimenez de Haro M. C., Perez-Rodriguez J. L., Poyato J. Effect of ultrasound on preparation of porous materials from vermiculite. *Applied Clay Science*. 2005;30:11–20.
8. Дерябин М. С., Касьянов Д. А., Родченков В. И., Сергеев Д. А. Экспериментальное исследование акустических течений в сфокусированном ультразвуковом поле. *Прикладная механика и техническая физика*. 2010;51(5):52–58.
9. Жилякова Е. Т., Бондарев А. В. Обзор российских энтеросорбционных лекарственных средств. *Ремедиум*. 2014;10:40–47.
10. Родченков В. И., Сергеев Д. А. Исследование течений в жидкости, индуцированных сфокусированным ультразвуковым полем, и их применение для воздействия на рост монокристаллов. *Прикладная механика и техническая физика*. 2009;50(4):11–17.
11. Пятко Ю. Н., Ахметова Р. Т., Хацринов А. И., Фахрутдинова В. Х., Ахметова А. Ю., Губайдуллина А. М. Влияние ультразвуковой обработки на свойства трепела. *Фундаментальные исследования*. 2015;12(2):320–324.
12. Mache J. R., Signing P., Mbey J. A., Razafitianamaharavo A., Njopwouo D., Fagel N. Mineralogical and physico-chemical characteristics of Cameroonian smectitic clays after treatment with weakly sulfuric acid. *Clay Minerals*. 2015;50:649–661.
13. Önal G., Özer M., Arslan F. Sedimentation of Clay in Ultrasonic Medium. *Minerals Engineering*. 2003;16(2):129–134. DOI: 10.1016/S0892-6875(02)00309-6.
14. Камлач П. В., Будник А. В., Бондарик В. М. Моделирование прохождения ультразвука через структуры с различной акустической добротностью. *Доклады БГУИР*. 2008;3(33):27–33.
15. Guo H., Jing X., Zhang L., Wang J. Preparation of inorganic-organic pillared montmorillonite using ultrasonic treatment. *Journal of Materials Science*. 2007;42:6951–6955. DOI: 10.1007/S10853-006-1329-4.
16. Эпова Е. С., Еремин О. В., Русаль О. С., Филенко Р. А. Процессы активации сорбционных свойств цеолитовых пород Шивыртуйского месторождения (Восточное забайкалье). *Минералогия техногинеза*. 2015;16:148–154.
17. Размахнин К. К. Характеристика вещественного состава и технолого-минералогические характеристики цеолитсодержащих туфов Восточного Забайкалья. *Горный информационно-аналитический бюллетень*. 2007;12:315–328.
18. Абдикамалова А. Б., Хамраев С. С. Химико-минералогический анализ бентонитовых глин Крантауского месторождения и возможности повышения эффективности их применения как сырья для получения глинистых буровых растворов. *Узбекский химический журнал*. 2015;5:32–35.

19. Крупская В. В., Закусин С. В., Тюпина Е. А., Доржиева О. В., Чернов М. С., Бычкова Я. В. Преобразование структуры и адсорбционных свойств монтмориллонита при термохимическом воздействии. *Геохимия*. 2019;64(3):300–319. DOI: 10.31857/S0016-7525643300-319.
20. Zakusin S. V., Krupskaya V. V., Dorzhieva O. V., Zhukhlistov A. P., Tyupina E. A. Modification of adsorption properties of montmorillonite by the thermochemical treatment. *Sorption and chromatographic processes*. 2015;16(6):281–289.
21. Ngouana B. F., Kalinichev A. G. Structural arrangements of isomorphic substitutions in smectites: Molecular simulation of the swelling properties, interlayer structure, and dynamics of hydrated cs-montmorillonite revisited with new clay models. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2014;118:12758–12773.
22. Tyagi B., Chudasama C., Jasra R. Characterization of surface acidity of an acid montmorillonite activated with hydrothermal, ultrasonic and microwave techniques. *Applied Clay Science*. 2006;31:16–28.
23. Жилякова Е. Т., Новиков О. О., Бондарев А. В., Фролов Г. В. Определение технологических и адсорбционных показателей медицинских глин. *Научные ведомости Белгородского государственного университета*. 2013;18(161):229–234.

REFERENCES

1. Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Demina N. B., Timoshenko E. Yu. Prospects for the use of medical clays. *Drug development & registration*. 2019;8(4):27–31. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-27-31.
2. Vezentsev A. I., Korolkova S. V., Volovicheva N. A. Establishment of kinetic patterns of ion sorption by native and magnesium-substituted forms of montmorillonite clays. *Sorption and chromatographic processes*. 2010;10(1):115–120. (In Russ.)
3. Sapronova J. A., Gomez M. G., Sverguzova S. V. Ultraviolet activation of natural clays of Angolan deposits to increase their sorption activity in water treatment processes. Belgorod: Belgorod State Technological University named after V. G. Shukhov; 2015. 159 p. (In Russ.)
4. Chekmarev A. S., Skvortsov A. V., Suleymanova A. Z., Khatsrinov A. I., Bayguzin F. A., Petukhova E. A. Ultrasonic processing of clay raw materials. *Bulletin of Kazan Technological University*. 2010;8:277–283. (In Russ.)
5. Khmelev V. N., Slivin A. N., Barsukov R. V., Tsyganok S. N., Shalunov A. V. Application of high-intensity ultrasound in industry. Biysk: Altai State Technological University; 2010. 203 p. (In Russ.)
6. Razmakhnin K. K., Khatkova N. N. Modern technologies of processing and modification of zeolite-containing rocks of Eastern Transbaikalia. Chita: Zabaikalsky State University; 2014. 309 p. (In Russ.)
7. Jimenez de Haro M. C., Perez-Rodriguez J. L., Poyato J. Effect of ultrasound on preparation of porous materials from vermiculite. *Applied Clay Science*. 2005;30:11–20.
8. Deryabin M. S., Kasyanov D. A., Rodchenkov V. I., Sergeev D. A. Experimental study of acoustic flows in a focused ultrasonic field. *Applied mechanics and technical physics*. 2010;51(5):52–58. (In Russ.)
9. Zhilyakova E. T., Bondarev A. V. Review of Russian enterosorption drugs. *Remedium*. 2014;10:40–47. (In Russ.)
10. Rodchenkov V. I., Sergeev D. A. Investigation of flows in a liquid induced by a focused ultrasonic field and their application to influence the growth of single crystals. *Applied mechanics and technical physics*. 2009;50(4):11–17. (In Russ.)
11. Pyatkov Yu. N., Akhmetova R. T., Khatsrinov A. I., Fakhrutdinova V. Kh., Akhmetova A. Yu., Gubaidullina A. M. The effect of ultrasonic treatment on the properties of trepel. *Fundamental research*. 2015;12(2):320–324. (In Russ.)
12. Mache J. R., Signing P., Mbey J. A., Razafitianamaharavo A., Njopwouo D., Fagel N. Mineralogical and physico-chemical characteristics of Cameroonian smectitic clays after treatment with weakly sulfuric acid. *Clay Minerals*. 2015;50:649–661.
13. Önal G., Özer M., Arslan F. Sedimentation of Clay in Ultrasonic Medium. *Minerals Engineering*. 2003;16(2):129–134. DOI: 10.1016/S0892-6875(02)00309-6.
14. Kamlach P. V., Budnik A. V., Bondarik V. M. Modeling of ultrasound transmission through structures with different acoustic Q-factor. *Doklady BGUIR*. 2008;3(33):27–33. (In Russ.)
15. Guo H., Jing X., Zhang L., Wang J. Preparation of inorganic-organic pillared montmorillonite using ultrasonic treatment. *Journal of Materials Science*. 2007;42:6951–6955. DOI: 10.1007/S10853-006-1329-4.
16. Epova E. S., Eremin O. V., Rusal O. S., Filenko R. A. Processes of activation of sorption properties of zeolite rocks of the Shivyrtuyskoye field (Eastern Transbaikalia). *Mineralogy of technogenesis*. 2015;16:148–154. (In Russ.)
17. Razmakhnin K. K. Characteristics of the material composition and technological and mineralogical characteristics of zeolite-containing tuffs of Eastern Transbaikalia. *Mining information and Analytical Bulletin*. 2007;12:315–328. (In Russ.)
18. Abdikamalova A. B., Khamraev S. S. Chemical and mineralogical analysis of bentonite clays of the Karatau deposit and the possibility of increasing the efficiency of their use as raw materials for the production of clay drilling fluids. *Uzbek Chemical Journal*. 2015;5:32–35. (In Russ.)
19. Krupskaya V. V., Zakuskin S. V., Tyurina E. A., Dorzhieva O. V., Chernov M. S., Bychkova Ya. V. Transformation of the structure and adsorption properties of montmorillonite under thermochemical action. *Geochemistry*. 2019;64(3):300–319. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0016-7525643300-319.
20. Zakusin S. V., Krupskaya V. V., Dorzhieva O. V., Zhukhlistov A. P., Tyupina E. A. Modification of adsorption properties of montmorillonite by the thermochemical treatment. *Sorption and chromatographic processes*. 2015;16(6):281–289.
21. Ngouana B. F., Kalinichev A. G. Structural arrangements of isomorphic substitutions in smectites: Molecular simulation of the swelling properties, interlayer structure, and dynamics of hydrated cs-montmorillonite revisited with new clay models. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2014;118:12758–12773.
22. Tyagi B., Chudasama C., Jasra R. Characterization of surface acidity of an acid montmorillonite activated with hydrothermal, ultrasonic and microwave techniques. *Applied Clay Science*. 2006;31:16–28.
23. Zhilyakova E. T., Novikov O. O., Bondarev A. V., Frolov G. V. Determination of technological and adsorption parameters of medical clays. *Scientific Bulletin of Belgorod State University*. 2013;18(161):229–234. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1400
УДК 661.12

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Ретроспективный анализ производства и промышленного применения блок-сополимеров полиэтиленоксида и полипропиленоксида (обзор)

Е. О. Бахрушина✉, В. С. Пыжов, П. С. Сахарова, Н. Б. Демина, И. И. Краснюк

Институт фармации им. А. П. Нелюбина Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета). 119571, Россия, г. Москва, просп. Вернадского, д. 96, корп. 1

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

ORCID: Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; В. С. Пыжов – https://orcid.org/0000-0003-2174-7157; П. С. Сахарова – https://orcid.org/0000-0003-4870-6232; Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; И. И. Краснюк – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Статья поступила: 27.12.2022 **Статья принята в печать:** 19.01.2024 **Статья опубликована:** 19.01.2024

Резюме

Введение. На сегодняшний день блок-сополимеры ПЭО и ППО (полоксамеры, плюроники, проксанолы) являются одними из наиболее востребованных фармацевтической и биотехнологической промышленностью полимеров. Они находят свое применение в качестве эффективных неионогенных поверхностно-активных веществ, стабилизаторов биологических мембран, элементов систем направленной доставки, солюбилизаторов, а также в качестве вспомогательных веществ в технологии традиционных лекарственных форм – гелеобразователей, лубрикантов и т. д. На протяжении последних пятидесяти лет крупнейшим мировым производителем полоксамеров являлся немецкий химический концерн BASF. Однако на сегодняшний день в Российской Федерации существует риск дефектуры, что обозначает актуальность импортозамещения данного эксципиента.

Текст. Целью настоящего обзора являлось освещение опыта производства и внедрения блок-сополимеров ПЭО и ППО в новые разработки советскими и российскими учеными, сравнение их с опытом иностранных исследовательских групп, необходимое для оценки потенциала к импортозамещению. Блок-сополимеры ПЭО и ППО были известны в Советском Союзе с конца 1960-х годов – они упоминаются в учебных пособиях 1964 и 1973 годов. Отечественные блок-сополимеры ПЭО и ППО находили применение в нефтеперерабатывающей промышленности, в некоторых отраслях легкой промышленности, а также при дезактивации радиоактивных отходов. Собственный синтез блок-сополимеров ПЭО и ППО был налажен в 1978 году на базе завода «Оргсинтез». Советские полоксамеры выпускались под маркой «проксанол» в широком ассортименте соотношений звеньев ЭО и ПО и молекулярных масс. Необходимо отметить, что на сегодняшний день в Российской Федерации по-прежнему выпускают промышленные партии солюбилизатора эмуксол-268, являющегося близким по своим свойствам к известному полоксамеру 188, а также проводится синтез под заказ блок-сополимеров с другими соотношениями звеньев ЭО и ПО.

Заключение. Как показал ретроспективный анализ, у современной российской промышленности достаточно опыта и ресурсов для налаживания синтеза блок-сополимеров ПЭО и ППО, необходимых для производства лекарственных препаратов и разработки инновационных систем доставки лекарств. По материалам проведенного систематического обзора был впервые составлен наиболее полный реестр известных марок блок-сополимеров ПЭО и ППО, синтезированных за последние 50 лет в нашей стране и за рубежом, с подробной характеристикой их физико-химических свойств.

Ключевые слова: блок-сополимеры полиэтиленоксида и полипропиленоксида, полоксамеры, плюроники, проксанолы, эмуксол

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

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина придумала и разработала дизайн обзора. Е. О. Бахрушина, В. С. Пыжов и П. С. Сахарова проводили научный и патентный поиск. Е. О. Бахрушина и П. С. Сахарова участвовали в обработке данных. Е. О. Бахрушина и В. С. Пыжов участвовали в написании текста статьи. Н. Б. Демина и И. И. Краснюк участвовали в рецензировании и одобрении статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Пыжов В. С., Сахарова П. С., Демина Н. Б., Краснюк И. И. Ретроспективный анализ производства и промышленного применения блок-сополимеров полиэтиленоксида и полипропиленоксида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):52–68. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1400

Retrospective Analysis of Polyethylene Oxide and Polypropylene Oxide Block Copolymers Production and Industrial Applications (Review)

Elena O. Bakhrushina✉, Victor S. Pyzhov, Polina S. Sakharova, Natalia B. Demina, Ivan I. Krasnyuk

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

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

© Бахрушина Е. О., Пыжов В. С., Сахарова П. С., Демина Н. Б., Краснюк И. И., 2024
© Bakhrushina E. O., Pyzhov V. S., Sakharova P. S., Demina N. B., Krasnyuk I. I., 2024

ORCID: Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; Victor S. Pyzhov – https://orcid.org/0000-0003-2174-7157; Polina S. Sakharova – https://orcid.org/0000-0003-4870-6232; Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Ivan I. Krasnyuk – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Received: 27.12.2022 **Revised:** 19.01.2024 **Published:** 19.01.2024

Abstract

Introduction. Nowadays block copolymers of PEO and PPO (poloxamers, pluronics, proxanols) are among the most popular polymers in the pharmaceutical and biotechnological industries. They can be applied as effective nonionic surfactants, biological membrane stabilizers, elements of targeted delivery systems, solubilizers, as well as excipients in the technology of traditional dosage forms – gelling agents, lubricants, etc. For the past fifty years, the world's largest manufacturer of poloxamers has been the German chemical concern BASF. However, today in the Russian Federation there is a risk of defects, which defines the relevance of import substitution of this excipient.

Text. The purpose of this review is to highlight the experience of production and implementation of PEO and PPO block copolymers into novel Russian scientists' developments, comparing them with the experience of foreign research groups, which is necessary to assess the potential for import substitution. PEO and PPO block copolymers have been known in the Soviet Union since the late 60s as far as they are mentioned in textbooks of 1964 and 1973. Domestic block copolymers of PEO and PPO have been used in the oil refining industry, as well as in some branches of light industry and in the decontamination of radioactive waste. The unique domestic synthesis of PEO and PPO block copolymers was established in 1978 on the basis of the "Orgsintez" factory. Soviet poloxamers were produced under the brand name "proxanol" in a wide range of ratios of EO and PO units and molecular weights. It should be noted that today in the Russian Federation, industrial batches of the solubilizer Emuxol 268, which is close in its properties to the well-known poloxamer 188, are still produced, and block copolymers with other ratios of EO and PO units are synthesized to order.

Conclusion. According to the retrospective analysis, the modern Russian industry has enough experience and resources to establish the synthesis of PEO and PPO block copolymers necessary to produce drugs and to develop innovative delivery systems and drugs. Based on the materials of the systematic review, the most complete register of known brands of PEO and PPO block copolymers synthesized over the past 50 years in our country and in the world was compiled for the first time, with a detailed description of their physicochemical properties.

Keywords: poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) block copolymers, poloxamers, pluronics, proxanols, emuxols

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

Contribution of the authors. Elena O. Bakhrushina conceived and developed the design of the review. Elena O. Bakhrushina, Victor S. Pyzhov and Polina S. Sakharova conducted scientific and patent searches. Elena O. Bakhrushina and Polina S. Sakharova participated in data processing. Elena O. Bakhrushina and Victor S. Pyzhov participated in writing of the article. Natalia B. Demina and Ivan I. Krasnyuk participated in the review and approval of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bakhrushina E. O., Pyzhov V. S., Sakharova P. S., Demina N. B., Krasnyuk I. I. Retrospective analysis of polyethylene oxide and polypropylene oxide block copolymers production and industrial applications. *Drug development & registration*. 2024;13(1):52–68. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1400

ВВЕДЕНИЕ

Блок-сополимеры полиэтиленоксида и полипропиленоксида (блок-сополимеры ПЭО и ППО), также известные как полоксамеры и плюроники, уже более пятидесяти лет являются востребованными вспомогательными веществами для фармацевтической технологии, биотехнологии, разработки таргетных систем и применения в других отраслях легкой и тяжелой промышленности.

Опубликованный в 2020 году систематический обзор показал наличие в мировых базах медицинских научных публикаций более сорока пяти тысяч статей, посвященных синтезу, разработке систем направленной доставки и традиционных лекарственных форм на основе блок-сополимеров ПЭО и ППО [1]. При этом по оценке публикационной активности на базе PubMed с 2005 по 2019 год наблюдалось более чем двукратное увеличение уровня исследовательского интереса к заявленной теме, а с 2018 года уровень активности стабильно держится на отметке около 400 научных исследований в год (рисунок 1). M. Lazzari et al. отмечают, что большая часть публикаций по теме приходится на научные коллективы из США, в последние годы активное участие в разработке тематики принимают и ученые из Китая [1].

На использовании блок-сополимеров ПЭО и ППО основаны исследования по стабилизации биологических мембран, результаты которых внедряются в биотехнологические процессы; по созданию систем направленной доставки – нано- и микрочастиц, *in-situ*-систем, 3D-принтинга и многие другие, в том числе проводимые и в Российской Федерации [2–10].

По данным ГРЛС, на 2023 год на российском фармацевтическом рынке имеется 62 зарегистрированных лекарственных препарата в твердых, мягких и жидких лекарственных формах, 34 из которых производятся непосредственно на территории Российской Федерации. Таким образом, можно утверждать, что блок-сополимеры ПЭО и ППО являются значимыми эксципиентами для развития фармацевтической науки и производства лекарственных препаратов в России.

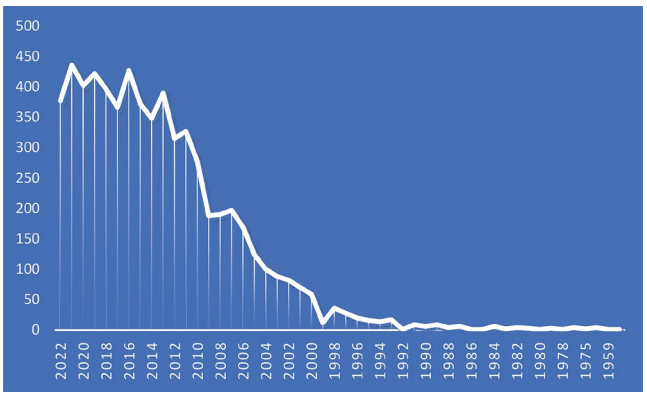


Рисунок 1. Изменение исследовательского интереса к теме блок-сополимеров ПЭО и ППО в период с 1957 по 2022 год по данным The National Center for Biotechnology Information (PubMed.gov) при проведении поиска по ключевым словам: «block-copolymers PEO PPO»; «poloxamer»; «pluronic»

Figure 1. Change in research interest in the topic of PEO and PPO block copolymers from 1957 to 2022 according to The National Center for Biotechnology Information (PubMed.gov) when searching for the keywords: "block-copolymers PEO PPO"; "poloxamer"; "pluronic"

Ввиду ухода с российского рынка немецкого химического концерна BASF – основного производителя блок-сополимеров ПЭО и ППО – для фармацевтики возникает высокий риск дефектуры вышеобозначенных полимеров. В настоящее время для группы полоксамеров остро стоит вопрос импортозамещения, связанный не только с возможностью продолжения промышленного выпуска лекарственных препаратов, содержащих в своем составе блок-сополимеры ПЭО и ППО, но и с разработкой оригинальных отечественных современных препаратов и систем направленной доставки, имеющих конкурентные преимущества перед иностранными аналогами.

Целью ретроспективного анализа настоящего обзора являлось освещение опыта производства и внедрения блок-сополимеров ПЭО и ППО в новые разработки советскими и российскими учеными, сравнение их с опытом иностранных исследовательских групп, необходимое для оценки потенциала к импортозамещению полоксамеров.

Ретроспектива мировых исследований блок-сополимеров ПЭО и ППО. Считается, что идея синтеза блок-сополимеров ПЭО и ППО для использования их в различных отраслях промышленности принадлежит Irwing R. Schmolka и компании BASF (Германия). Действительно, первый в мире патент на подобные полимеры, способ их синтеза был зарегистрирован в США в 1973 году (заявка на патент подана BASF в 1966) [11]. Первая общеизвестная работа по вопросам, связанным с блок-сополимерами ПЭО и ППО, была опубликована Irwing R. Schmolka et al. в 1965 году в журнале Journal of the American Oil Chemists Society [12]. В ней обсуждаются противоречивые литературные данные о свойстве мицеллообразования блок-сополимеров ПЭО и ППО. С помощью измерений дифференциальной абсорбции комплекса «краситель – поверхностно-активное вещество (ПАВ)» авторами проводилось исследование по определению критических концентраций мицеллообразования (ККМ) для этих полиолов. Было установлено, что значения ККМ для ПАВ с молекулярной массой от 1100 до более 15 000 варьировались от 3,0 до 11,1 мкмоль/л, что намного ниже, чем для других неионогенных ПАВ. Также было отмечено, что повышение температуры ниже точки помутнения или добавление хлорида натрия приводило к увеличению ККМ, что нехарактерно для многих неионогенных соединений и, по-видимому, являлось особенностью рассматриваемых блок-сополимеров.

В 1967 году была опубликована работа, демонстрирующая зависимость физико-химических параметров водных растворов блок-сополимеров ПЭО и ППО от их молекулярной массы и соотношения этиленоксидных и пропиленоксидных звеньев [13]. С помощью вискозиметра Брукфильда Irwing R. Schmolka и соавторы определили концентрацию гелеобразования, вязкости дисперсий и гелей, а также влияние температуры на эти параметры. Было установлено, что блок-сополимеры ПЭО и ППО с молекулярными массами гидрофобных блоков от 940 до 1100, в которых пропиленоксидные звенья составляли от 15 до 80 % от общей массы, не образуют гелей в водном растворе. Некоторые ПАВ с молекулярной массой гидрофобного блока от 1750 до 2750, к которым добавлялись различные количества полиоксиэтилена, образовывали водные гели в диапазоне концентраций блок-сополимера от 40 до 80 %. При молекулярной массе гидрофобного блока 3250 гели образовывались при концентрации ПАВ от 30 до 90 %, в то время как при использовании блок-сополимера с молекулярной массой гидрофобного блока 4000 гель образовывался при концентрации полиола 20 %.

Вместе с тем отдельные работы, связанные с использованием продукта под торговым наименованием Pluronic® F-68 (BASF, Германия), были известны еще с конца 1950-х годов [14–16]. Жидкий блок-сополимер ПЭО и ППО использовался для создания эмульсий для парентерального питания и продемонстрировал наилучшие эмульгирующие способности в сравнении с известными на тот момент аналогами и отсутствие токсического эффекта при внутривенном введении в выбранной концентрации [17].

Низкая токсичность плюроников была многократно подтверждена и в последующих исследованиях. В работе, опубликованной в 1968 году в Journal of the American Oil Chemists, Irwing R. Schmolka ссылался на исследования, доказывающие отсутствие местнораздражающего действия на слизистые и неповрежденные участки кожи, что, по словам автора, открывало «дальнейшие перспективы использования блок-сополимеров ПЭО и ППО в косметических средствах» [18]. В 1973 году в журнале The Journal of surgi-

cal research опубликовано исследование, описывающее перспективы применения плюроников и на открытых раневых поверхностях, также не выявившее острой или хронической токсичности [19].

Таким образом, уже к середине 1970-х годов в мире было собрано достаточно экспериментальных данных, свидетельствующих о возможности включения блок-сополимеров ПЭО и ППО в состав лекарственных препаратов, в том числе и для парентерального введения. Этот факт позволил включить плюроники в качестве перспективных эмульгаторов, разрешенных для парентерального применения, в программу создания искусственной крови, которая реализовывалась по всему миру. Программа была начата после публикаций L. Clark, R. P. Geyer, R. Naito и других еще в начале 70-х годов XX века [20]. Многочисленные исследования привели к идее использования перфторуглеродов (ПФУ) в качестве основного компонента кровозаменителя благодаря увеличению растворимости в них газов по мере уменьшения полярности ПФУ [21].

В работе I. R. Schmolka 1975 года [22] рассматривались преимущества использования Pluronic® F-68 (называемый автором полоксамером 188 после регистрации патентного удостоверения на полимер в 1973 году) в качестве эмульгатора для создания искусственной крови. Отмечалось, что полоксамер удовлетворяет как обязательным, так и желательным критериям эмульгаторов, а также позволяет упростить технологию получения препарата.

Одно из первых исследований, посвященных применению блок-сополимера ПЭО и ППО с соотношением блоков и молекулярной массой, отличной от уже широко известного Pluronic® F-68 , было опубликовано в 1972 году в журнале Journal of biomedical materials research [23]. ПАВ с молекулярной массой 12 500, названное Pluronic® F-127 (в настоящее время более известный как полоксамер 407), как и изучаемый ранее Pluronic® F-68, не обладало токсическими свойствами. Кроме того, Irwing R. Schmolka была отмечена не наблюдаемая ранее для других блок-сополимеров ПЭО и ППО способность Pluronic® F-127 к термозависимому гелеобразованию. В статье описано приготовление холодных водных растворов Pluronic® F-127, в которые затем вводили различные АФИ. При повышении температуры наблюдался фазовый переход с образованием гелей с высоким пределом текучести и высокой вязкостью, подходящих, по мнению автора, для нанесения на ожоговую рану или поврежденный участок кожи.

Конец 70-х и начало 80-х годов XX века в ретроспективе мировых исследований по вопросам применения блок-сополимеров ПЭО и ППО были связаны с первыми попытками создания комплексов плюроников (чаще Pluronic® F-68) с различными АФИ, потенциально призванных увеличить их биодоступность и повысить эффективность [24–26]. В работе R. L. Anderson et al. (1984) сообщалось об использовании комбинации полоксамера и йода (*poloxamer-iodine*) для поддержания микробиологической чистоты в системе трубопроводов на производстве. В ходе исследования не было показано достоверных отличий в эффективности от известного ранее йод-повидона, к тому моменту на протяжении уже десятилетия успешно использовавшегося в медицине и промышленности [27].

Однако несмотря на неудачную попытку разработки антисептика на основе полоксамер-йода, изучение влияния блок-сополимеров ПЭО и ППО на микробиомы активно продолжалось до начала 2000-х годов.

В работе J. L. Krahenbuhl et al. (1993) исследовалось влияние блок-сополимеров ПЭО и ППО с различными соотношениями звеньев ЭО и ПО на *Toxoplasma gondii*, вызывавшую латентную инфекцию, проявляющуюся токсоплазматическим энцефалитом у пациентов со СПИДом [28]. Эффект заметно менялся в зависимости от длины составляющих цепей сополимеров. В целом была отмечена перспективность использования полоксамеров в составе терапии. Исследование потенциала применения блок-сополимеров ПЭО и ППО в лечении токсоплазмоза было продолжено группой ученых под руководством F. G. Araujo в 1995 году [29]. Показано, что монотерапия блок-сополимерами ПЭО и ППО не приводила к выживанию зараженных мышей, а только отсрочивала их гибель. Однако значительная выживаемость была достигнута, когда мышей лечили любым из блок-сополимеров в сочетании с дозами сульфадиазина, пириметамина, клиндамицина или атоваквона, которые не предотвращали смертность при использовании отдельно. Так, лечение полоксамером CRL 8131 в сочетании с сульфадиазином или пириметамином привело к выживанию 50 или 40 % соответственно, сочетание полоксамера с клиндамицином, который защищал лишь 40 % мышей при традиционном использовании, приводило к 100 % выживанию. Лечение токсоплазматического энцефалита с помощью полоксамера CRL 8131 в сочетании с неэффективной дозой атоваквона уменьшало воспаление и количество кист *Toxoplasma gondii* в головном мозге. Авторами статьи было выдвинуто предположение о том, что введение только полоксамера CRL 8131, по-видимому, вызывало снижение продукции гамма-интерферона и повышение продукции интерлейкина-2.

Некоторое количество исследований в середине 90-х годов XX века было посвящено и оценке влияния блок-сополимеров ЭО и ПО на *Mycobacterium tuberculosis* [30, 31]. В работе R. L. Hunter et al. предлагалось использовать полоксамеры для увеличения проницаемости гликолипидного слоя бактериальных клеток для антибактериальных агентов. Блок-сополимеры ЭО и ПО с высокой или низкой молекулярной массой, а также большой долей гидрофильных блоков не оказывали значительного влияния на клеточную стенку бактерий. Однако некоторые гид-

рофобные полоксамеры, особенно P331, замедляли рост большинства изолятов и оказывали синергетическое действие с рифампином. Минимальная концентрация рифампина, необходимая для ингибирования роста *Mycobacterium tuberculosis*, была снижена в среднем с 14,6 мкг/мл до 1,4 мкг/мл на 1,0 мг полоксамера P331 на мл. Повышение чувствительности к антибиотикам наблюдалось даже при таких низких концентрациях полоксамера, как 10 мкг/мл [30]. Исследование C. Jagannath 1999 года продолжало предыдущие эксперименты по оценке влияния полоксамеров на *Mycobacterium tuberculosis* [31]. Было показано, что полоксамер 315 (CRL-1072) на модели острой инфекции (мыши) значительно усиливал бактерицидную активность кларитромицина и рифампина при его введении в дозе 1,0 мг/кг внутривенно (в/в) три раза в неделю. Полоксамер CRL-1072, введенный внутривенно или перорально, также усиливал бактерицидную активность клиндамицина в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. На сегодняшний день, несмотря на успешные эксперименты на адекватных моделях, механизмы действия полоксамера CRL-1072 все еще недостаточно изучены. Было выдвинуто предположение, что полоксамер индуцирует выработку оксида азота в культивируемых макрофагах человека, ведущих к улучшению клиренса [32]. Кроме того, CRL-1072 индуцирует продукцию IL-8 в макрофагах, хемотаксического фактора, привлекающего нейтрофилы и Т-клетки к очагу инфекции [33]. Важным обстоятельством является и то, что в качестве ПАВ полоксамер CRL-1072 необходимо доставлять местно, в легкие посредством ингаляции [34].

Синергетический эффект в сочетании с антибиотиками был показан и для блок-сополимера ПЭО и ППО с молекулярной массой 8000 и соотношением звеньев ЭО : ПО (80 : 27) – полоксамера 188 (Pluronic® F-68). Солюбилизированный плюроником амфотерицин Б на резистентной к нему линии *Leishmania donovani* демонстрировал стократное уменьшение полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) [35].

В 2000 году в журнале Antimicrob Agents Chemother была опубликована работа, в которой изучали антиадгезивное действие полоксамера 407 по отношению к остаточным прикрепленным стафилококкам на полиметилметакрилате. Бактериальная адгезия заметно подавлялась (от 77 до 99,9 %) независимо от того, подвергался полиметилметакрилат воздействию блок-сополимера ПЭО и ППО до или во время анализа адгезии. Кроме того, остаточные прикрепленные стафилококки оказались более чувствительными к действию антибиотиков, что позволило предположить, что комбинация полоксамера 407 с антибиотиками может быть многообещающим подходом к предотвращению инфицирования подобного материала [36].

Новые аспекты применения блок-сополимеров ПЭО и ППО стали активно изучаться в конце 90-х годов XX века. В 1996 году в работе V. Sharma et al. исследовано влияние полоксамера 188 на электропорацию искусственных липидных мембран из азолектина [37]. Посредством измерения импульса заряда и фиксации напряжения было определено, что обработанные полоксамером 188 мембраны демонстрируют статистически более высокое пороговое напряжение и более длительное время ожидания по сравнению с контролем. Кроме того, было обнаружено, что мембраны, обработанные полоксамером 188, имеют относительно более низкую проводимость, большее время, необходимое порированной мембране для достижения определенного значения проводимости, и большую постоянную времени после электропорации. Было отмечено также, что добавление полоксамера 188 снижает емкость мембраны примерно на 4–8 % за 5 мин. По мнению авторов статьи, эти данные свидетельствуют о том, что полоксамер 188 адсорбируется в бислоях липидов, тем самым снижая их восприимчивость к электропорации.

Исследование R. Evers et al. посвящено влиянию различных агентов, включая Pluronic® L61, на P-гликопротеин MDR1, переносчик многих АФИ, и белки множественной лекарственной устойчивости MRP1 и MRP2 [38]. Блок-сополимер ЭО и ПО предлагалось использовать для преодоления резистентности опухолевых клеток в ответ на химиотерапию. Эксперименты с даунорубицином на клеточных линиях показали, что Pluronic® L61 эффективно ингибирует MDR1 Pgp и, кроме того, стимулирует выделение органического аниона кальцеина клетками MDCKII-MRP1 и MDCKII-MRP2.

Ретроспектива отечественных исследований, посвященных блок-сополимерам ПЭО и ППО. В СССР блок-сополимеры ПЭО и ППО были известны еще в 60-х годах XX века [39]. В первом издании (1964) монографии Ф. В. Неволина «Химия и технология синтетических моющих средств» указано, что неионогенные ПАВ, представляющие собой блок-сополимеры ПЭО и ППО, известны под общим названием «плюроники», а в СССР носят название «проксанолы» [40].

Действительно, независимо от исследований, проводимых компанией BASF и Irwing R. Schmolka, в СССР синтезировали блок-сополимеры ПЭО и ППО, которые находили применение прежде всего в нефтеперерабатывающей, текстильной промышленности, а также в качестве высокоэффективных моющих средств.

Проксанолы были разработаны в Научно-исследовательском институте полупродуктов и красителей (НИОПиК) – одном из старейших научных учреждений России, созданном в 1931 году на базе лаборатории акционерного общества «Русско-краска», основанного еще в 1915 году [41].

В «Руководстве по технологии получения и переработки растительных масел и жиров» (1973) отмечается, что «…относительная молекулярная масса блок-сополимеров составляет 1000–2500, а количество присоединенных звеньев этиленоксида изменяется в диапазоне от 10 до 80 %. В зависимости от молекулярной массы и содержания этиленоксида, полиолы могут обладать различными свойствами и консистенцией – жидкой, пастообразной и твердой…» [41].

Еще в конце 60-х – начале 70-х годов XX века в журнале «Гигиена и санитария» был опубликован ряд статей, посвященных вопросам дезактивации и очистки от радиоактивных изотопов и продуктов распада, а также количественного определения и идентификации ПАВ в сточных водах [42–45]. В исследовании А. М. Воробьева и соавт. (1967) использовали проксанол-228 в составе моющей композиции на основе карбоксиметилцеллюлозы, глины, пемзы и гексаметафосфата натрия для дезактивации кожи от соединений плутония и продуктов его распада. Используемый блок-сополимер ПЭО и ППО по своей дезактивирующей способности значительно превосходил алкилсульфаты, ОП-7 (продукт обработки смеси моно- и диалкилфенолов окисью этилена), динатривую соль моноэфира сульфоянтарной кислоты, незначительно уступая лишь алкиларилсульфонату и нафтеноксу [46].

В работе Т. Н. Черкашиной и соавт. (1970) проксанол-224 использовался для наиболее проблемной дезактивации радиоактивных изотопов свинца-212, тория-228 и радия-224 на пористых поверхностях – линолеуме и метлахской плитке. Используемый для очистки 0,5%-й раствор проксанола-224 уменьшал остаточную активность изотопов за 15 минут после обработки с 411 имп/мин до 115 имп/мин, а за 24 часа – до 86 имп/мин, в то время как другие высокоэффективные ПАВ не подходили для дезактивации подобных поверхностей [43].

В то же время блок-сополимеры ПЭО и ППО находили применение в нефтеперерабатывающем комплексе Советского Союза в качестве деэмульгаторов – ПАВ, разрушающих нефтяные эмульсии, образованные из нефтефазы и воды, посредством эмульгирования природными соединениями, находящимися в естественном состоянии в нефтяных фракциях [46].

С 1974 года разработанные во Всероссийском научно-исследовательском институте по переработке нефти (ВНИИНП) и готовые к внедрению отечественные реагенты-деэмульгаторы проксанол-186, проксанол-305 активно применяются в нефтепереработке. Однако эти блок-сополимеры представляли собой пастообразные вещества с температурой плавления от 31 до 37 °С, что создавало трудности при использовании их на нефтепереработке в зимнее время [47].

Проксанолы применялись и в других отраслях промышленности СССР. Так, к примеру, предлагалось использовать проксанолы для обработки бумаги в качестве «активаторов» ее прочности, для большего сопротивления излому [48]. Имелся опыт применения блок-сополимеров ПЭО и ППО (проксанол-181, проксанол-305, проксанол-186) и в качестве антистатического агента для обработки нитей из химических волокон [49].

Таким образом, исходя из потребности советской промышленности, в 1978 году на базе производственного объединения «Оргсинтез» (Казань) налажено производство проксанолов. Блок-сополимеры ПЭО и ППО отечественного производства представляли собой раствор активной основы в водно-метанольной смеси (например, проксамин-385-65, проксамин-385-50, проксанол-305-65) [50].

Помимо имевшихся на тот момент блок-сополимеров ПЭО и ППО, было начато производство проксанола-268, являвшегося близким полимером к широко известному на западе Pluronic® F-68 (полоксамер 188). В дальнейшем во многом именно наличие отечественного блок-сополимера ПЭО и ППО проксанол-268 позволило советским ученым включиться в программу создания искусственной крови и достигнуть значительных успехов [51]. В многочисленных исследованиях различных научных коллективов было показано, что при определенной молекулярной массе и соотношении этиленоксида к пропиленоксиду 80 : 20 проксанолы обладают хорошей растворимостью в воде, низкой токсичностью, а также предотвращают агрегацию тромбоцитов, улучшают реологические свойства крови и могут оказывать гемодинамическое действие благодаря своим коллоидно-осмотическим свойствам. Проксанол-268 также может улучшать микроциркуляцию крови, влиять на электромеханическое сопряжение миокарда, а также взаимодействовать с гидрофобными участками мембранных белков [51].

Необходимо отметить, что, несмотря на общую схожесть Pluronic® F-68 и проксанола-268 (некоторые авторы выделяют их как взаимозаменяемые аналоги), полиолы имеют важные различия по некоторым параметрам. В 2009 году под руководством академика С. И. Воробьева проводилось обширное исследование влияния физико-химических свойств блок-сополимеров ПЭО и ППО на биологические функции перфторуглеродных сред [52]. Изучались как отечественные полиолы проксанол-168 № 24, проксанол-168 № 38, проксанол-268 № 35, проксанол-268 № 1, характеризующиеся различной гидрофильностью и молекулярной массой, так и плюроник F68.

Наименее токсичным был признан блок-сополимер ПЭО и ППО с наименьшей абсолютной величиной гидрофобного блока (19 %) проксанол-168 № 38, а для проксанола-268 было установлено наиболее выраженное из исследуемого пула антигемолитическое действие на эритроциты крови. По мнению автора, это позволяет использовать его при экстракорпоральном кровообращении во время операций на открытом сердце в качестве АФИ.

Таким образом, различия между отечественным полимером проксанол-268 и иностранным полоксамером 188 (Pluronic® F-68) были показаны еще в исследовании 2009 года. При этом с точки зрения применения в составе перфторуглеродных кровезаменителей парентерально отечественный проксанол имеет преимущества. Однако необходимо помнить, что проксанол-268 и полоксамер 188 не являются полностью взаимозаменяемыми. Этому вопросу посвящено одно из последних отечественных исследований Е. В. Аршинцевой и соавт. (2022) [53]. Блок-сополимеры ПЭО и ППО эмуксол-268 (проксанол-268; НИОПиК) и Kolliphor® P 188 (полоксамер 188; BASF) анализировались по физико-химическим параметрам, а также при сравнении острой токсичности. Отличающиеся физико-химические свойства полимеров приведены в таблице 1.

При сравнительном изучении доклинической острой токсичности авторами не было установлено значимых различий между полимерами.

В связи с активным применением в составе лекарственных средств перед российскими учеными остро встал вопрос очистки проксанолов. С начала 90-х годов XX века появляются научные публикации, посвященные разработке различных эффективных методик очистки блок-сополимеров ПЭО и ППО. В 2000 году Е. И. Маевским и соавт. запатентован способ очистки проксанолов, заключающийся в насыщении раствора проксанола углекислым газом перед фильтрацией для снижения pH раствора. Фильтрацию предлагается осуществлять через мембранный фильтр в атмосфере углекислого газа, затем раствор блок-сополимера ПЭО и ППО автоклавируют в укупоренных флаконах и выдерживают при температуре 65–75 °С в течение 12–16 ч после предварительного охлаждения. Данный способ позволяет сократить наличие перекисных соединений в растворе ПАВ до физиологически приемлемого уровня и обеспечить его апирогонность [54].

В работе [54] также было проведено изучение влияния способа и степени очистки блок-сополимеров на биологические функции в составе перфторуглеродных сред. Показано, что интенсивная очистка проксанолов и плюроников с помощью активированного угля снижает токсичность блок-сополимеров с высоким содержанием гидрофобного блока.

В 90-х годах XX века сначала в СССР, а затем и в Российской Федерации тема проксанолов все больше связана с медициной, следуя в направлении мировых тенденций и новых открытий многообещающих свойств полимеров.

В 1990 году в журнале «Высокомолекулярные соединения. Серия Б» впервые публикуется исследование, подтверждающее наличие термочувствительных (термореверсивных) свойств у отечественного блок-сополимера ПЭО и ППО – проксанола-Б127 [55]. Ранее в статье 1972 года Irwing R. Schmolka отмечал способность к чувствительному к температуре гелеобразованию для полоксамера 407 (Pluronic® F-127) [23]. Однако, как следует из опубликованных данных, эти полиолы не имеют схожих характеристик – крайне различные молекулярные массы (F127 – 12700; Б127 – 2900) и процентное содержание пропиленоксидного блока (F127 – 27; Б127 – 35) делают эти открытия отдельно значимыми.

В работе И. Н. Топчиевой отмечается, что повышение температуры раствора проксанола Б 127 до 30 °С приводит к смещению равновесия в сторону распада водородных связей и частичному разрушению крупных агломератов. Дальнейшее увеличение температуры ведет, по мнению авторов, к дегидратации цепи, и в первую очередь пропиленоксидного блока. В результате этого реализуются гидрофобные свойства блок-сополимера, что приводит к обра-

Таблица 1. Различные показатели коммерчески доступных блок-сополимеров ЭО и ПО [53]

Table 1. Various characteristics of commercially available EO and PO block copolymers [53]

Отличающийся показатель **Varying factor**	**Эмуксол-268** **Emuxol 268**	**Kolliphor® P 188**
ММ ППО блока расчетное, Да MM of PPO block calculated, Da	2600	1800
ММ расчетное, Да MM calculated, Da	13 000	9000
Средняя ММ по паспорту, Да Average molar mass by regulatory documentation, Da	10 000 ± 3000	8595 ± 915
Внешний вид Appearance	Воскообразное или чешуйчатое вещество, от белого до кремового цвета White to creamy waxy or scaly substance	Крупнозернистый порошок, от белого до слегка желтоватого цвета, восковой консистенции Coarse-grained powder from white to slightly yellowish color of a waxy consistency
Цветность водного раствора по платино-кобальтовой шкале, не более Color of aqueous solution according to platinum-cobalt scale, not more than	125	100
pH	Не более 8,5 (5%-й раствор) Not more than (5 % solution)	6,0–7,5 (10%-й водный раствор) 6,0–7,5 10 % aqueous solution

зованию мицелл. Этот процесс сопровождается конформационными изменениями в пропиленоксидной цепи и выталкиванием воды из гидрофобного блока. Характер этого процесса напоминает фазовый переход и приводит к образованию структур с плотным гидрофобным ядром и гидрофильной «опушкой» из этиленоксидных блоков. В температурном диапазоне 35–50 °С наблюдается рост мицелл, сопровождаемый сильным увеличением плотности частиц. Авторами был предсказан также и обратный гель-золь-переход при температуре около 50 °С, когда плотность гидрофобного ядра мицеллы достигнет плотности чистого аморфного пропиленоксида [55].

Дальнейшие изыскания российских ученых в этой области на протяжении более чем десяти лет были посвящены разработке и исследованию потенциала применения комплексов проксанолов с циклодекстринами для создания систем направленной доставки [56–65].

Начало этому направлению исследований было положено в 1993 году, когда была опубликована первая работа ученых из МГУ «Комплексообразование β-циклодекстринов с блок-сополимерами окиси этилена и пропилена». При взаимодействии β-циклодекстринов и различных по физико-химическим параметрам проксанолов были получены новые кристаллические комплексы с температурами плавления от 126 до 136 °С. Было отмечено, что по мере увеличения содержания пропиленоксидного блока в проксанолах, использующихся для создания комплексов, температура плавления композита уменьшалась [57]. Дальнейшее изучение полученных комплексов методом ПМР [58] показало, что в комплексобразовании с проксанолами задействованы гидроксильные группы циклодекстрина. В последующих совместных работах со специалистами РХТУ им. Д. И. Менделеева и Института элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН [59–60] на основании данных рентгеноструктурного анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии, импульсного ^{1}H-ЯМР- и ИК-спектроскопии была предложена модель кристаллических комплексов, в соответствии с которой молекулы β-циклодекстрина нанизаны на полипропиленоксидный блок проксанола в соотношении 1 : 2.

В дальнейших работах в соавторстве с И. Г. Пановой были изучены комплексы проксанолов и с другими циклодекстринами. Показано, что в зависимости от условий эксперимента при взаимодействии α-, β-циклодекстринов с проксанолами образуются либо симметричные сополимеры с молекулярными «ожерельями» в качестве концевых блоков, либо несимметричные сополимеры, содержащие три различных блока. Использование γ-циклодекстрина позволяет получить новые двухцепочечные инклюзионные комплексы. Дополнительные исследования соединений α-циклодекстрина с полиэтиленоксидом выявили формирование гелей в данной системе [61]. Дальнейшие работы в этой области проводились с применением полиэтиленоксида и полипропиленоксида в качестве лигандов, изучение потенциала применения которых проводилось до конца 2010-х годов.

В 2003 году в журнале «BMC. Серия А» была опубликована работа, продолжающая исследования комплексов циклодекстринов [60]. Был описан двустадийный метод синтеза молекулярных трубок на основе β-циклодекстрина и проксанола-305. Изучение комплексообразующих свойств нанотрубок в присутствии двух лигандов позволило выяснить специфику полученных структур. В отличие от исходных циклодекстринов комплексообразование с участием нанотрубок происходило необратимо благодаря более прочным связям с лигандами.

Вторым вектором развития медицинского применения блок-сополимеров ПЭО и ППО в России на рубеже XX–XXI вв. стало создание комплексов блок-сополимеров с различными АФИ. Необходимо отметить, что эти исследования проводились параллельно с общемировыми работами в этой области на аналогичных полимерах, чаще иностранного производства. С появлением доступных коммерческих образцов эксципиентов американских и европейских химических концернов частота применения отечественных проксанолов стала постепенно снижаться: несмотря на некоторые их преимущества перед иностранными аналогами, переход на плюроники (полоксамеры) был вынужденной мерой для гармонизации научных знаний.

В 1996 году исследовательским коллективом МГУ совместно с Университетом Небраски (США) было опубликовано сразу несколько работ, посвященных вопросам применения плюроников в химиотерапии. Так, в статье В. Ю. Алахова и соавт. описано хемосенсибилизирующее действие плюроника на раковые клетки с множественной лекарственной устойчивостью [66, 67]. В исследовании Е. В. Батраковой и соавт. [67] представлены исследования по оценке эффективности Pluronic® L61, P85 и F108 *in vivo* при лечении рака. В качестве модельных действующих веществ были выбраны эпирубицин и доксорубицин, которые были солюбилизированы в мицеллах плюроников. Исследование показало, что продолжительность жизни животных и ингибирование роста опухоли были значительно увеличены у мышей, получавших композиции на основе плюроников, по сравнению с животными, получавшими монопрепараты. Авторы отмечали, что противоопухолевая активность композиций АФИ с плюроником зависит от концентрации плюроника и его гидрофобности, определяемой соотношением длин гидрофильных сегментов этиленоксида и гидрофобных сегментов пропиленоксида. Более высокая активность присуща более гидрофобным сополимерам. Эффективные дозы этих композиций вызывали ингибирование роста опухоли, а также полное исчезновение опухоли у 33–50 % животных.

Работа в этом направлении была продолжена, и в 1999 году опубликована статья, посвященная синтезу конъюгатов плюроника P85 с доксирубицином [68]. Авторами рассматривались две методики получения комплексов: посредством ацилирования аминогруппы антибиотика N-гидроксисукцинимидным эфиром гемисукцината плюроника P85; а также алкилированием аминогруппы доксирубицина бромацетильной группой, присоединенной к плюронику P85. Цитотоксичность полученных конъюгатов исследовали на культурах клеток человеческой карциномы яичника. Оказалось, что конъюгат, полученный путем ацилирования, значительно менее эффективен для обоих типов клеток, чем свободный доксирубицин. В то же время второй конъюгат, полученный алкилированием, обладал значительно большей цитотоксичностью для устойчивых клеток, чем свободный антибиотик, а его активность по отношению к чувствительным клеткам не отличалась от активности доксирубицина.

В работе Крыловой и соавт. (2003) исследовали взаимодействие Pluronic® L61 с однослойными везикулами яичного желтка (диаметром 80–100 нм) для определения адсорбции на клеточной мембране. Было установлено, что, несмотря на довольно слабую адсорбцию (около 20 молекул полимера на везикулу), скорость проникновения доксирубицина, солюбилизированного плюроником, увеличивается в три раза, а скорость транслокации фосфолипидов в мембране увеличивается в шесть раз в 20 мкМ плюроника, при этом увеличение имеет линейную корреляцию с количеством адсорбированного полимера. Авторами отмечается, что очевидная способность плюроников увеличивать подвижность мембранных компонентов может иметь важные биомедицинские последствия [69].

В последующих работах российских ученых были окончательно сформулированы и обоснованы механизмы биологического действия полоксамеров [70–74]. Отмечалась способность блок-сополимеров ПЭО и ППО встраиваться в мембраны с последующей транслокацией в клетки и влиять на различные клеточные функции, такие как митохондриальное дыхание, синтез АТФ, активность переносчиков лекарственных средств, трансдукция апоптотического сигнала и экспрессия генов. В результате плюроники вызывают резкую сенсибилизацию опухолей с множественной лекарственной резистентностью к различным противоопухолевым агентам, усиливают транспорт лекарств через гематоэнцефалический и кишечный барьеры и вызывают транскрипционную активацию экспрессии генов как *in vitro*, так и *in vivo*.

Однако, несмотря на впечатляющий потенциал применения Pluronic® L61, необходимо принимать во внимание его возможный токсический эффект, это относится и к другим плюроникам. При высоких концентрациях блок-сополимеры ПЭО и ППО могут становиться токсичными для печени, почек или других органов организма [72]. Было показано, что токсичность блок-сополимеров ПЭО и ППО повышается в соответствии с параметрами гидрофобности блок-сополимеров при повышении эффективности потенцирования биологических агентов. При этом уровень повышения эффективности при изменении параметров гидрофобности значительно превосходит уровень повышения токсичности сополимера. Например, значение $ЛД_{50}$ для Pluronic® L61 у мышей в 10 раз ниже, чем значение $ЛД_{50}$ для Pluronic® F108. Однако различие в терапевтической дозе в 100 раз более благоприятно у Pluronic® L61, чем у Pluronic® F108 [73].

В 2013 году в журнале «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» опубликовано исследование, в котором отмечалось, что плюроники L61 и P85 могут эффективно применяться для ингибирования ассоциации липопротеидов низкой плотности, что демонстрирует перспективы создания на их основе новых лекарственных препаратов [74]. А. А. Мельниченко и соавт. утверждают, что полоксамеры с выраженными и умеренными гидрофобными свойствами в концентрации, близкой к ККМ, способны значительно ингибировать ассоциацию липопротеидов низкой плотности за счет образования мицелл.

Физико-химические свойства и некоторые аспекты синтеза блок-сополимеров полиэтиленоксида и полипропиленоксида. Плюроники (полоксамеры) по природе своей являются симметричными блок-сополимерами – линейными сополимерами, макромолекулы которых состоят из регулярно или статистически чередующихся гомополимерных блоков окиси этилена и окиси пропилена (рисунок 2). Благодаря сополимеразиции гидрофильного полиэтиленоксида и гидрофобного полипропиленоксида получается амфифильный полимер [75].

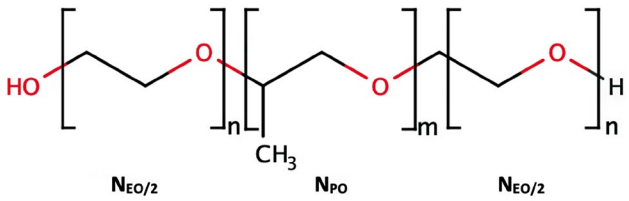


Рисунок 2. Структурная формула блок-сополимеров полиоксиэтилена и полиоксипропилена (блок-сополимеры ПЭО и ППО)

Figure 2. Structural formula of block copolymers of polyoxyethylene and polyoxypropylene (block copolymers of PEO and PPO)

В зависимости от количества оксиэтиленовых и оксипропиленовых групп меняются физико-химические свойства конечных полимеров. Так, было установлено, что с ростом гидрофильности плюроников, иначе говоря, с ростом массовой доли полиоксиэтиленовых групп в полимере, повышается его вязкость

и температура помутнения его водного раствора. При изменении количества окиси этилена, сконденсированной с полипропиленоксидом, можно получать различные продукты: подвижные жидкости (массовая доля полиэтиленоксида <40 %), вязкие жидкости и пасты (массовая доля полиэтиленоксида ≥40 %), твердые или воскообразные вещества (массовая доля полиэтиленоксида ≥60–70 %). Соотношение полипропиленоксида и полиэтиленоксида в молекуле также влияет на скорость растворения плюроников в воде и значение поверхностного натяжения в их водных растворах. Так, быстрее в воде растворяются полимеры с более высоким содержанием окиси этилена по сравнению с окисью пропилена. Например, полимеры с молекулярной массой гидрофобного компонента 1500–1800 Да (плюроник L64) и с молекулярной массой гидрофобного компонента 1100 Да (плюроник L44) содержат одинаковые по размеру оксиэтиленовые компоненты, но L44 характеризуется большей скоростью растворения [39].

Вклад окиси этилена и окиси пропилена в физико-химические свойства блок-сополимеров ПЭО и ППО наиболее наглядно отображает величина гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ), так как рассматриваемые полимеры являются неионогенными ПАВ. В работе Kabanov et al. рассматривалась зависимость физико-химических характеристик блок-сополимеров ПЭО и ППО от их строения на примере тридцати коммерчески доступных плюроников [75]. Как видно из данных, приведенных в таблице 2, на величину ГЛБ и агрегатное состояние плюроников влияет не столько количество оксиэтиленовых и оксипропиленовых компонентов, сколько их процентное содержание в полимере. С ростом массовой доли этиленоксида в блок-сополимере повышается его гидрофильность (возрастает величина ГЛБ). Вместе с этим повышается вязкость полимеров и температура помутнения их 1%-х водных растворов.

Одним из важнейших свойств блок-сополимеров ПЭО и ППО является способность отдельных молекул блок-сополимера собираться в мицеллы при достижении критической концентрации мицеллообразования (ККМ) в водном растворе. Количество молекул блок-сополимера, образующих одну мицеллу, называют числом агрегации, которое может колебаться от нескольких единиц до значения, превышающего сотню. Мицеллы имеют гидрофобное оксипропиленовое ядро и гидрофильную оксиэтильную оболочку, а их форма может быть сферической, палочковидной или пластинчатой в зависимости от длины блоков пропиленоксида и этиленоксида. Ядро пропиленоксида внутри мицелл может включать в себя различные липофильные соединения благодаря своей гидрофобности. Процесс переноса нерастворимых в воде соединений в ядро пропиленоксида в мицеллярном растворе называют солюбилизацией [76]. Это свойство сополимера можно использовать для создания различных лекарственных форм, в которых мицеллы плюроника будут выступать как система доставки действующего вещества.

По мере увеличения концентрации блок-сополимера мицеллы составляют более плотно упакованные структуры и с достижением определенной пороговой концентрации образуют гели. Такие гели имеют микрогетерогенную структуру, способны набухать и биосовместимы [77–80]. Цепи пропиленоксида имеют низкую критическую температуру растворения, благодаря чему и мицеллы плюроников, и их гели обладают свойством термореверсивности. В то время как цепи пропиленоксида гидратированы и растворимы в воде при низких температурах, при повышении температуры они дегидратируются и становятся нерастворимыми, что приводит к образованию ядер мицелл. Температура, при которой образуются мицеллы, называется критической температурой мицеллообразования (КТМ). Точно так же образование гелей наблюдается только при до-

Таблица 2. **Физико-химические свойства блок-сополимеров $(ПЭО)_{N/2}$-(ППО)m-$(ПЭО)_{N/2}$ [75]**

Table 2. **Physicochemical characteristics of $(PEO)_{N/2}$-(PPO)m-$(PEO)_{N/2}$ [75]**

Сополимер Copolymer	**Молярная масса (Da)** Average molecular weights (Da)	**Среднее количество групп ЭО в блоке (N_{eo})** Average no. of EO units, N_{EO}	**Среднее количество групп ПО в блоке (N_{no})** Average no. of PO units, N_{PO}	**Содержание этиленоксида в блок-сополимере ($M\%_{эо}$)** Mass content of ethylene oxide шт copolymer, $M\%_{эо}$	**ГЛБ** HLB	**Температура помутнения в 1%-м растворе полимера(°C)** Cloud point in 1 % aqueous solution, °C	**ККМ (моль/л)** CMC or critical micelle concentration, mol/l
L121	4400	10.00	68.28	≈10 %	1	14	$1.0 \cdot 10^{-6}$
L35	1900	21.59	16.38	≈50 %	19	73	$5.3 \cdot 10^{-3}$
P123	5750	39.20	69.40	≈30 %	8	90	$4.4 \cdot 10^{-6}$
P84	4200	38.18	43.45	≈40 %	14	74	$7.1 \cdot 10^{-5}$
F87	7700	122.50	39.83	≈70 %	24	>100	$9.1 \cdot 10^{-5}$
F68	8400	152.73	28.97	≈80 %	29	>100	$4.8 \cdot 10^{-4}$

стижении температуры гелеобразования. Это свойство часто используют для захвата макромолекул, таких как ДНК, в гели: компоненты смешивают при низкой температуре, а затем повышают температуру, что вызывает золь-гель-переход. Это свойство плюроников также следует учитывать при стерилизующей фильтрации их растворов [81, 82].

Структура блок-сополимеров оказывает сильное влияние на процессы мицеллообразования и гелеобразования. По мере увеличения длины гидрофобного блока пропиленоксида условия для образования мицелл и гелей становятся более благоприятными, что приводит к более низким значениям ККМ, КТМ, концентраций и температур гелеобразования. И наоборот, увеличение длины гидрофильного блока этиленоксида снижает стабильность мицелл [83]. Таким образом, на гелеобразование в водных растворах плюроников влияют три основные переменные: массовая концентрация блок-полимера в растворе; молекулярная масса гидрофобного основания полипропиленоксида; количество молей этиленоксида, конденсированного с гидрофобным основанием пропиленоксида [84].

Синтез. Блок-сополимеры ПЭО и ППО получают путем анионной полимеризации с раскрытием цикла (anionic ring-opening polymerization – APOP). В качестве инициатора реакции используется водорастворимый пропиленгликоль в присутствии безводного гидроксида калия / гидроксида натрия, выступающего в роли щелочного агента [75]. Реже используют иной инициатор – безводный однозамещенный этиленгликолят калия/натрия [85]. На первой стадии синтеза к щелочному агенту в реактор при постоянном перемешивании и при поддержании инертной атмосферы посредством вымещения воздуха азотом последовательно добавляется пропиленоксид (схема 1).

Затем в реакционную смесь последовательно добавляется необходимое количество этиленоксида. После протекания синтеза инициатор удаляется из реакционной смеси (схема 2) [85, 86].

Соотношение пропиленоксид/этиленоксид можно варьировать в необходимых диапазонах для получения блок-сополимера с желаемыми свойствами. Температурный режим в зависимости от выбранной методики синтеза может колебаться в пределах от 353 до 413 К. Во время протекания реакций необходимо соблюдать несколько условий: должна сохраняться инертная атмосфера во избежание окисления реагентов кислородом воздуха; все компоненты

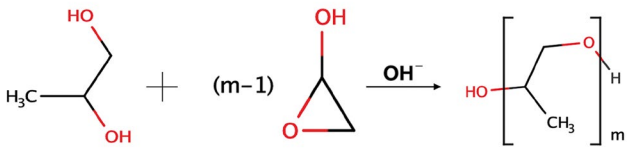


Схема 1

реакционной смеси должны быть безводными во избежание гидролиза полимера.

Качественный и количественный анализ конечного полимера целесообразно проводить посредством количественного ^{1}H-ядерного магнитного резонанса (^{1}H-ЯМР) или ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием (FTIR) [84, 87].

Названия различных блок-сополимеров обычно представляют собой цифробуквенный, реже цифровой код, который является носителем информации о составе того или иного соединения (таблица 3).

Так, в кодах, используемых для идентификации полоксамеров, первые две цифры – это молярная масса гидрофобного блока пропиленоксида в Да, деленная на 100, а последняя – процентное содержание этиленоксида по массе, деленное на 10.

Название плюроников традиционно состоит из буквы [F, L или P в зависимости от того, являются ли они твердыми (Firm), жидкими (Liquid) или пастообразными (Paste)] и цифрового кода. Цифры указывают длину гидрофобного блока полимера (количество звеньев пропиленоксида), деленную на 5 (первые две цифры), и процентное по весу содержание ПЭО в молекуле, деленное на 10 (последняя цифра) [88].

Существует также альтернативная формула расчета состава плюроников с использованием их цифро-буквенного кода, где последняя цифра, умноженная на 10, обозначает содержание ПЭО в процентах, а первые одна или две цифры, умноженные на 300, соответствуют Мм ППО в Да [89].

Проксанолы обычно обозначают тремя цифрами, первые две из которых являются характеристикой величины молекулярной массы гидрофобной части молекулы (ПО блока) в Да, деленной на 100, а третья – массовой доли содержания ЭО от общей молекулярной массы, деленной на 10 [90].

Как видно из таблицы 3, в настоящее время синтезируемые и коммерчески доступные отечественные и иностранные блок-сополимеры ПЭО и ППО слабо гармонизированы по параметрам молекулярной массы, а также соотношения гидрофильных и гидрофобных блоков. Однако очевидно, что у оте-

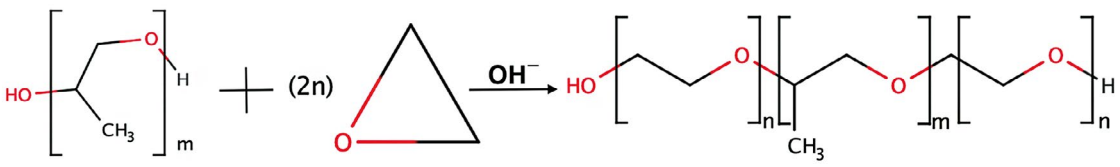


Схема 2

Таблица 3. Характеристики некоторых, широко используемых блок-сополимеров ПЭО и ППО [41, 52, 55, 88, 90–92]

Table 3. Characteristics of some commonly used PEO and PPO block copolymers [41, 52, 55, 88, 90–92]

Плюроники, полоксамеры (Европа, США) Pluronics, poloxamers (Europe, USA)						Проксанолы, эмуксолы (СССР/РФ) Proxanols, emuxols (USSR/RF)				
Код Pluronic® (Poloxamer) Code Pluronic® (Poloxamer)	**Код CRL** Code CRL	**Мм, Да** Molar mass, Da	**ЭО** EO	**ПО** PO	**% ПЭО** % PEO	**Код** Code	**Мм, Да** Molar mass, Da	**ЭО** EO	**ПО** PO	**% ПЭО** % PEO
F68 (188)	CRL85178	8400	156	29	82	186	4500	62	30	60
F127 (407)	–	12700	208	62	73	305	6000	68	52	54
L101 (331)	CRL8131	3500	10	56	10	168 № 38	5700	104	19	80
(315)	CRL1072	3100	8	60	50	168 № 24	8000	146	28	80
L61 (181)	CRL85171	1945	4	30	10	Б127	2900	42	20	65
F108(338)	CRL9038	15000	288	44	83	268	13000	260	42	80
L44(124)	–	2500	18	21	44	268 № 35	7200	132	24	80,5
F87(237)	–	7500	124	38	72	268 № 1	8000	147	26	81
P105 (335)	CRL8135	6500	74	56	50	228	11000	110	40	80
						224	3700	34	38	40

чественных исследователей существует обширный опыт и все необходимые ресурсы для производства собственных блок-сополимеров ПЭО и ППО как для импортозамещения высоко востребованных марок плюроников, так и для разработки новых собственных полимеров с перспективой их внедрения в инновационные разработки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес к синтезу блок-сополимеров ПЭО и ППО для нужд фармации, медицины устойчиво сохраняется на протяжении последних пятидесяти лет. Полоксамеры обладают уникальным комплексом технологических, биологических и фармакологических свойств, благодаря которым они продолжают находить применение в инновационных научных разработках. Использование полоксамеров не только как вспомогательных веществ в составе традиционных лекарственных форм, но и как незаменимых составляющих компонентов систем направленной доставки обеспечивает потребность отечественной фармацевтической промышленности в устойчивых источниках закупок полимеров или базах синтеза полоксамеров. Необходимо отметить, что у Российской Федерации есть собственный положительный опыт синтеза блок-сополимеров ПЭО и ППО, и на сегодняшний день, в условиях возникновения частичной дефектуры различных эксципиентов, этот опыт может быть очень полезен не только для реализации программ импортозамещения, но и для создания полностью отечественных инновационных препаратов, согласно Плану мероприятий по импортозамещению в медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2024 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lazzari M., Torneiro M. A Global View on Block Copolymers. *Polymers (Basel)*. 2020;12(4):869. DOI: 10.3390/polym12040869.
2. Kida D., Zakrzewska A., Zborowski J., Szulc M., Karolewicz B. Polymer-Based Carriers in Dental Local Healing-Review and Future Challenges. *Materials (Basel)*. 2021;14(14):3948. DOI: 10.3390/ma14143948.
3. Sodupe-Ortega E., Sanz-Garcia A., Pernia-Espinoza A., Escobedo-Lucea C. Accurate Calibration in Multi-Material 3D Bioprinting for Tissue Engineering. *Materials*. 2018;11(8):1402. DOI: 10.3390/ma11081402.
4. Gori M., Giannitelli S. M., Torre M., Mozetic P., Abbruzzese F., Trombetta M., Traversa E., Moroni L., Rainer A. Biofabrication of Hepatic Constructs by 3D Bioprinting of a Cell-Laden Thermogel: An Effective Tool to Assess Drug-Induced Hepatotoxic Response. *Advanced Healthcare Materials*. 2020;9(21):e2001163. DOI: 10.1002/adhm.202001163.
5. Fu Z., Angeline V., Sun W. Evaluation of Printing Parameters on 3D Extrusion Printing of Pluronic Hydrogels and Machine Learning Guided Parameter Recommendation. *International Journal of Bioprinting*. 2021;7(4):434. DOI: 10.18063/ijb.v7i4.434.
6. Tracy E. P., Gettler B. C., Zakhari J. S., Schwartz R. J., Williams S. K., Birla R. K. 3D Bioprinting the Cardiac Purkinje System Using Human Adipogenic Mesenchymal Stem Cell Derived Purkinje Cells. *Cardiovasc Eng Technol*. 2020;11(5):587–604. DOI: 10.1007/s13239-020-00478-8.
7. Пальвинский А. Г., Бахрушина Е. О., Козлова Ж. М., Синицына А. А., Краснюк И. И. Разработка термореверсивного стоматологического геля с берберином. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):88–92. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-88-92.
8. Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Тихонова В. В., Уэйли А. К., Трофимов М. А., Приходько В. А., Шигарова Л. В. Разработка лекарственной формы мафедина в виде лиофилизата для парентерального введения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):88–94. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-88-94.
9. 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 фарма-

цевтические аспекты разработки (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):54–63. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63.
10. Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Демина Н. Б., Лапик И. В., Тураева А. Р., Краснюк И. И. Системы доставки офтальмологических препаратов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):57-66. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-57-66.
11. Schmolka I. R., Application filed by BASF Wyandotte Corp. Polyoxyethylene-polyoxypropylene aqueous gels. United States Patent US3740421A 19.09.1966. 19.06.1973. Publication of US3740421A. Avialable at: https://patents.google.com/patent/US3740421A/en. Accessed: 19.01.2023.
12. Schmolka I. R., Raymond A. J. Micelle formation of polyoxyethylene-polyoxypropylene surfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1965;42:1088–1091.
13. Schmolka I. R., Bacon L. R. Viscosity characteristics of aqueous solutions of block copolymers of propylene and ethylene oxides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.1967;44:559–562.
14. Artz C. P. Newer concepts of nutrition by the intravenous route. *Annals of Surgery*. 1959;149(6):841–849. DOI: 10.1097/00000658-195906000-00007.
15. Stowe B. B. Growth Promotion in Pea Stem Sections. I. Stimulation of Auxin and Gibberellin Action by Alkyl Lipids. *Plant Physiology*. 1960;35(2):262–269. DOI: 10.1104/pp.35.2.262.
16. Stuart A. E., Biozzi G., Stiffel C., Halpern B. N., Mouton D. The Stimulation and Depression of Reticulo-endothelial Phagocytic Function by Simple Lipids. *British journal of experimental pathology*. 1960;41(6):599–604.
17. Mizrahi A. Pluronic polyols in human lymphocyte cell line cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 1975;2(1):11-13. DOI: 10.1128/jcm.2.1.11-13.1975.
18. Schmolka I. R., Seizinger R. K. New tertiary amine-based surface active polymers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1968;45:715–719.
19. Edlich R. F. The molecular basis for toxicity of surfactants in surgical wounds. 1. EO:PO block polymers. *The Journal of surgical research*. 1973;14 (4):277–284.
20. Clark L., Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxigen at atmospheric pressure. *Science*. 1966;152:1755–1756.
21. Иваницкий Г. Р., Воробьев С. И. Кровезаменитель «Перфторан». *Вестник Российской Академии Наук*. 1997;11(67):998–1013.
22. Schmolka I. R. Artificial blood emulsifiers. *Federation proceedings*. 1975;34(6):1449–1453.
23. Schmolka I. R. Artificial skin. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of biomedical materials research*. 1972;6(6):571–582.
24. Brock-Utne J. Preventing fat embolism. *British Medical Journal*. 1978;2(6129):54–55. DOI: 10.1136/bmj.2.6129.54-e.
25. Drinkwater C., Twycross R. G. Analgesia in terminal malignant disease. *British Medical Journal*. 1979;1(6172):1201–1202. DOI: 10.1136/bmj.1.6172.1201.
26. Anderson R. L., Berkelman R. L., Mackel D. C., Davis B. J., Holland B. W., Martone W. J. Investigations into the survival of Pseudomonas aeruginosa in poloxamer-iodine. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984;47(4):757–762. DOI: 10.1128/aem.47.4.757-762.1984.
27. Anderson R. L., Vess R. W., Panlilio A. L., Favero M. S. Prolonged survival of Pseudomonas cepacia in commercially manufactured povidone-iodine. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(11):3598–600. DOI: 10.1128/aem.56.11.3598-3600.1990.
28. Krahenbuhl J. L., Fukutomi Y., Gu L. Treatment of acute experimental toxoplasmosis with investigational poloxamers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37(11):2265–2269. DOI: 10.1128/AAC.37.11.2265.
29. Araujo F. G., Slifer T. Nonionic block copolymers potentiate activities of drugs for treatment of infections with Toxoplasma gondii. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(12):2696–2701. DOI: 10.1128/AAC.39.12.2696.
30. Jagannath C., Allaudeen H. S., Hunter R. L. Activities of poloxamer CRL8131 against Mycobacterium tuberculosis in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(6):1349–1354. DOI: 10.1128/AAC.39.6.1349.
31. Hunter R. L., Jagannath C., Tinkley A., Behling C. A., Nolte F. Enhancement of antibiotic susceptibility and suppression of Mycobacterium avium complex growth by poloxamer 331. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(2):435-439. DOI: 10.1128/AAC.39.2.435.
32. Jagannath C., Sepulveda E., Actor J. K., Luxem F., Emanuele M. R., Hunter R. L. Effect of poloxamer CRL-1072 on drug uptake and nitric-oxide-mediated killing of Mycobacterium avium by macrophages. *Immunopharmacology*. 2000;48:185–197. DOI: 10.1016/s0162-3109(00)00203-4.
33. Jagannath C., Pai S., Actor J. K., Hunter R. L. CRL-1072 enhances antimycobacterial activity of human macrophages through interleukin-8. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 1999;19:67–76. DOI: 10.1089/107999099314432.
34. Crilly N. P., Ayeh S. K., Karakousis P. C. The New Frontier of Host-Directed Therapies for *Mycobacterium avium* Complex. *Frontiers in Immunology*. 2021;11:623119. DOI: 10.3389/fimmu.2020.623119.
35. Espuelas S., Legrand P., Loiseau P. M., Bories C., Barratt G., Irache J. M. In vitro reversion of amphotericin B resistance in Leishmania donovani by poloxamer 188. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(8):2190–2192. DOI: 10.1128/AAC.44.8.2190-2192.2000.
36. Veyries M.-L., Faurisson F., Joly-Guillou M.-L., Rouveix B. Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(4):1093–1096. DOI: 10.1128/AAC.44.4.1093-1096.2000.
37. Sharma V., Stebe K., Murphy J. C., Tung L. Poloxamer 188 decreases susceptibility of artificial lipid membranes to electroporation. *Biophysical Journal*. 1996;71(6):3229–3241. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79516-4.
38. Evers R., Kool M., Smith A. J., van Deemter L., de Haas M., Borst P. Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport. *British Journal of Cancer*. 2000;83(3):366–374. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1260.
39. Левченко Д. Н., Бергштейн Н. В., Худякова А. Д., Николаева Н. М. Эмульсии нефти с водой и методы их разрушения. М.: Издво «Химия»; 1967. 200 с.
40. Неволин Ф. В. Химия и технология синтетических моющих средств. М.: Пищевая промышленность; 1964. 364 с.
41. Сергеева А. Г., ред. Руководство по технологии получения и переработки растительных масел и жиров. Л.: ВНИИЖ; 1973. 352 с.
42. Воробьев А. М. Выбор рецептур моющих средств для очистки кожи от радиоактивных загрязнений. *Гигиена и санитария*. 1967;7:47–51.
43. Черкашина Т. Н., Павловская Н. А., Моисейцев П. И. Дезактивация поверхностей, загрязненных изотопами тория и продуктами его распада. *Гигиена и санитария*. 1970;10:35–39.
44. Дмитриев М. Т., Китросский Н. А., Ерофеева З. А. Ионизационно-хроматографическое раздельное определение детергентов в воде с предварительным пиролизом. *Гигиена и санитария*. 1971;8:77–82.
45. Новиков Ю. В., Дмитриев М. Т., Хрусталева В. А. Физические методы исследования в современной гигиене. *Гигиена и санитария*. 1973;6:70–74.
46. Ахмадова Х. Х., Такаева М. А., Мусаева М. А., Сыркин А. М. История разработки и применения деэмульгаторов при добыче и подготовке нефти к переработке. *История и педагогика естествознания*. 2015;1:27–34.
47. Ситдикова С. Р. Применение химических реагентов для совершенствования процессов подготовки нефти. Дисс. ... на соиск. уч. ст. кандидата технических наук. Уфа; 2003. Доступно по: http://ogbus.ru/files/ogbus/authors/Sitdikova/Sitdikova_1.pdf. Ссылка активна на 19.01.2023.

48. Фляте Д. М., ред. Проблемы сохранности документальных материалов. Л.: Наука. Ленингр. отделение; 1977. 111 с.
49. Москвин Ю. Г. Разработка процесса антистатической обработки хлопколавсановых смесей в пневмопрядении. Дисс. ... на соиск. уч. ст. канд. техн. наук. Москва; 1984. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/razrabotka-protsessa-antistaticheskoi-obrabotki-khlopkolavsanovykh-smesei-v-pnevmopryadenii. Ссылка активна на 19.01.2023.
50. Мастобаев Б. М., Шаммазов А. М., Мовсумзаде Э. М. Химические средства и технологии в трубопроводном транспорте нефти. М.: Химия; 2002. 296 с.
51. Иваницкий Г. Р. Из истории создания кровезаменителей. *Вестник РАМН.* 1997;11(67):1008.
52. Воробьев С. И. Биологические и физико-химические свойства неионогенных поверхностно-активных веществ. *Российский биотерапевтический журнал.* 2009;3(8):3–8.
53. Аршинцева Е. В., Пушкин С. Ю. Сравнительное изучение острой токсичности полоксамеров при внутривенном введении на аутбредных крысах. *Интернаука: электронный научный журнал.* 2022;13(236).
54. Маевский Е. И., Кулакова Г. М., Гудкова О. В., Исламов Б. И. Способ очистки проксанолов. Патент RU 2 157 241 C2. 10.10.2000. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2157241C2_20001010. Ссылка активна на 19.01.2023.
55. Топчиева И. Н., Осипова С. В., Касаикин В. А. Влияние температуры на структурообразование блок-сополимеров окиси этилена и окиси пропилена в водных растворах. *Высокомолекулярные соединения. Серия Б.* 1990;35(5):396–398.
56. Панова И. Г., Герасимов В. И., Ташлицкий В. Н., Топчиева И. Н., Кабанов В. А. Кристаллические комплексы включения на основе циклодекстринов и трехблочных сополимеров окисей этилена и пропилена. *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 1997;4(39):663–670.
57. Топчиева И. Н., Блюменфельд А. Л., Климкин А. А., Поляков В. А., Кабанов В. А. Супрамолекулярные структуры на основе блок-сополимеров окиси этилена и окиси пропилена и циклодекстринов. *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 1994;2(36):271–278.
58. Поляков В. А., Коломникова Е. Л., Топчиева И. Н., Кабанов В. А. Изучение методом ПМР комплексообразования между β-циклодекстрином и блок-сополимерами окиси этилена и окиси пропилена. *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. 1993;5(35):285–288.
59. Давиденко Т. И. Супрамолекулярные структуры β-циклодекстрина с поверхностно-активными веществами. *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* 2000;42(5):775–778.
60. Топчиева И. Н., Калашников Ф. А., Спиридонов В. В., Захарова Ю. А. Полимерные нанотрубки на основе циклодекстринов. *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* 2003;45(11):1797–1806.
61. Панова И. Г, Герасимов В. И., Топчиева И. Н. Структурообразование в системе α-циклодекстрин-полиэтиленоксид-вода. *Высокомолекулярные соединения. Серия Б.* 1998;40(10):1681–1686.
62. Топчиева И. Н., Панова И. Г., Спиридонов В. В., Матухина Е. В., Курганов Б. И. Оценка молекулярных масс нековалентных колончатых полимеров на основе β-циклодекстрина путем измерения скорости агрегации их полимерных комплексов включения с полипропиленгликолем. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия.* 2010;51(5):386–392.
63. Попова Е. И., Топчиева И. Н., Жаворонкова Е. В., Панова И. Г., Матухина Е. В., Герасимов В. И. Два типа инклюзионных комплексов на основе полипропиленоксида и β-циклодекстрина. *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* 2002;44(1):85–90.
64. Панова И. Г., Матухина Е. В., Попова Е. И., Герасимов В. И., Топчиева И. Н. Структурное организация комплексов включения β-циклодекстрина и полипропиленоксидом. *Высокомолекулярные соединения. Серия А.* 2001;43(7):1228–1236.
65. Спиридонов В. В., Топчиева И. Н., Захаров А. Н., Афанасов М. И. Способ получения термочувствительных наночастиц на основе 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина. Патент на изобретение RU 2578421 C1, 27.03.2016. Заявка № 2014134416/15 от 25.08.2014. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2578421C1_20160327. Ссылка активна на 19.01.2023.
66. Alakhov V. Y., Moskaleva E. Y., Batrakova E. V., Kabanov A. V. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. *Bioconjugate Chemistry*. 1996;2(7):209–216.
67. Batrakova E. V., Dorodnych T. Y., Klinskii E. Y., Kliushnenkova E. N., Shemchukova O. B., Goncharova O. N., Arjakov S. A., Alakhov V. Y., Kabanov A. V. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. *British Journal of Cancer.* 1996;74(10):1545–1552. DOI: 10.1038/bjc.1996.587.
68. Мелик-Нубаров Н. С., Дородных Т. Ю., Батракова Е. В., Козлов М. Ю., Суздальцева Ю. Г., Кабанов А. В., Алахов В. Ю., Аржаков С. А. Синтез и биологическая активность функциональных блок-сополимеров на основе конъюгатов плюроника Р85 с доксорубицином. *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 1999;5(41):768–775.
69. Krylova O. O., Melik-Nubarov N. S., Badun G. A., Ksenofontov A. L., Menger F. M., Yaroslavov A. A. Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation. *Chemistry.* 2003;9(16):3930-3936. DOI: 10.1002/chem.200204621.
70. Venne A., Li S., Mandeville R., Kabanov A., Alakhov V. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Research*. 1996;56(16):3626–3629.
71. Иксанова А. Г., Фаттахова А. Н., Габитова Л. Р., Малофеева Е. В., Щербина Л. Л., Салафутдинов И. И., Стрельник А. Д., Абдуллин Т. И., Штырлин Ю. Г. Новая система доставки биологически активных веществ в клетки на основе олигоэфирполиола. *Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки.* 2010;152(3):134–142.
72. Batrakova E. V., Kabanov A. V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release.* 2008;130(2):98–106. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.04.013.
73. Кабанов В., Алахов В. Ю., Свешников П. Г., Северин Е. С. Композиции, включающие биологический агент. Патент РФ RU98100213A. 20.05.2001. Доступно по: https://patents.google.com/patent/RU98100213A/ru. Ссылка активна на 19.01.2023.
74. Мельниченко А. А., Аксенов Д. В., Панасенко О. М., Ярославов А. А., Собенин И. А., Орехов А. Н. Плюроники подавляют ассоциацию липопротеидов низкой плотности, инициирующую атерогенез. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013;11(156):574–577.
75. Kabanov A., Zhu J., Alakhov V. Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. *Advances in Genetics*. 2005;53(05):231–261. DOI: 10.1016/S0065-2660(05)53009-8.
76. Nagarajan R. Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic® (PEO–PPO–PEO) block copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1999;16(1–4):55–72. DOI: 10.1016/S0927-7765(99)00061-2.
77. Cellesi F., Tirelli N., Hubbell J. A. Materials for cell encapsulation via a new tandem approach combining reverse thermal gelation and covalent crosslinking. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2002;203(10–11):1466–1472. DOI: 10.1002/1521-3935(200207)203:10/11<1466::AID-MACP1466>3.0.CO;2-P.
78. Epperson J. D., Dodge J., Rill R. L., Greenbaum N. L. Analysis of oligonucleotides and unincorporated nucleotides from in vitro transcription by capillary electrophoresis in Pluronic F127 gels. *Electrophoresis*. 2001;22(4):771–778. DOI: 10.1002/1522-2683(200102)22:4<771::AID-ELPS771>3.0.CO;2-#.
79. Schmolka I. R. Polyoxyethylene-polyoxypropylene aqueous gels. In *ACM SIGGRAPH Computer Graphics*. 1973;28(2):131–134. DOI: 10.1145/178951.178972.

80. Van Belle E., Maillard L., Rivard A., Fabre J. E., Couffinhal T., Kearney M., Branellec D., Feldman L. J., Walsh K., Isner J. M. Effects of poloxamer 407 on transfection time and percutaneous adenovirus-mediated gene transfer in native and stented vessels. *Human Gene Therapy*. 1998;9(7):1013–1024. DOI: 10.1089/hum.1998.9.7-1013.
81. Linse P., Malmsten M. Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions. *Macromolecules*. 1992;25(20):5434–5439. DOI: 10.1021/ma00046a048.
82. Schillén K., Glatter O., Brown W. Characterization of a PEO-PPO-PEO block copolymer system. In: Laggner P., Glatter O., editors. Trends in Colloid and Interface Science VII. Berlin: Springer-Verlag. 1993. V. 93. P. 66–71. DOI: 10.1007/BFb0118476.
83. Alexandridis P., Holzwarth J. F., Hatton T. A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules*. 1994;27(9):2414–2425. DOI: 10.1021/ma00087a009.
84. Schmolka I. R. A review of block polymer surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1977;54(3):110–116. DOI: 10.1007/BF02894385.
85. Cendejas G., Arreguín F., Castro L. V., Flores E. A., Vazquez F. Demulsifying super-heavy crude oil with bifunctionalized block copolymers. *Fuel*. 2013;103:356–363. DOI: 10.1016/j.fuel.2012.08.029.
86. Bonacucina G., Cespi M., Mencarelli G., Giorgioni G., Palmieri G. F. Thermosensitive self-assembling block copolymers as drug delivery systems. *Polymers*. 2011;3(2):779–811. DOI: 10.3390/polym3020779.
87. Lundsted L. G., Wyandotte Chemicals Corp. Polyoxyalkylene compounds. Patent CA540357A. 1957-04-30. Available at: https://patents.google.com/patent/CA540357A/en. Accessed: 19.01.2023 (In French).
88. Zhang Z., Xu G. Y., Wang F., Dong S. L., Li Y. M. Characterization and demulsification of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004;277(2):464–470. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.04.035.
89. Будкина О. А. Структурно-функциональные закономерности воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки. Дисс. ... на соиск. уч. ст. канд. хим. наук. Москва. 2015. 25 с.
90. Emanuele M., Balasubramaniam B. Differential Effects of Commercial-Grade and Purified Poloxamer 188 on Renal Function. *Drugs in R&D*. 2014;14(2):73–83. DOI: 10.1007/s40268-014-0041-0.
91. Clair J. St. Rotating electrostatic propulsion system. Patent US20030209637A1. 13.11.2003. Available at: https://patents.google.com/patent/US20030209637A1/en. Accessed: 19.01.2023.
92. Kim M., Haman K. J., Houang E. M., Zhang W., Yannopoulos D., Metzger J. M., Bates F. S., Hackel B. J. PEO-PPO Diblock Copolymers Protect Myoblasts from Hypo-Osmotic Stress In Vitro Dependent on Copolymer Size, Composition, and Architecture. *Biomacromolecules*. 2017;18(7):2090–2101. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b00419.

REFERENCES

1. Lazzari M., Torneiro M. A Global View on Block Copolymers. *Polymers (Basel)*. 2020;12(4):869. DOI: 10.3390/polym12040869.
2. Kida D., Zakrzewska A., Zborowski J., Szulc M., Karolewicz B. Polymer-Based Carriers in Dental Local Healing-Review and Future Challenges. *Materials (Basel)*. 2021;14(14):3948. DOI: 10.3390/ma14143948.
3. Sodupe-Ortega E., Sanz-Garcia A., Pernia-Espinoza A., Escobedo-Lucea C. Accurate Calibration in Multi-Material 3D Bioprinting for Tissue Engineering. *Materials*. 2018;11(8):1402. DOI: 10.3390/ma11081402.
4. Gori M., Giannitelli S. M., Torre M., Mozetic P., Abbruzzese F., Trombetta M., Traversa E., Moroni L., Rainer A. Biofabrication of Hepatic Constructs by 3D Bioprinting of a Cell-Laden Thermogel: An Effective Tool to Assess Drug-Induced Hepatotoxic Response. *Advanced Healthcare Materials*. 2020;9(21):e2001163. DOI: 10.1002/adhm.202001163.
5. Fu Z., Angeline V., Sun W. Evaluation of Printing Parameters on 3D Extrusion Printing of Pluronic Hydrogels and Machine Learning Guided Parameter Recommendation. *International Journal of Bioprinting*. 2021;7(4):434. DOI: 10.18063/ijb.v7i4.434.
6. Tracy E. P., Gettler B. C., Zakhari J. S., Schwartz R. J., Williams S. K., Birla R. K. 3D Bioprinting the Cardiac Purkinje System Using Human Adipogenic Mesenchymal Stem Cell Derived Purkinje Cells. *Cardiovasc Eng Technol*. 2020;11(5):587–604. DOI: 10.1007/s13239-020-00478-8.
7. Palvinskiy A. G., Bakhrushina E. O., Kozlova Zh. M., Sinitsyna A. A., Krasnyuk I. I. Development of a thermoreversible dental gel with berberine. *Drug development & registration*. 2020;9(4):88–92. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-88-92.
8. Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Tikhonova V. V., Wailey A. K., Trofimov M. A., Prikhodko V. A., Shigarova L. V. Development of a mafedine lyophilizate for parenteral use. *Drug development & registration*. 2021;10(4):88–94. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-88-94.
9. 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.
10. Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Demina N. B., Lapik I. V., Turaeva A. R., Krasnyuk I. I. Ophthalmic Drug Delivery Systems (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(1):57–66. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-57-66.
11. Schmolka I. R., Application filed by BASF Wyandotte Corp. Polyoxyethylene-polyoxypropylene aqueous gels. United States Patent US3740421A 19.09.1966. 19.06.1973. Publication of US3740421A. Avialable at: https://patents.google.com/patent/US3740421A/en. Accessed: 19.01.2023.
12. Schmolka I. R., Raymond A. J. Micelle formation of polyoxyethylene-polyoxypropylene surfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1965;42:1088–1091.
13. Schmolka I. R., Bacon L. R. Viscosity characteristics of aqueous solutions of block copolymers of propylene and ethylene oxides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.1967;44:559–562.
14. Artz C. P. Newer concepts of nutrition by the intravenous route. *Annals of Surgery*. 1959;149(6):841–849. DOI: 10.1097/00000658-195906000-00007.
15. Stowe B. B. Growth Promotion in Pea Stem Sections. I. Stimulation of Auxin and Gibberellin Action by Alkyl Lipids. *Plant Physiology*. 1960;35(2):262–269. DOI: 10.1104/pp.35.2.262.
16. Stuart A. E., Biozzi G., Stiffel C., Halpern B. N., Mouton D. The Stimulation and Depression of Reticulo-endothelial Phagocytic Function by Simple Lipids. *British journal of experimental pathology*. 1960;41(6):599–604.
17. Mizrahi A. Pluronic polyols in human lymphocyte cell line cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 1975;2(1):11-13. DOI: 10.1128/jcm.2.1.11-13.1975.
18. Schmolka I. R., Seizinger R. K. New tertiary amine-based surface active polymers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1968;45:715–719.
19. Edlich R. F. The molecular basis for toxicity of surfactants in surgical wounds. 1. EO:PO block polymers. *The Journal of surgical research*. 1973;14 (4):277–284.
20. Clark L., Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxigen at atmospheric pressure. *Science*. 1966;152:1755–1756.
21. Ivanitsky G. R., Vorobyov S. I. Blood substitute "Perftoran". *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. 1997;11(67):998–1013. (In Russ.)
22. Schmolka I. R. Artificial blood emulsifiers. *Federation proceedings*. 1975;34(6):1449–1453.
23. Schmolka I. R. Artificial skin. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of biomedical materials research*. 1972;6(6):571–582.

24. Brock-Utne J. Preventing fat embolism. *British Medical Journal*. 1978;2(6129):54–55. DOI: 10.1136/bmj.2.6129.54-e.
25. Drinkwater C., Twycross R. G. Analgesia in terminal malignant disease. *British Medical Journal*. 1979;1(6172):1201–1202. DOI: 10.1136/bmj.1.6172.1201.
26. Anderson R. L., Berkelman R. L., Mackel D. C., Davis B. J., Holland B. W., Martone W. J. Investigations into the survival of Pseudomonas aeruginosa in poloxamer-iodine. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984;47(4):757–762. DOI: 10.1128/aem.47.4.757-762.1984.
27. Anderson R. L., Vess R. W., Panlilio A. L., Favero M. S. Prolonged survival of Pseudomonas cepacia in commercially manufactured povidone-iodine. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(11):3598–600. DOI: 10.1128/aem.56.11.3598-3600.1990.
28. Krahenbuhl J. L., Fukutomi Y., Gu L. Treatment of acute experimental toxoplasmosis with investigational poloxamers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37(11):2265–2269. DOI: 10.1128/AAC.37.11.2265.
29. Araujo F. G., Slifer T. Nonionic block copolymers potentiate activities of drugs for treatment of infections with Toxoplasma gondii. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(12):2696–2701. DOI: 10.1128/AAC.39.12.2696.
30. Jagannath C., Allaudeen H. S., Hunter R. L. Activities of poloxamer CRL8131 against Mycobacterium tuberculosis in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(6):1349–1354. DOI: 10.1128/AAC.39.6.1349.
31. Hunter R. L., Jagannath C., Tinkley A., Behling C. A., Nolte F. Enhancement of antibiotic susceptibility and suppression of Mycobacterium avium complex growth by poloxamer 331. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(2):435-439. DOI: 10.1128/AAC.39.2.435.
32. Jagannath C., Sepulveda E., Actor J. K., Luxem F., Emanuele M. R., Hunter R. L. Effect of poloxamer CRL-1072 on drug uptake and nitric-oxide-mediated killing of Mycobacterium avium by macrophages. *Immunopharmacology*. 2000;48:185–197. DOI: 10.1016/s0162-3109(00)00203-4.
33. Jagannath C., Pai S., Actor J. K., Hunter R. L. CRL-1072 enhances antimycobacterial activity of human macrophages through interleukin-8. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 1999;19:67–76. DOI: 10.1089/107999099314432.
34. Crilly N. P., Ayeh S. K., Karakousis P. C. The New Frontier of Host-Directed Therapies for *Mycobacterium avium* Complex. *Frontiers in Immunology*. 2021;11:623119. DOI: 10.3389/fimmu.2020.623119.
35. Espuelas S., Legrand P., Loiseau P. M., Bories C., Barratt G., Irache J. M. In vitro reversion of amphotericin B resistance in Leishmania donovani by poloxamer 188. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(8):2190–2192. DOI: 10.1128/AAC.44.8.2190-2192.2000.
36. Veyries M.-L., Faurisson F., Joly-Guillou M.-L., Rouveix B. Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(4):1093–1096. DOI: 10.1128/AAC.44.4.1093-1096.2000.
37. Sharma V., Stebe K., Murphy J. C., Tung L. Poloxamer 188 decreases susceptibility of artificial lipid membranes to electroporation. *Biophysical Journal*. 1996;71(6):3229–3241. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79516-4.
38. Evers R., Kool M., Smith A. J., van Deemter L., de Haas M., Borst P. Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport. *British Journal of Cancer*. 2000;83(3):366–374. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1260.
39. Levchenko D. N., Bergshtejn N. V., Hudyakova A. D., Nikolaeva N. M. Emulsions of oil with water and methods for their destruction. Moscow: Publishing house "Chemistry"; 1967. 200 p. (In Russ.)
40. Nevolin F. V. Chemistry and technology of synthetic detergents. Moscow: Food industry; 1964. 364 p. (In Russ.)
41. Sergeeva A. G., editor. Guidelines for the technology of obtaining and processing vegetable oils and fats. Leningrad: VNIIZH; 1973. 352 p. (In Russ.)
42. Vorob'ev A. M. Choice of formulations of detergents for skin cleansing from radioactive contamination. *Gigiena i sanitariya*. 1967;7:47–51. (In Russ.)
43. Cherkashina T. N., Pavlovskaya N. A., Moisejcev P. I. Decontamination of surfaces contaminated with thorium isotopes and its decay products. *Gigiena i sanitariya*. 1970;10:35–39. (In Russ.)
44. Dmitriev M. T., Kitrosskij N. A., Erofeeva Z. A. Ionization-chromatographic separate determination of detergents in water with preliminary pyrolysis. *Gigiena i sanitariya*. 1971;8:77–82. (In Russ.)
45. Novikov Yu. V., Dmitriev M. T., Hrustaleva V. A. Physical research methods in modern hygiene. *Gigiena i sanitariya*. 1973;6:70–74. (In Russ.)
46. Ahmadova H. H., Takaeva M. A., Musaeva M. A., Syrkin A. M. History of the development and use of demulsifiers in the production and preparation of oil for processing. *Istoriya i pedagogika estestvoznaniya*. 2015;1:27–34. (In Russ.)
47. Sitdikova S. R. Application of chemical reagents to improve oil treatment processes. [Dissertation.] Ufa; 2003. Available at: http://ogbus.ru/files/ogbus/authors/Sitdikova/Sitdikova_1.pdf. Accessed: 19.01.2023. (In Russ.)
48. Flyate D. M., editor. Problems of preservation of documentary materials. Leningrad: Science. Leningrad branch; 1977. 111 p. (In Russ.)
49. Moskvin Yu. G. Development of the process of antistatic treatment of cotton-lavsan mixtures in pneumatic spinning. [Dissertation.] Moscow; 1984. Available at: https://www.dissercat.com/content/razrabotka-protsessa-antistaticheskoi-obrabotki-khlopkolavsanovykh-smesei-v-pnevmopryadenii. Accessed: 19.01.2023. (In Russ.)
50. Mastobaev B. M., SHammazov A. M., Movsumzade E. M. Chemical means and technologies in oil pipeline transport. Moscow: Himiya; 2002. 296 p. (In Russ.)
51. Ivanickij G. R. From the history of the creation of blood substitutes. *Vestnik RAMN*. 1997;11(67):1008. (In Russ.)
52. Vorobyov S. I. Biological and physico-chemical properties of non-ionic surface-active substances. *Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal*. 2009;3(8):3–8. (In Russ.)
53. Arshinceva E. V., Pushkin S. Yu. Comparative study of acute toxicity of intravenous poloxamers in outbred rats. *Internauka: elektronnyj nauchnyj zhurnal*. 2022;13(236). (In Russ.)
54. Maevskij E. I., Kulakova G. M., Gudkova O. V., Islamov B. I. Proxanols purification method. Patent RU 2 157 241 C2. 10.10.2000. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2157241C2_20001010. Accessed: 19.01.2023. (In Russ.)
55. Topchieva I. N., Osipova S. V., Kasaikin V. A. Effect of temperature on the structure formation of block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solutions. *VMS. Seriya B*. 1990;35(5):396–398. (In Russ.)
56. Panova I. G., Gerasimov V. I., Tashlickij V. N., Topchieva I. N., Kabanov V. A. Crystalline inclusion complexes based on cyclodextrins and triblock copolymers of ethylene and propylene oxides. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A*. 1997;4(39):663–670. (In Russ.)
57. Topchieva I. N., Blyumenfel'd A. L., Klimkin A. A., Polyakov V. A., Kabanov V. A. Supramolecular structures based on block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide and cyclodextrins. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A*. 1994;2(36):271–278. (In Russ.)
58. Polyakov V. A., Kolomnikova E. L., Topchieva I. N., Kabanov V. A. NMR study of complex formation between β-cyclodextrin and block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya B*. 1993;5(35):285–288. (In Russ.)
59. Davidenko T. I. Supramolecular structures of β-cyclodextrin with surface-active substances. *VMS. Seriya A*. 2000;42(5):775–778. (In Russ.)
60. Topchieva I. N., Kalashnikov F. A., Spiridonov V. V., Zaharova Yu. A. Polymer nanotubes based on cyclodextrins. *VMS. Seriya A*. 2003;45(11):1797–1806. (In Russ.)

61. Panova I. G, Gerasimov V. I., Topchieva I. N. Structure formation in the α-cyclodextrin-polyethylene system oxide water. *VMS. Seriya B.* 1998;40(10):1681–1686. (In Russ.)
62. Topchieva I. N., Panova I. G., Spiridonov V. V., Matuhina E. V., Kurganov B. I. Estimation of the molecular weights of non-covalent columnar polymers based on β-cyclodextrin by measuring the aggregation rate of their polymeric inclusion complexes with polypropylene glycol. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Himiya.* 2010;51(5):386–392. (In Russ.)
63. Popova E. I., Topchieva I. N., Zhavoronkova E. V., Panova I. G., Matukhina E. V., Gerasimov V. I. Two kinds of inclusion complexes based on poly(propylene oxide) and β-cyclodextrin. *VMS. Seriya A.* 2002;44(1):85–90. (In Russ.)
64. Panova I. G., Matukhina E. V., Popova E. I., Gerasimov V. I., Topchieva I. N. Structural arrangement of inclusion complexes of β-cyclodextrin with poly(propylene oxide). *VMS. Seriya A.* 2001;43(7):1228–1236. (In Russ.)
65. Spiridonov V. V., Topchieva I. N., Zaharov A. N., Afanasov M. I. Method for producing heat-sensitive nanoparticles based on 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. Invention Patent RU 2578421 C1, 27.03.2016. Application № 2014134416/15 dated 25.08.2014. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2578421C1_20160327. Accessed: 19.01.2023. (In Russ.)
66. Alakhov V. Y., Moskaleva E. Y., Batrakova E. V., Kabanov A. V. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. *Bioconjugate Chemistry*. 1996;2(7):209–216.
67. Batrakova E. V., Dorodnych T. Y., Klinskii E. Y., Kliushnenkova E. N., Shemchukova O. B., Goncharova O. N., Arjakov S. A., Alakhov V. Y., Kabanov A. V. Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. *British Journal of Cancer.* 1996;74(10):1545–1552. DOI: 10.1038/bjc.1996.587.
68. Melik-Nubarov N. S., Dorodnyh T. Yu., Batrakova E. V., Kozlov M. Yu., Suzdal'ceva Yu. G., Kabanov A. V., Alahov V. Yu., Arzhakov S. A. Synthesis and biological activity of functional block copolymers based on conjugates of Pluronic P85 with doxorubicin. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A.* 1999;5(41):768–775. (In Russ.)
69. Krylova O. O., Melik-Nubarov N. S., Badun G. A., Ksenofontov A. L., Menger F. M., Yaroslavov A. A. Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation. *Chemistry.* 2003;9(16):3930-3936. DOI: 10.1002/chem.200204621.
70. Venne A., Li S., Mandeville R., Kabanov A., Alakhov V. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Research*. 1996;56(16):3626–3629.
71. Iksanova A. G., Fattahova A. N., Gabitova L. R., Malofeeva E. V., Shcherbina L. L., Salafutdinov I. I., Strel'nik A. D., Abdullin T. I., Shtyrlin Yu. G. A new system for the delivery of biologically active substances to cells based on oligoether polyol. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki.* 2010;152(3):134–142. (In Russ.)
72. Batrakova E. V., Kabanov A. V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release.* 2008;130(2):98–106. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.04.013.
73. Kabanov V., Alahov V. Yu., Sveshnikov P. G., Severin E. S. Compositions including a biological agent. Patent RUS RU98100213A. 20.05.2001. Available at: https://patents.google.com/patent/RU98100213A/ru. Accessed: 19.01.2023 (In Russ.)
74. Mel'nichenko A. A., Aksenov D. V., Panasenko O. M., Yaroslavov A. A., Sobenin I. A., Orekhov A. N. Pluronics inhibit the association of low-density lipoproteins initiating atherogenesis. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2013;11(156):574–577. (In Russ.)
75. Kabanov A., Zhu J., Alakhov V. Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. *Advances in Genetics*. 2005;53(05):231–261. DOI: 10.1016/S0065-2660(05)53009-8.
76. Nagarajan R. Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic® (PEO–PPO–PEO) block copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1999;16(1–4):55–72. DOI: 10.1016/S0927-7765(99)00061-2.
77. Cellesi F., Tirelli N., Hubbell J. A. Materials for cell encapsulation via a new tandem approach combining reverse thermal gelation and covalent crosslinking. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2002;203(10–11):1466–1472. DOI: 10.1002/1521-3935(200207)203:10/11<1466::AID-MACP1466>3.0.CO;2-P.
78. Epperson J. D., Dodge J., Rill R. L., Greenbaum N. L. Analysis of oligonucleotides and unincorporated nucleotides from in vitro transcription by capillary electrophoresis in Pluronic F127 gels. *Electrophoresis*. 2001;22(4):771–778. DOI: 10.1002/1522-2683(200102)22:4<771::AID-ELPS771>3.0.CO;2-#.
79. Schmolka I. R. Polyoxyethylene-polyoxypropylene aqueous gels. In *ACM SIGGRAPH Computer Graphics*. 1973;28(2):131–134. DOI: 10.1145/178951.178972.
80. Van Belle E., Maillard L., Rivard A., Fabre J. E., Couffinhal T., Kearney M., Branellec D., Feldman L. J., Walsh K., Isner J. M. Effects of poloxamer 407 on transfection time and percutaneous adenovirus-mediated gene transfer in native and stented vessels. *Human Gene Therapy.* 1998;9(7):1013–1024. DOI: 10.1089/hum.1998.9.7-1013.
81. Linse P., Malmsten M. Temperature-dependent micellization in aqueous block copolymer solutions. *Macromolecules.* 1992;25(20):5434–5439. DOI: 10.1021/ma00046a048.
82. Schillén K., Glatter O., Brown W. Characterization of a PEO-PPO-PEO block copolymer system. In: Laggner P., Glatter O., editors. Trends in Colloid and Interface Science VII. Berlin: Springer-Verlag. 1993. V. 93. P. 66–71. DOI: 10.1007/BFb0118476.
83. Alexandridis P., Holzwarth J. F., Hatton T. A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules.* 1994;27(9):2414–2425. DOI: 10.1021/ma00087a009.
84. Schmolka I. R. A review of block polymer surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 1977;54(3):110–116. DOI: 10.1007/BF02894385.
85. Cendejas G., Arreguín F., Castro L. V., Flores E. A., Vazquez F. Demulsifying super-heavy crude oil with bifunctionalized block copolymers. *Fuel*. 2013;103:356–363. DOI: 10.1016/j.fuel.2012.08.029.
86. Bonacucina G., Cespi M., Mencarelli G., Giorgioni G., Palmieri G. F. Thermosensitive self-assembling block copolymers as drug delivery systems. *Polymers.* 2011;3(2):779–811. DOI: 10.3390/polym3020779.
87. Lundsted L. G., Wyandotte Chemicals Corp. Polyoxyalkylene compounds. Patent CA540357A. 1957-04-30. Available at: https://patents.google.com/patent/CA540357A/en. Accessed: 19.01.2023 (In French).
88. Zhang Z., Xu G. Y., Wang F., Dong S. L., Li Y. M. Characterization and demulsification of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2004;277(2):464–470. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.04.035.
89. Budkina O. A. Structural and functional patterns of the impact of amphiphilic block copolymers on cancer cells. [Dissertation.] Moscow. 2015. 25 p. (In Russ.)
90. Emanuele M., Balasubramaniam B. Differential Effects of Commercial-Grade and Purified Poloxamer 188 on Renal Function. *Drugs in R&D.* 2014;14(2):73–83. DOI: 10.1007/s40268-014-0041-0.
91. Clair J. St. Rotating electrostatic propulsion system. Patent US20030209637A1. 13.11.2003. Available at: https://patents.google.com/patent/US20030209637A1/en. Accessed: 19.01.2023.
92. Kim M., Haman K. J., Houang E. M., Zhang W., Yannopoulos D., Metzger J. M., Bates F. S., Hackel B. J. PEO-PPO Diblock Copolymers Protect Myoblasts from Hypo-Osmotic Stress In Vitro Dependent on Copolymer Size, Composition, and Architecture. *Biomacromolecules.* 2017;18(7):2090–2101. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b00419.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1510
УДК 615.457

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка глазных пленок на основе импортозамещенного полоксамера эмуксол-268

Е. О. Бахрушина, А. Р. Тураева✉, Д. Р. Жалялова, Д. А. Климов, Н. Б. Демина, И. И. Краснюк

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

✉ **Контактное лицо:** Тураева Анастасия Романовна. **E-mail:** turaevanastasia@yandex.ru

ORCID: Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; А. Р. Тураева – https://orcid.org/0000-0003-0707-4574;
Д. Р. Жалялова – https://orcid.org/0009-0005-7519-3876; Д. А. Климов – https://orcid.org/0009-0005-3496-4873;
Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; И. И. Краснюк – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Статья поступила: 03.07.2023 **Статья принята в печать:** 22.01.2024 **Статья опубликована:** 26.01.2024

Резюме

Введение. Эмуксол-268 (АО «НИОПИК», Россия) является отечественным блок-сополимером, по физико-химическим и биологическим свойствам близким к полоксамеру Kolliphor® P 188 (Pluronic F68) производства компании BASF. Однако сравнение технологических свойств данных полимеров для оценки перспектив введения их в лекарственные формы до этого не проводилось.

Цель. Целью исследования было на примере разработки глазной лекарственной пленки продемонстрировать взаимозаменяемость вспомогательных компонентов путем сравнения результатов тестирования лекарственной формы по таким параметрам качества, как эластичность, толщина, мукоадгезия, pH, время биодеградации, тест на определение раздражимости (тест хориоаллантоисной мембраны куриного яйца, HET-CAM-тест).

Материалы и методы. В эксперименте использовали полоксамеры эмуксол-268 (АО «НИОПИК», Россия) и Kolliphor® P 188 (BASF, Германия), гидроксиэтилцеллюлозу (Natrosol™ 250 HHX, Ashland Global Holdings Inc., США) и глицерин (ООО «Тульская фармфабрика», Россия). В качестве скрининговых методов для выявления примуществ композиции использовали тестирование по таким показателям, как эластичность, толщина, мукоадгезия, pH, время биодеградации, раздражимость (HET-CAM-тест).

Результаты и обсуждение. Результаты эксперимента доказали, что использование отечественного аналога позволяет создать глазную пленку с улучшенными параметрами качества. Разница показателя эластичности пленок отличается в 1,3 раза, мукоадгезии – в 1,7 раза, времени биодеградации – в 2,5 раза, в связи с чем можно предположить, что пленка на основе отечественного полимера в большей мере способствует увеличению времени контакта с поверхностью глаза, тем самым обеспечивая длительный контакт лекарственной формы и улучшение ее биодоступности. Полученные результаты могут быть обусловлены разницей средней молекулярной массы гидрофобной полиоксипропиленовой части, которая для эмуксола-268 составляет 2600 Да, а для Kolliphor P188 – 1800 Да. Метод HET-CAM продемонстрировал одинаковые результаты для двух композиций, оба состава не обладают раздражающим эффектом.

Заключение. Подводя итоги, можно сделать вывод, что доступный на российском фармацевтическом рынке единственный аналог Kolliphor® P188 эмуксол-268 компании АО «НИОПИК» является перспективным веществом для замены в разработке офтальмологических лекарственных форм. Несмотря на отличия отечественного блок-сополимера по физико-химическим свойствам от заменяемого полоксамера 188, его введение в состав плацебо-пленок давало улучшенные результаты по показателям качества, что было выявлено в ходе биофармацевтического анализа.

Ключевые слова: полоксамер, эмуксол-268, Kolliphor® P 188, глазная пленка, хориоаллантоисная мембрана

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

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина, А. Р. Тураева, Н. Б. Демина, И. И. Краснюк разработали концепцию и методологию исследования. Е. О. Бахрушина, А. Р. Тураева, Д. А. Климов и Д. Р. Жалялова занимались сбором и анализом литературных данных. А. Р. Тураева, Д. Р. Жалялова участвовали в написании текста статьи. Е. О. Бахрушина, Д. Р. Жалялова, Д. А. Климов занимались обработкой данных. И. И. Краснюк и Н. Б. Демина руководили работой. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Члены коллектива выражают благодарность компании АО «НИОПИК», Россия, за предоставление образца эмуксола-268.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Тураева А. Р., Жалялова Д. Р., Климов Д. А., Демина Н. Б., Краснюк И. И. Разработка глазных пленок на основе импортозамещенного полоксамера эмуксол-268. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):69–73. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1510

Development of Ocular Inserts Based on Import Substituted Poloxamer Emuxol 268

Elena O. Bakhrushina, Anastasia R. Turaeva✉, Diana R. Zhalyalova, Daniil A. Klimov, Natalia B. Demina, Ivan I. Krasnuk

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:** Anastasia R. Turaeva. **E-mail:** turaevanastasia@yandex.ru

ORCID: Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; Anastasia R. Turaeva – https://orcid.org/0000-0003-0707-4574;
Diana R. Zhalyalova – https://orcid.org/0009-0005-7519-3876; Daniil A. Klimov – https://orcid.org/0009-0005-3496-4873;
Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Ivan I. Krasnuk – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Received: 03.07.2023 **Revised:** 22.01.2024 **Published:** 26.01.2024

© Бахрушина Е. О., Тураева А. Р., Жалялова Д. Р., Климов Д. А., Демина Н. Б., Краснюк И. И., 2024
© Bakhrushina E. O., Turaeva A. R., Zhalyalova D. R., Klimov D. A., Demina N. B., Krasnuk I. I., 2024

Abstract
Introduction. Emuxol-268 (JSC "NIOPIK", Russia) is a block copolymer produced in Russia with similar in physicochemical and biological properties to poloxamer Kolliphor® P 188 (Pluronic F68) manufactured by BASF, USA. However, a comparison of the properties of natural polymers to assess the prospects of their dosage forms has not been carried out before.
Aim. The aim of the study was to demonstrate the interchangeability of auxiliary components using the example of the development of an ophthalmic drug insert by comparing the results of testing the dosage form in terms of such quality parameters as elasticity, thickness, mucoadhesion, pH, biodegradation time and irritation test (hen's egg-chorioallantoic membrane test, HET-CAM test).
Materials and methods. Poloxamers Emuxol 268 (JSC "NIOPIK", Russia) and Kolliphor® P 188 (BASF, Germany), hydroxyethyl cellulose (Natrosol™ 250 HHX, Ashland Global Holdings Inc., USA), and glycerol (LLC "Tulskaya Pharmfabrika", Russia) were used in the experiment. Elasticity, thickness, mucoadhesion, pH, biodegradation time, HET-CAM test were used as screening methods to identify the benefits of the composition.
Results and discussion. Experiment results proved that the use of a domestic analogue makes it possible to create an ocular insert with improved quality parameters. The difference in the elasticity index of the inserts differs by 1.3 times, mucoadhesion – 1.7 times, biodegradation time – 2.5 times. In this connection, it can be assumed that an insert based on a domestic polymer contributes to an increase in the time of contact with the eye surface, thereby providing a prolonged effect of the drug and improving its bioavailability. The results obtained may be due to the difference in the average molecular weight of the hydrophobic polyoxypropylene part, which is 2600 Da for Emuxol 268 and 1800 Da for Kolliphor 188. The HET-CAM method showed the same results of the two compositions, both compositions do not have an irritating effect.
Conclusion. Summing up, the only analogue of Kolliphor® P 188 available on the Russian pharmaceutical market – Emuxol-268 of JSC NIOPIK is a promising substance for replacement in the development of ophthalmic dosage forms. Despite the differences in physicochemical properties of the domestic block copolymer in comparison with the replaced poloxamer 188, its introduction into placebo inserts gave improved results in terms of quality indicators, which was revealed during a biopharmaceutical analysis.

Keywords: poloxamer, emuxol 268, Kolliphor® P 188, ocular insert, chorioallantoic membrane

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

Contribution of the authors. Elena O. Bakhrushina, Anastasia R. Turaeva, Natalia B. Demina, Ivan I. Krasnyuk developed the concept and methodology of the study. Elena O. Bakhrushina, Anastasia R. Turaeva, Daniil A. Klimov and Diana R. Zhalyalova collected and analyzed literature data. Anastasia R. Turaeva, Diana R. Zhalyalova participated in writing the text of the article. Elena O. Bakhrushina, Diana R. Zhalyalova, Daniil A. Klimov were engaged in data processing. Ivan I. Krasnyuk and Natalia B. Demina led the work. All authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The team members express their gratitude to the company JSC "NIOPIK", Russia, for providing a sample of emuxol-268.

For citation: Bakhrushina E. O., Turaeva A. R., Zhalyalova D. R., Klimov D. A., Demina N. B., Krasnuk I. I. Development of ocular inserts based on import substituted poloxamer emuxol 268. *Drug development & registration*. 2024;13(1):69–73. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1510

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время полоксамеры являются перспективными синтетическими полимерами, широко применяемыми в фармацевтической разработке и технологии производства различных лекарственных форм [1]. Впервые они были синтезированы немецким химическим концерном BASF [2], который и на сегодняшний день осуществляет серийное производство сополимеров под торговым наименованием Pluronic®/Kolliphor®/Lutrol®, также присутствуют вспомогательные вещества компаний Croda (Synperonic®), Solvay (Antarox®), Merck KGaA (Parteck®) и многие другие [2]. Однако еще в конце 1950-х годов в СССР полоксамеры были известны и широко использовались в нефтеперерабатывающей и легкой промышленности [3]. Промышленное производство в СССР было налажено в 1978 году заводом «Оргсинтез», где полимеры выпускались под торговой маркой Проксанол® (в настоящее время – Эмуксол®, АО «НИОПИК») [4].

По химическому строению полоксамеры представляют собой триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полипропиленоксида (ППО) с двумя гидрофильными цепями полиэтиленоксида (ПЭО), что обуславливает их амфифильные свойства и проявление поверхностной активности. Большинство полоксамеров, использующихся в фармацевтике, кроме Poloxamer 124, являются твердыми веществами и представляют собой мелкодисперсный гранулированный порошок, от белого до слегка желтоватого цвета, воскообразной консистенции, не имеющий вкуса и запаха, pH 10%-х растворов которого находится в диапазоне 5,0–7,5. В фармацевтической разработке данные полимеры активно используются в качестве эмульгаторов, солюбилизирующих, смачивающих и диспергирующих агентов, усилителей абсорбции, а также гелеобразователей и загустителей [2, 5, 6].

Полоксамер 188 (КР188) представляет собой неионный и биосовместимый линейный сополимер, состоящий из двух блоков с 38 фрагментами ПЭО и центрального блока с 29 фрагментами ППО. Число гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) молекулы составляет 29, а масса – приблизительно 8400 дальтон (Да). Этот полимер также известен под названиями Pluronic F68 и Kolliphor® P 188 (BASF) [7].

В последнее время активно ведется исследование применения полоксамеров в системах контролируемой доставки офтальмологических лекарственных препаратов [8]. В технологии глазных лекарственных пленок (ГЛП) полоксамеры, в частности Kolliphor® P 188, могут использоваться в качестве опционального вспомогательного компонента, повышающего адгезию пленки к эпителию слизистой оболочки конъюктивы и способствующего увеличению проникновения через нее активных веществ [9]. Данные свойства обуславливаются способностью полоксамера образовывать мицеллы с мукопротеидами слезной пленки глазного яблока, что обеспечивает повышение биодоступности лекарственного препарата и пролонгирование его эффекта [6].

В условиях ограничений по экспорту эксципиентов использование продукции компании BASF в разрабатываемых препаратах является затруднительным. В качестве альтернативой замены Kolliphor® P 188 на российском фармацевтическом рынке могут быть рассмотрены оксиалкилированные продукты компании АО «НИОПИК», а именно эмуксол-268 (Эм268). Он представляет собой блок-сополимер окиси этилена и окиси пропилена, то есть по химическому строению является аналогом ингредиентов, описанных под международным непатентованным названием «полоксамеры». Сравнение физико-химических свойств двух полимеров выявило, что эмуксол-268 по молекулярной массе и некоторым другим показателям, а именно цветности раствора, внешнему виду и pH, отличается от Kolliphor® P 188 и не является идентичным ему [7]. Таким образом, для оценки взаимозаменяемости данных фармацевтических субстанций необходимо проведение скрининга полученных в ходе разработки образцов лекарственных средств по показателям качества.

Цель работы. Целью исследования является проведение сравнительного анализа биофармацевтических параметров глазных лекарственных пленок, изготовленных с использованием блок-сополимера этиленоксида и пропиленоксида Kolliphor® P 188 и эмуксола-268, и разработка ГЛП на основе импортозамещенного полимера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве пленкообразующего полимера, необходимого для создания основы биодеградируемой глазной пленки, в эксперименте была использована гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ) Natrosol™ 250 HHX (Ashland Global Holdings Inc., США). Для придания полимерной основе пластичности, эластичности и износостойкости в состав вводился пластификатор глицерин (ГЛИ) (ООО «Тульская фармфабрика», Россия). Также в основу были добавлены полоксамеры Kolliphor® P 188 (КР188) компании BASF и эмуксол-268 (Эм268), предоставленный компанией АО «НИОПИК» (Россия). Составы разработанных ранее пленок [6] представлены в таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальные составы полимерных основ глазных пленок

Table 1. Experimental compositions of ocular inserts bases

№	Содержание компонентов, г Components content, g				
	ГЭЦ[1] HEC[1]	ГЛИ[2] GLY[2]	КР188[3]	Эм268[4] Em268[4]	Вода очищенная Purified water
1	0,2	0,8	0,2	–	до 40,0 ad 40,0
2	0,2	0,8	–	0,2	до 40,0 ad 40,0

Примечание. [1] Гидроксиэтилцеллюлоза.
[2] Глицерин.
[3] Kolliphor® P 188.
[4] Эмуксол-268.

Note. [1] Hydroxyethylcellulose.
[2] Glycerin.
[3] Kolliphor® P 188.
[4] Emuxol 268.

Жидкая полимерная основа была изготовлена путем диспергирования и растворения компонентов в воде очищенной в стеклянном химическом стакане с помощью магнитной мешалки IKA C-MAG HS 7 digital (IKA, Германия) при нагревании. Полученные растворы в объеме 40 мл помещали в стерильную чашу Петри (ТУ 9398-046-00480230-2005, АО «Фирма Медполимер», Россия), предварительно смазанную небольшим количеством глицерина. Сушка пленочной массы проводилась в вакуумной сушилке (НЕТО CT/DW 60 E, Jouan, Gydevang, Дания) в течение 24 часов. Параметрами для скрининга, отвечающими за качество ГЛП, были выбраны следующие показатели: описание, толщина, эластичность, мукоадгезия, время биодеградации и значение pH.

Показатель «описание» в соответствии с Государственной фармакопеей XIV издания определяли путем визуальной оценки. При этом отмечался цвет, текстура, прозрачность, липкость, пластичность и эластичность глазной лекарственной пленки.

Определение толщины проводили с использованием микрометра (Harden, Китай) на поверхности пленки без деформаций. Измерение показателя осуществлялось в пяти разных точках ГЛП, после чего высчитывали среднее арифметическое значение.

Параметр эластичности выражался в виде силы (Н), которую необходимо приложить к пленке с определенной площадью поверхности для ее деформации. Для определения данного показателя образцы размером 2 × 5 см фиксировали на штативе, при этом к нижней части экспозиции прикреплялась корзинка, в которую постепенно добавляли груз. Испытания проводились до тех пор, пока ГЛП полностью не деформируется, – до момента растяжения основы, когда между концами ширина пленки становится менее 2 см, – или корзинка не упадет вместе с пленкой, далее взвешивали корзинку с количеством груза на электронных весах [11].

Мукоадгезию изучали по методике определения силы адгезии *in vitro*, описанной в работе [10]. В ходе эксперимента был использован муцин свиного желудка II типа (SIGMA, Sigma-Aldrich, USA), из которого при тщательном перемешивании с водой в соотношении 1:5 до однородного состояния получали 20%-й раствор муцина. Полученный раствор наносился на нижнюю, неподвижную, часть рычажного механизма, заранее обернутую спанбондом с помощью скотча. К верхней, подвижной, части на нетканном материале прикрепляли образец плацебо-пленки размером 2 × 5 см, так же фиксируя систему скотчем. На расположенную в противоположной стороне чашу рычажного механизма постепенно добавляли груз до тех пор, пока ГЛП не оторвется от пропитанной муцином поверхности. Таким образом, силу адгезии определяли в виде нагрузки, которую выдержит мукоадгезивная система в эксперименте на отрыв.

Для определения времени биодеградации пленки размером 1 × 1 см помещали в химический стакан, содержащий свежеприготовленный раствор, имитирующий искусственную слезу (NaCl 0,67 г, $NaHCO_3$ 0,20 г, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 0,008 г, воды очищенной до 100 г). Затем стакан размещали в сушильном шкафу Binder FD 53 (BINDER GmbH, Германия) при температуре 37 °С и засекали время, в течение которого образец полностью растворится. Полученный после биодеградации пленки раствор анализировали по показателю pH с использованием pH-метра Starter 2100 (OHAUS, США).

Для определения раздражающего действия тестируемых составов был проведен тест на хориоаллантоисной мембране, результат которого демонстрирует моментальное наличие и степень раздражения при контакте ГЛП с мембраной [12]. Сущность теста заключается в том, что оплодотворенные куриные яйца массой 50,0–60,0 г без дефектов инкубируют при температуре (37 ± 0,5) °С в течение 3 суток, периодически переворачивая, после чего в экваториальном положении на скорлупе делают отверстие 2 × 2 см таким образом, чтобы была видна хориоаллантоисная мембрана, на которую помещают готовую ГЛП. После экспозиции в течение 5 минут состояние хориоаллантоисной мембраны оценивают по изменению цвета (изменился или нет) по сравнению с контролем и наличию кровоизлияния.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При визуальной оценке образцов было установлено, что образцы пленок отличаются по цвету и прозрачности: ГЛП с КР188 – бесцветная и прозрачная, с Эм268 – мутная и беловатая. Однако по тактильным ощущениям обе пленки были абсолютно идентичны: пластичные, эластичные, липкие и гладкие.

По результатам биофармацевтического анализа было выявлено, что все образцы соответствуют требованиям Фармакопеи Евразийского экономического союза, предъявляемым к параметрам толщины и значению pH для глазных лекарственных форм. Особое внимание при оценке взаимозаменяемости полоксамеров было уделено таким показателям, как эластичность, мукоадгезия и время биодеградации. Исходя из данных, представленных в таблице 2, можно отметить, что по всем трем основным характеристикам пленки на Эм268 показывают улучшенные результаты по сравнению с образцами на КР188.

Таблица 2. Сравнение биофармацевтических параметров ГЛП с КР188 и Эм268 (*n* = 5)

Table 2. Biopharmaceutical parameters comparison for ocular inserts with Kolliphor P188 and Emuxol 268 (*n* = 5)

Показатели качества Quality parametrs	**Состав 1** Composition 1	**Состав 2** Composition 2
Толщина, мм Thickness, mm	0,216 ± 0,020	0,215 ± 0,019
Эластичность, мПа Elasticity, mPa	0,316 ± 0,029	0,406 ± 0,037
Мукоадгезия, Н Mucoadhesion, N	3,96 ± 0,08	6,75 ± 0,14
Время биодеградации, мин Biodegradation time, min	12 ± 0,24	30 ± 0,6
pH	7,1 ± 0,14	7,8 ± 0,16

Показатель эластичности пленок разнится примерно в 1,3 раза, мукоадгезии – в 1,7 раза, времени биодеградации – в 2,5 раза. Таким образом, можно предположить, что ГЛП на основе отечественного полимера в большей мере способствует увеличению времени контакта с поверхностью глаза, тем самым обеспечивая длительный контакт лекарственной формы и улучшение ее биодоступности. Полученные результаты могут быть обусловлены разницей средней молекулярной массы гидрофобной полиоксипропиленовой части, которая для Эм268 составляет 2600 Да, а для КР188 – 1800 Да.

В дополнение к вышеупомянутым параметрам результаты теста на хориоаллантоисной мембране (HET-CAM-тест) представлены на рисунке 1, что доказывает равнозначность отсутствия раздражающего эффекта у двух составов.

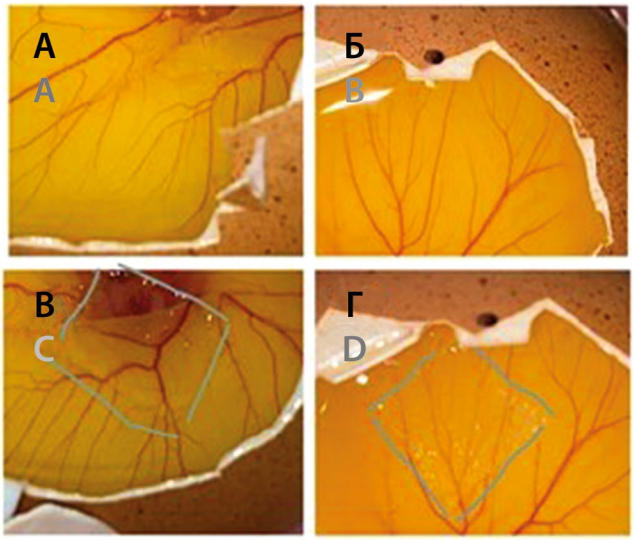


Рисунок 1. Результаты HET-CAM-теста:

А, Б – хориоаллантоисная мембрана до помещения образца; В – хориоаллантоисная мембрана после экспозиции состава 1; Г – хориоаллантоисная мембрана после экспозиции состава 2

Figure 1. HET-CAM test results:

A, B – chorioallantoic membrane beforeplacing the sample; C – chorioallantoic membrane after exposure to composition 1; D – chorioallantoic membrane after exposure to composition 2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На российском фармацевтическом рынке на данный момент представлен один аналог Kolliphor® P 188 – эмуксол-268 компании АО «НИОПИК». Несмотря на то, что отечественный блок-сополимер по физико-химическим свойствам не является полностью идентичным заменяемому полоксамеру 188, его введение в состав плацебо-пленок давало улучшенные результаты по показателям качества, что было выявлено в ходе биофармацевтического анализа. Также результаты HET-CAM-теста продемонстрировали отсутствие раздражающего эффекта обоих составов. Таким образом, эмуксол-268 имеет широкие перспективы в технологии лекарственных форм.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bareford L., Peng H., Ali A., Kolwyck D., Dickens J. Development of a rapid and reliable analytical method for screening poloxamer 188 for use in cell culture process. *Biotechnology Progress*. 2019;35(3):e2792. DOI: 10.1002/btpr.2792.
2. Zarrintaj P., Ramsey J. D., Samadi A., Atoufi Z., Yazdi K. M., Ganjali R. M., Amirabad M. L., Zangene E., Farokhi M., Formela K., Reza S. M., Mozafari M., Sabu Thomas S. Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta biomaterialia*. 2020;110(1):37–67. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.04.028.
3. Bakhrushina E. O., Shumkova M. M., Sergienko F. S., Novozhilova E. V., Demina N. B. Spray Film-Forming systems as promising topical in situ Systems: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(1):154–169. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.11.014
4. Meerovich I. G., Sanarova E. V., Meerovich G. A., Derkacheva V. M., Volkov K. A., Negrimovsky V. M., Vorozhtsov G. N. Near-infrared photosensitizers based on nanostructured forms of phthalocyanine derivatives. *Russian Journal of General Chemistry*. 2015;85:280–288. DOI: 10.1134/S1070363215010430.
5. Chen W. N., Shaikh M. F., Bhuvanendran S., Ansari M. T., Radhakrishnan A. K., Othman I. Poloxamer 188 (P188), A potential polymeric protective agent for central nervous system disorders: a systematic review. *Current neuropharmacology*. 2022;20(4):799–808. DOI: 10.2174/1570159X19666210528155801.
6. Turaeva A. R., Bakhrushina E. O., Krasnyuk I. I. Study of the effect of excipients on the biopharmaceutical parameters of the dosage form "Ocular insert". *Medico-pharmaceutical journal "Puls"*. 2022;24(7):33–39. (In Russ.)
7. Arshintseva E. V., Pushkin S. Yu. Comparative study of the acute toxicity of intravenous poloxamers in outbred rats. *Internauka*. 2022;13–1(236):50–55. (In Russ.)
8. Wang X., Gu Y., He Y., Sang L., Dai Y., Wang D. Preparation and optimization formulation of zedoary turmeric oil nanoemulsion based thermo-sensitive gel for improved application in ophthalmology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;65:102682. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102682.
9. Rajput A., Sharma P., Sharma R., Thakur S. Novel Topical Drug Delivery Systems in Ophthalmic Applications. *Dosage Forms*. 2022;1:1–20. DOI: 10.5772/intechopen.108915.
10. Bakhrushina E., Anurova M., Demina N., Kashperko A., Rastopchina O., Bardakov A., Krasnyuk I. Comparative study of the mucoadhesive properties of polymers for pharmaceutical use. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2020;8(A):639–645. DOI: 10.3889/oamjms.2020.4930.
11. Turaeva A. R., Bakhrushina E. O., Demina, N. B., Krasnyuk I. I. Selection and justification of drying in ocular insert development. *Problems of Biological Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2023;26(6):10–16. DOI: 10.29296/25877313-2023-06-02.
12. Viera L. M. A., Silva R. S., Silva C., Presgrave O., Boas M. Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. *Toxicology in Vitro*. 2022;78:105255. DOI: 10.1016/j.tiv.2021.105255.

gotoipheb.ru | +7 965 772 7791

IPhEB

Международная выставка и форум по фармацевтике и биотехнологиям

2–4 апреля 2024 | Санкт-Петербург

Поддержка:

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА

RESEARCH

СПХФУ с 1919 года на службе науке и здоровью нации

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

Организатор:

РЕСТЭК® выставочное объединение

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1538
УДК 615.074

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Исследование динамики высвобождения дифлунизала из полимерной матрицы

П. А. Михайлова[1, 2]✉, А. А. Адамова[1, 4], Ю. Э. Генералова[1, 2], П. П. Снетков[2, 3], С. Н. Морозкина[2, 3]

[1] 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
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО». 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д. 49, лит. А
[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России). 191036, Россия, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

✉ **Контактное лицо:** Михайлова Полина Андреевна. **E-mail:** mikhaylova@scamt-itmo.ru

ORCID: П. А. Михайлова – https://orcid.org/0009-0002-3806-6585; А. А. Адамова – https://orcid.org/0009-0002-5230-8106;
Ю. Э. Генералова – https://orcid.org/0000-0002-2573-6036, П. П. Снетков – https://orcid.org/0000-0001-9949-5709;
С. Н. Морозкина – https://orcid.org/0000-0003-0122-0251.

Статья поступила: 29.08.2023 **Статья принята в печать:** 25.01.2024 **Статья опубликована:** 26.01.2024

Резюме

Введение. Клинически доказана эффективность дифлунизала при лечении амилоидоза сердца. В настоящее время в мире зарегистрированы только таблетированные формы дифлунизала, однако длительное применение НПВП приводит к характерным побочным эффектам. Поэтому сейчас активно разрабатываются системы доставки дифлунизала (в том числе формы для наружного применения), позволяющие уменьшить побочные эффекты, улучшить его биодоступность.

Цель. Изучение динамики высвобождения действующего вещества дифлунизала из полимерной матрицы гиалуроновой кислоты.

Материалы и методы. Объектами исследования являются гели дифлунизала в гиалуроновой кислоте с концентрацией основного вещества 0,093, 0,14, 0,19 и 0,25 %. Количественное определение проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографической колонки Prontosil C18,120-5, 75 × 2 мм, термостатируемой при 40 °C. Элюент: фосфатный буферный раствор с pH 3,0 и ацетонитрил (30 : 70), скорость потока 0,1 мл/мин. Детектировали элюаты на длинах волн 230, 270, 310 нм.

Результаты и обсуждение. Разработана методика определения дифлунизала в матрице гиалуроновой кислоты методом ВЭЖХ. Высвобождение действующего вещества из матриц проводили в среде фосфатного буферного раствора с pH 7,6. Исследуемая система доставки значительно увеличивает растворимость дифлунизала в водном растворе по сравнению с растворением субстанции. Степень высвобождения для всех образцов превышает 90 % через 3 часа после начала эксперимента, при этом большая часть действующего вещества высвобождается в течение часа.

Заключение. Полученные данные позволяют утверждать, что профиль высвобождения характерен для биодеградируемых матриц и диффузионно-контролируемых систем доставки. Достигнута полнота извлечения дифлунизала из ГК при использовании в качестве среды растворения ФБР с pH 7,6.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, дифлунизал, гиалуроновая кислота, полимерная матрица, высвобождение, система доставки

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

Вклад авторов. П. А. Михайлова, А. А. Адамова – написание текста статьи и осуществление эксперимента. Ю. Э. Генералова – планирование эксперимента и постановка задачи. С. Н. Морозкина и П. П. Снетков – приготовление матриц, редактирование текста статьи. Все авторы участвовали в анализе полученных данных и обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-20093). Ссылка на информацию о проекте: https://rscf.ru/en/project/21-74-20093/

Для цитирования: Михайлова П. А., Адамова А. А., Генералова Ю. Э., Снетков П. П., Морозкина С. Н. Исследование динамики высвобождения дифлунизала из полимерной матрицы. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(1):75–80. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1538

Study of the Dynamics of Diflunisal Release from a Polymer Matrix

Polina A. Mihajlova[1, 2]✉, Aleksandra A. Adamova[1, 4], Yulia E. Generalova[1, 2], Petr P. Snetkov[2, 3], Svetlana N. Morozkina[2, 3]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] ITMO University. 49A, Kronverksky prospekt, Saint-Petersburg, 197101, Russia
[3] Saint-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 2–4, Ligovsky ave., Saint-Petersburg, 191036, Russia
[4] St Petersburg University, Saint Petersburg State University, SPbU. 7–9, Universitetskaya naberezhnaya, Saint-Petersburg, 199034, Russia

✉ **Corresponding author:** Polina A. Mihajlova. **E-mail:** mikhaylova@scamt-itmo.ru

© Михайлова П. А., Адамова А. А., Генералова Ю. Э., Снетков П. П., Морозкина С. Н., 2024
© Mihajlova P. A., Adamova A. A., Generalova Yu. E., Snetkov P. P., Morozkina S. N., 2024

ORCID: Polina A. Mihajlova – https://orcid.org/0009-0002-3806-6585; Aleksandra A. Adamova – https://orcid.org/0009-0002-5230-8106;
Yulia E. Generalova – https://orcid.org/0000-0002-2573-6036, Petr P. Snetkov – https://orcid.org/0000-0001-9949-5709;
Svetlana N. Morozkina – https://orcid.org/0000-0003-0122-0251.

Received: 29.08.2023 **Revised:** 25.01.2024 **Published:** 26.01.2024

Abstract

Introduction. The effectiveness of diflunisal in the treatment of cardiac amyloidosis has been clinically proven. Currently, only tablet forms of diflunisal are registered in the world, however, long-term use of NSAIDs leads to characteristic side effects. Therefore, delivery systems for diflunisal (including a form for external use) are now being actively developed to reduce side effects and improve its bioavailability.

Aim. Research of the dynamics of release of the active substance diflunisal from the polymer matrix of hyaluronic acid.

Materials and methods. The objects of the study are diflunisal gels in hyaluronic acid with a concentration of the main substance of 0.093, 0.14, 0.19 and 0.25 %. Quantitative determination was carried out by reverse-phase HPLC using a Prontosil C18, 120-5, 75 × 2 mm chromatographic column, thermostatically controlled at 40 °C. Eluent: phosphate buffer solution (PBS) with pH 3.0 and acetonitrile (30 : 70), flow rate 0.1 ml/min. Eluates were detected at wavelengths of 230, 270, 310 nm.

Results and discussion. During the work, a method (HPLC) was selected and a method for determining diflunisal in a HA matrix was developed. The delivery system under study significantly increases the solubility of diflunisal in an aqueous solution compared to the dissolution of the substance. The release of the active substance from the matrices was carried out in a phosphate buffer solution with pH 7.6. The release rate for all samples exceeded 90 % after 3 hours after the start of the experiment, with most of the active substance released within an hour.

Conclusion. The data obtained suggest that the release profile is characteristic of biodegradable matrices and diffusion-controlled delivery systems. Complete extraction of diflunisal from HA was achieved using PBS with pH 7.6 as a dissolution medium.

Keywords: high performance liquid chromatography, diflunisal, hyaluronic acid, polymer matrix, release, delivery system

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. Polina A. Mihajlova, Aleksandra A. Adamova – writing the text of the article and conducting an experiment. Yulia E. Generalova – statement of the problem and planning an experiment. Svetlana N. Morozkina, Petr P. Snetkov – preparation of matrices, article text editing. All authors participated in the analysis of the obtained data and discussion of the results.

Funding. The work was completed by the grant of the Russian Science Foundation (project № 21-74-20093). Link to project information: https://rscf.ru/en/project/21-74-20093/

For citation: Mihajlova P. A., Adamova A. A., Generalova Yu. E., Snetkov P. P., Morozkina S. N. Study of the dynamics of diflunisal release from a polymer matrix. *Drug development & registration*. 2024;13(1):75–80. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1538

ВВЕДЕНИЕ

Одним из развивающихся направлений фармацевтической науки является создание и исследование систем доставки лекарственного препарата – способа контролируемого введения медикамента в организм пациента, при котором повышается его эффективность, безопасность, точность дозирования, селективность, улучшаются фармакокинетика и фармакодинамика. Использование систем доставки особенно оправданно при терапии тяжелых орфанных заболеваний, к которым относится транстиретиновая семейная амилоидная полинейропатия (ТСАП). ТСАП является генетическим системным заболеванием, возникающим вследствие мутации гена транстиретина.

Дифлунизал (рисунок 1) – нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП), производное салициловой кислоты с анальгетическим и противовоспалительным действием. Рекомендован к применению при легкой и умеренной боли, остеоартрите, ревматоидном артрите, воспалении, является потенциальным препаратом для лечения ТСАП I и

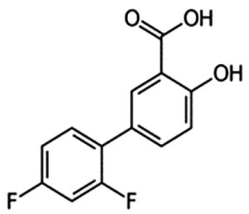


Рисунок 1. Структурная формула дифлунизала

Figure 1. Structural formula of diflunisal

II стадии [1]. В последние годы дифлунизал привлек внимание благодаря доказательствам его эффективности при лечении амилоидоза сердца, что было подтверждено в клинических исследованиях [2–4]. В нерандомизированном исследовании было продемонстрировано, что дифлунизал обеспечивает лучшую выживаемость пациентов по сравнению с клинически одобренным тафамидисом [5].

В настоящее время в мире зарегистрированы только таблетированные формы дифлунизала (Долобид®). Однако длительное применение НПВП приво-

дит к почечной дисфункции, желудочно-кишечным кровотечениям, образованию язв и другим характерным нежелательным лекарственным реакциям. Поэтому сейчас активно разрабатываются новые системы доставки дифлунизала, позволяющие уменьшить побочные эффекты, повысить его стабильность, улучшить биодоступность. Например, описана технология получения твердых липидных наночастиц для локального или кожного применения [6], изготовлены стабильные многослойные полимерные наночастицы методом послойной сборки [7], разработаны гидрогели состава хитозан – поливиниловый спирт без токсичных сшивающих агентов методом замораживания – оттаивания [8], получены циклодекстриновые комплексы дифлунизала на основе β-циклодекстрина или гидроксипропил-β-циклодекстрина [9], изучены комплексы с блок-сополимерами поли(этиленгликоля) и поли(ε-капролактона) [10]. Также для повышения растворимости дифлунизала в воде и его пролонгированного высвобождения в одном из исследований были использованы полиамидоаминовые дендримеры, сшитые с тиолированным полиэтиленгликолем, для образования гидрогеля [11].

Одним из вариантов систем доставки являются системы с диффузионно-контролируемым высвобождением. Активно в качестве матриц применяются биодеградируемые полимеры, такие как гиалуроновая кислота (ГК). ГК действует как мукоадгезив, удерживая лекарство в определенном месте действия/всасывания. Полимерная матрица также может изменять *in vivo* скорость высвобождения и всасывания терапевтического агента и способна локализовать доставку лекарственного средства в эпидермис [12]. Кроме того, ГК сама может оказывать противовоспалительное [13] действие посредством множества механизмов, включающих рецепторы, ферменты и другие метаболические пути [14]. Авторами [15] была предложена система доставки дифлунизала в полимерной матрице гиалуроновой кислоты, которая стала объектом данного исследования.

Научные статьи и материалы, в которых проводится исследование высвобождения дифлунизала из матриц, представлены достаточно ограниченно [7, 9, 16, 17]. В большинстве таких исследований высвобождение дифлунизала рассматривают в средах со значениями pH, близкими к нейтральным [7, 9, 18]. Процесс высвобождения непосредственно дифлунизала из матрицы ГК описан ранее не был, а потому требуется исследование его свойств и характеристик. Кроме того, дифлунизал характеризуется низкой растворимостью в нейтральных и кислых водных средах (14,5 мг/л по данным PubChem), предположительно, использование системы доставки позволит увеличить его растворимость, а следовательно, биодоступность. Таким образом, важность использования дифлунизала и известные ограничения его применения заставили разработать новые системы доставки дифлунизала, позволяющие уменьшить побочные эффекты, повысить его стабильность, а также улучшить его фармакокинетический профиль и биораспределение.

Целью исследования является изучение динамики высвобождения активной фармацевтической субстанции дифлунизала из полимерной матрицы ГК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись гели дифлунизала следующего состава: 5 мл дистиллированной воды, 5 мл диметилсульфоксида (ДМСО), 190 мг ГК и 10 (15, 20 или 25) мг дифлунизала, что соответствует 0,093 (0,14, 0,19 или 0,25) % [15]. В работе использовали стандартный образец дифлунизала (Diflunisal, analytical standard). Количественное определение проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Милихром-А02» (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия).

Стандартные растворы дифлунизала. 10,0 мг дифлунизала (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в этиловом спирте 95%-м с использованием УЗ-бани и доводили раствор до метки этиловым спиртом 95%-м (исходный раствор). Исходный раствор разбавляли до требуемой концентрации дистиллированной водой.

Процедура процесса высвобождения дифлунизала из геля. К 100 мг (точная навеска) геля любой дозировки добавляли 10,0 мл фосфатного буферного раствора (ФБР), растворы оставляли для высвобождения действующего вещества. Пробы отбирали сразу после добавления буфера, через 30, 60, 120 и 180 мин, фильтровали (через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм) и анализировали. Степень высвобождения рассчитывали относительно заявленной концентрации действующего вещества в геле.

Количественное определение дифлунизала проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографической колонки Prontosil 120-5, C18, 75 × 2 мм (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия), термостатируемой при 40 °C. Элюент: фосфатный буферный раствор (ФБР) с pH 3,0 и ацетонитрил (30 : 70), скорость потока 0,1 мл/мин, изократический режим элюирования. Детектировали элюаты на длинах волн 230, 270, 310 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор метода анализа

Несмотря на то, что гель содержит только одно действующее вещество, применение простого метода УФ-спектрометрии невозможно. В УФ-спектре подкисленного раствора дифлунизала наблюдается 3 максимума поглощения – 205, 228 и 314 нм (ε = 17514, 14812, 2302 л/моль · см соответственно). Согласно данным литературы, максимум светопогло-

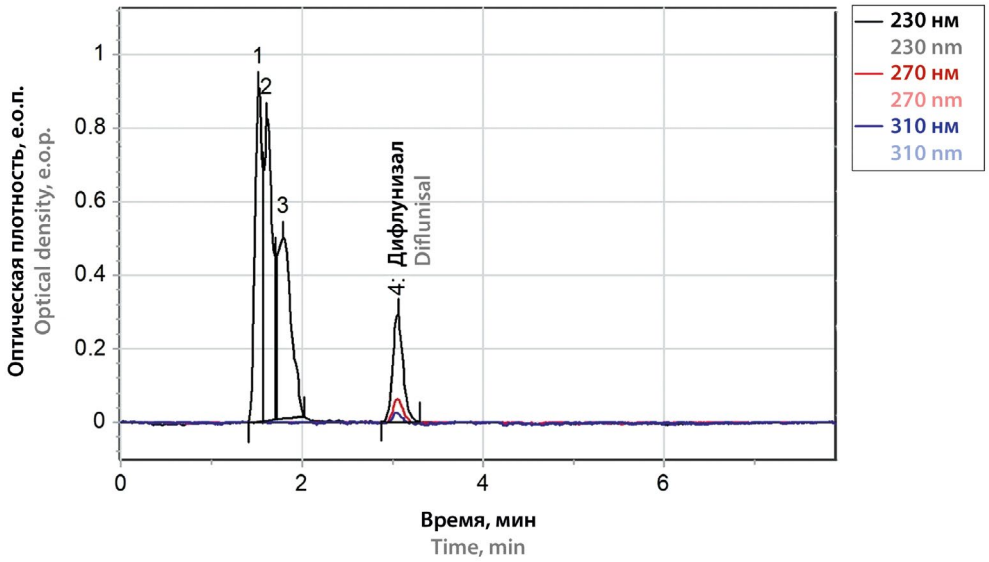


Рисунок 2. Хроматограмма раствора геля дифлунизала (пики 1–3 – матрица, пик 4 – дифлунизал)

Figure 2. Chromatogram of diflunisal gel solution (peaks 1–3 – matrix, peak 4 – diflunisal)

щения ГК наблюдается при 230 нм [19], ДМСО – при 210 нм[1]. ГК и ДМСО имеют собственные широкие полосы поглощения (за счет большого содержания по сравнению с содержанием действующего вещества) в УФ-области спектра, которые перекрывают спектр дифлунизала в ФБР, что делает невозможным его количественное определение. Поэтому количество дифлунизала, высвободившегося из матрицы, определяли методом ВЭЖХ.

Оптимизация хроматографических условий

Ранее были выбраны хроматографические условия [20] для количественного определения дифлунизала (выбор условий проводили с использованием стандартного образца дифлунизала), наилучшие результаты были достигнуты при использовании 0,03%-го раствора трифторуксусной кислоты (ТФУК). При апробации этих условий в процессе растворения гелей в буферных растворах было показано, что буферной емкости ТФУК недостаточно для подавления влияния растворителя в пробе, из-за чего пик дифлунизала переставал удерживаться на сорбенте. Поэтому в качестве подвижной фазы выбрали ФБР с pH 3,0, вторым компонентом подвижной фазы был ацетонитрил, оптимальное соотношение элюентов 30:70. Типичная хроматограмма раствора, полученного при растворении геля дифлунизала, представлена на рисунке 2.

На хроматограмме наблюдается пик дифлунизала, имеющий оптимальные хроматографические характеристики (фактор асимметрии = 1,14, эффективность = $3{,}8 \cdot 10^3$ теоретических тарелок).

Для выбранных хроматографических условий оценили сходимость получаемых результатов, для чего 6 раз хроматографировали водно-спиртовой раствор дифлунизала с концентрацией 20 мкг/мл. Относительное среднеквадратичное отклонение времен удерживания составляет 0,28 %, а площадей пиков – 2,2 %, что подтверждает сходимость полученных результатов.

Для проверки наличия линейности отклика сигнала от концентрации был построен график в диапазоне концентраций дифлунизала 1–30 мкг/мл. По результатам анализа стандартных растворов была получена зависимость площади пика от концентрации. На графике наблюдается линейная зависимость площади пика дифлунизала от концентрации, зависимость аппроксимируется уравнением $S = 0{,}4617C + 0{,}7204$ с коэффициентом корреляции (r) 0,9952. Полученные результаты свидетельствуют о наличии линейного отклика в выбранном диапазоне концентраций, в дальнейшем исследовании представленное уравнение будет использовано для количественной оценки степени высвобождения дифлунизала.

Для исследования динамики высвобождения дифлунизала из матрицы ГК использовали ФБР с pH 7,6. Это значение pH использовали, чтобы смоделировать кислотность воспаленной кожи человека [21]. Для этого к навеске геля добавляли буфер, раствор оставляли при комнатной температуре, без перемешивания. При этом гель оставался на дне емкости и постепенно растворялся с поверхности,

[1] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 679, Dimethyl Sulfoxide. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyl-Sulfoxide. Accessed: 17.08.2023.

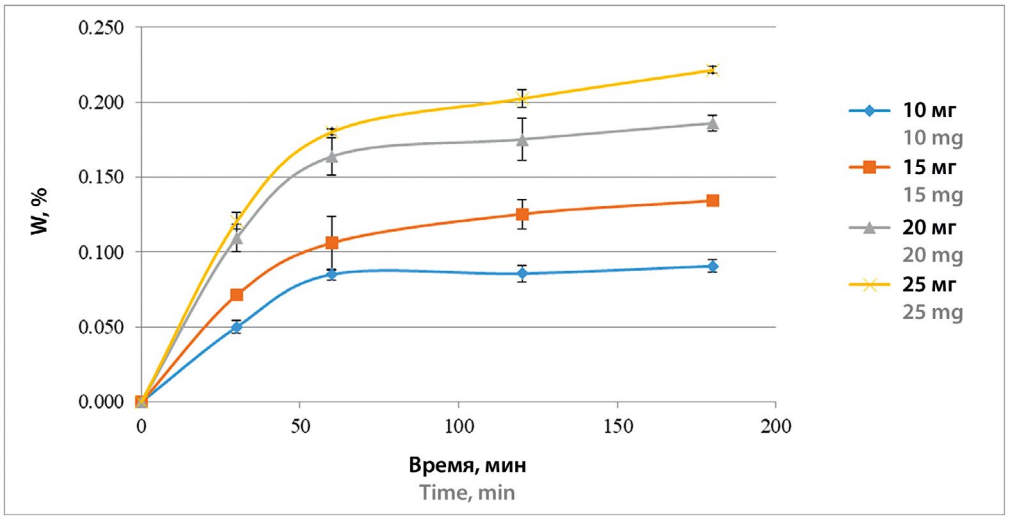


Рисунок 3. Профили высвобождения дифлунизала из геля разных дозировок при pH 7,6

Figure 3. Release profiles of diflunisal from gel of different dosages at pH 7.6

приводя к высвобождению действующего вещества из матрицы. В последней временной точке исследуемый раствор представляет собой прозрачную бесцветную жидкость, без механических включений и раздела фаз. В предварительных исследованиях оценили влияние перемешивания на процесс высвобождения, результаты показали, что высвобождение в первые минуты эксперимента достигает 100 % и в дальнейшем не меняется, что демонстрирует возможность полного перехода действующего вещества из геля в среду растворения, а также стабильность аналита в буферном растворе. По полученным результатам процесса высвобождения дифлунизала из гелей разных дозировок без перемешивания построили графики зависимости концентрации дифлунизала W (%) от времени высвобождения (рисунок 3).

Общий вид кривых высвобождения характерен для матриц ГК, описанных в статьях [16]. Наши результаты демонстрируют, что независимо от дозировки динамика высвобождения дифлунизала во всех образцах сопоставима друг с другом, степень высвобождения для всех дозировок в последней анализируемой точке превышает 90 %. При этом большая часть действующего вещества высвобождается в течение часа, последующие 2 часа происходит постепенное увеличение концентрации. Кроме того, использование системы доставки значительно увеличивает растворимость дифлунизала в водном растворе, максимальная концентрация дифлунизала, которая была достигнута в ходе экспериментов, составляет 100 мг/л.

Авторы [18] проводили исследование высвобождения в кислой среде, имитирующей среду желудка, и не наблюдали высвобождение дифлунизала из матрицы, что было подтверждено экспериментально. При использовании буферных растворов с pH около 2 дифлунизал выпадает в осадок и процесс высвобождения невозможен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения динамики высвобождения дифлунизала из матрицы гиалуроновой кислоты в качестве среды растворения использовали фосфатный буферный раствор с pH 7,6. Исследуемая система доставки значительно увеличивает растворимость дифлунизала в водном растворе по сравнению с растворением субстанции. Полученные данные позволяют утверждать, что профиль высвобождения характерен для биодеградируемых матриц и диффузионно-контролируемых систем доставки. Степень высвобождения для всех образцов превышает 90 % через 3 часа после начала эксперимента, при этом большая часть действующего вещества высвобождается в течение часа. При перемешивании растворов в процессе высвобождения полнота извлечения достигается за первые минуты эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kopishinskaia S. V. Transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Journal of Neurology and Psychiatry of S. S. Korsakov.* 2018;118(10):82–89. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro201811810182.
2. Adams D., Suhr O. B., Hund E., Obici L., Tournev I., Campistol J. M., Slama M. S., Hazenberg B. P., Coelho T. First European consensus for diagnosis, management, and treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Current Opinion in Neurology.* 2016;29:14–26. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000289.
3. Sekijima Y., Tojo K., Morita H., Koyama J., Ikeda S. Safety and efficacy of long-term diflunisal administration in hereditary transthyretin (ATTR) amyloidosis. *Amyloid.* 2015;22:79–83. DOI: 10.3109/13506129.2014.997872.
4. Ikram A., Donnelly J. P., Sperry B. W., Samaras C., Valent J., Hanna M. Diflunisal tolerability in transthyretin cardiac amyloidosis: A single center's experience. *Amyloid.* 2018;25:197–202. DOI: 10.1080/13506129.2018.1519507.

5. Rosenblum H., Castano A., Alvarez J., Goldsmith J., Helmke S., Maurer M. S. TTR (transthyretin) stabilizers are associated with improved survival in patients with TTR cardiac amyloidosis. *Circulation: Heart Failure*. 2018;11:e004769. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004769.
6. Amanpreet K., Shishu G., Katare O. P. Formulation, characterisation and in vivo evaluation of lipid-based nanocarrier for topical delivery of diflunisal. *Journal of Microencapsulation*. 2016;33:475–486. DOI: 10.1080/02652048.2016.1216189.
7. Rochín-Wong S., Rosas-Durazo A., Zavala-Rivera P., Maldonado A., Martínez-Barbosa M. E., Vélaz I., Tánori J. Drug Release Properties of Diflunisal from Layer-By-Layer Self-Assembled κ-Carrageenan/Chitosan Nanocapsules: Effect of Deposited Layers. *Polymers*. 2018;10(7):760. DOI: 10.3390/polym10070760.
8. Figueroa-Pizano M. D., Vélaz I., Martínez-Barbosa M. E. A Freeze-Thawing Method to Prepare Chitosan-Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Without Crosslinking Agents and Diflunisal Release Studies. *Journal of Visualized Experiments*. 2020;155:e59636. DOI: 10.3791/59636.
9. Bashir M., Syed H. K., Asghar S., Irfan M., Almalki W. H., Menshawi S. A., Khan I. U., Shah P. A., Khalid I., Ahmad J., Gohar U. F., Peh K. K., Iqbal M. S. Effect of Hydrophilic Polymers on Complexation Efficiency of Cyclodextrins in Enhancing Solubility and Release of Diflunisal. *Polymers*. 2020;12:1564. DOI: 10.3390/polym12071564.
10. Zhong Z., Yang X., Fu X. B., Yao Y. F., Guo B. H., Huang Y., Xu J. Crystalline inclusion complexes formed between the drug diflunisal and block copolymers. *Chinese Chemical Letters*. 2017;28:1268–1275. DOI: 10.1016/j.cclet.2017.04.001.
11. Kegley Z., Makay M., Rogers J., Phelps K., Malcom C., Hellmig D., Kroninger A., Bi X. Polyamidoamine dendrimer-polyethylene glycol hydrogel for solubility enhancement and sustained release of diflunisal. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2022;104:160–168. DOI: 10.1007/s10971-022-05904-y.
12. How K. N., Yap W. H., Lim C. L. H., Goh B. H., Lai Z. W. Hyaluronic Acid-Mediated Drug Delivery System Targeting for Inflammatory Skin Diseases: A Mini Review. *Front Pharmacol*. 2020;11:1105. DOI: 10.3389/fphar.2020.01105.
13. Chen Z. What's new about the mechanism of methotrexate action in psoriasis? *British Journal of Dermatology*. 2018;179(4):818–819. DOI: 10.1111/bjd.16908.
14. Gupta R. C., Lall R., Srivastava A., Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019;6:192. DOI: 10.3389/fvets.2019.00192.
15. Snetkov P., Morozkina S., Olekhnovich R., Vu T. H. N., Tyanutova M., Uspenskaya M. Curcumin/Usnic Acid-Loaded Electrospun Nanofibers Based on Hyaluronic Acid. *Materials*. 2020;13(16):3476. DOI: 10.3390/ma13163476.
16. Cavallaro G., Pierro P., Palumbo F. S., Testa F., Pasqua L., Aiello R. Drug delivery devices based on mesoporous silicate. *Drug Delivery*. 2004;11(1):41–46. DOI: 10.1080/10717540490265252.
17. Bashir M., Ahmad J., Asif M., Khan S. U. D., Irfan M., Ibrahim A. Y., Asghar S., Khan I. U., Iqbal M. S., Haseeb A., Khalid S. H., Abourehab M. A. S. Nanoemulgel, an Innovative Carrier for Diflunisal Topical Delivery with Profound Anti-Inflammatory Effect: in vitro and in vivo Evaluation. *International Journal of Nanomedicine*. 2021;16:1457–1472. DOI: 10.2147/IJN.S294653.
18. Bayer I. S. Hyaluronic Acid and Controlled Release: A Review. *Molecules*. 2020;25(11):2649. DOI: 10.3390/molecules25112649.
19. Shlini P., Sana F. M., Shambhavi U. Isolation and purification of hyaluronic acid like components from Ipomoea Batatas (sweet potato). *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 2017;4(8),282–286.
20. Mihajlova P. A., Generalova Ju. E. Research of the chromatographic behavior of diflunisal. In: I International Scientific and Practical Conference dedicated to the memory of Professor P. V. Kuznetsov. Chromatography in chemistry, medicine and biology: current issues, achievements and innovations. Kemerovo. 2021. P. 124–127. (In Russ.)
21. Proksch E. pH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology*. 2018;45(9):1044–1052. DOI: 10.1111/1346-8138.14489.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1462
УДК 615.014.2

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Актуальность разработки стоматологического *in situ* имплантата для применения в пострезекционной терапии (обзор)

М. В. Помыткина✉, Е. О. Бахрушина, П. С. Сахарова, П. Д. Коногорова, Н. Б. Демина

Институт фармации им. А. П. Нелюбина Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета). 119571, Россия, г. Москва, просп. Вернадского, д. 96, корп. 1

✉ **Контактное лицо:** Помыткина Мария Владимировна. **E-mail:** mary.pom99@gmail.com

ORCID: М. В. Помыткина – https://orcid.org/0000-0002-6380-1302; Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346;
П. С. Сахарова – https://orcid.org/0000-0003-4870-6232; П. Д. Коногорова – https://orcid.org/0009-0009-8688-6079;
Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791.

Статья поступила: 11.04.2023 **Статья принята в печать:** 01.02.2024 **Статья опубликована:** 02.02.2024

Резюме

Введение. Проблема обезболивания после хирургического вмешательства актуальна в современной стоматологии, так как контроль над болью является важной частью лечения. Помимо обезболивания, существуют и другие проблемы пострезекционной терапии – кровотечение из раны, воспалительный процесс. Современная стоматологическая практика не располагает системой направленной доставки или медицинским изделием анальгезирующего, противовоспалительного, анестезирующего или кровоостанавливающего действия, обеспечивающими высокую приверженность пациентов проводимой пострезекционной терапии.

Текст. Для решения данной проблемы может быть предложена разработка системы *in situ*, а именно имплантата – лекарственной формы, формирующейся непосредственно в месте введения, в альвеолярной лунке. Такая система направленной доставки обладает сразу несколькими преимуществами, к которым можно отнести: отсутствие необходимости в применении перевязочного медицинского материала; отсутствие риска вторичной контаминации; точность дозирования и таргетность доставки в локус поражения; высокую мукоадгезию системы к месту нанесения; длительность высвобождения активного ингредиента и другие. Целью обзора является обоснование возможности и актуальности разработки новой системы в форме *in situ* имплантата для применения в стоматологической пострезекционной практике. Исследование проводилось по основным базам публикаций (Scopus, Web of Science, PubMed и другие), а также в базе данных патентного поиска по материалам, опубликованным за период с 2000 года по настоящее время. В ходе исследования были описаны существующие на данный момент *in situ* системы для решения стоматологических проблем, которые могли бы служить прототипом систем для доставки обезболивающего вещества непосредственно в лунку зуба; полимеры, использующиеся для их создания и возможности высвобождения лекарственных веществ; а также приводится характеристика существующих лекарственных форм, применяющихся как местно, так и для оказания системного действия с целью обезболивания, в сравнении с системами *in situ*, которые имеют определенные достоинства и большой потенциал для развития.

Заключение. По результатам работы сделано заключение о возможности проведения фармацевтической разработки имплантатов *in situ* для стоматологического применения, а также выделены наиболее перспективные полимеры для осуществления фазового перехода в альвеолярной лунке.

Ключевые слова: постоперационная боль, пострезекционная терапия, обезболивание в стоматологии, системы доставки лекарств, *in situ* имплантат, биодеградируемые полимеры, фармацевтическая разработка

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

Вклад авторов. М. В. Помыткина – литературный и патентный поиск, написание текста статьи. Е. О. Бахрушина – руководство проведением исследования, разработка дизайна, редактирование текста статьи. П. С. Сахарова – литературный и патентный поиск, редактирование текста статьи. П. Д. Коногорова – литературный и патентный поиск, редактирование текста статьи. Н. Б. Демина – редакционные замечания и утверждение текста статьи к публикации. В написании статьи участвовали все соавторы.

Для цитирования: Помыткина М. В., Бахрушина Е. О., Сахарова П. С., Коногорова П. Д., Демина Н. Б. Актуальность разработки стоматологического *in situ* имплантата для применения в пострезекционной терапии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):81–94. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1462

Relevance of the Development of Dental *In situ* Implant for Post-resection Therapy (Review)

Maria V. Pomytkina✉, Elena O. Bakhrushina, Polina S. Sakharova, Polina D. Konogorova, Natalia B. Demina

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

✉ **Corresponding author:** Maria V. Pomytkina. **E-mail:** mary.pom99@gmail.com

© Помыткина М. В., Бахрушина Е. О., Сахарова П. С., Коногорова П. Д., Демина Н. Б., 2024
© Pomytkina M. V., Bakhrushina E. O., Sakharova P. S., Konogorova P. D., Demina N. B., 2024

ORCID: Maria V. Pomytkina – https://orcid.org/0000-0002-6380-1302; Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; Polina S. Sakharova – https://orcid.org/0000-0003-4870-6232; Polina D. Konogorova – https://orcid.org/0009-0009-8688-6079; Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791.

Received: 11.04.2023 **Revised:** 01.02.2024 **Published:** 02.02.2024

Abstract

Introduction. The problem of pain relief after surgery is relevant in modern dentistry, as pain control is an important part of treatment. In addition to anesthesia, there are other problems of post-resection therapy such as bleeding from the wound and inflammation. Modern dental practice does not have a targeted delivery system or a medical product with analgesic, anti-inflammatory, anesthetic or hemostatic action, which ensures high adherence of patients to the ongoing post-resection therapy.

Text. To solve this problem, it can be proposed to develop an *in situ* implant – a dosage form that is formed directly at the injection site, in the alveolar socket. Targeted delivery system has advantages: no need to use a medical dressing material; no risk of secondary contamination; dosing accuracy and target delivery to the lesion locus; high mucoadhesion to the site of application; the duration of the active ingredient release and others. The purpose of the review is to substantiate the possibility and relevance of developing a new *in situ* implant system for use in dental post-resection practice. The study was conducted on the main databases of publications (Scopus, Web of Science, PubMed and others), and patent search database on materials published from 2000 to the present. The study describes the currently existing *in situ* systems for dental problems, which could be a prototype of systems for delivering an anesthetic directly to the tooth socket, the polymers used to create them and the possibility of releasing drugs, and also characterizes existing drugs for the pain relief (applied both locally and for systemic action), in comparison with *in situ* systems, which have certain advantages and great potential for development.

Conclusion. Based on the results of the work, a conclusion about the possibility of pharmaceutical development of dental *in situ* implants was made, and the most promising polymers for phase transition in the alveolar socket were identified.

Keywords: postoperative pain, post-resection therapy, pain relief in dentistry, drug delivery systems, *in situ* implant, biodegradable polymers, pharmaceutical development

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

Contribution of the authors. Maria V. Pomytkina – literary and patent search, writing the text of the article. Elena O. Bakhrushina – management of the research, design development, editing the text of the article. Polina S. Sakharova – literary and patent search, editing the text of the article. Polina D. Konogorova – literary and patent search, editing the text of the article. Natalia B. Demina – editorial comments and approval of the text of the article for publication. All co-authors participated in writing the article.

For citation: Pomytkina M. V., Bakhrushina E. O., Sakharova P. S., Konogorova P. D., Demina N. B. Relevance of the development of dental *in situ* implant for post-resection therapy. *Drug development & registration*. 2024;13(1):81–94. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1462

ВВЕДЕНИЕ

Проблема обезболивания после стоматологического хирургического вмешательства очень актуальна на данный момент [1]. В стоматологии контроль над болью является важной частью лечения, которая включает доставку лекарств, лечение послеоперационной или предоперационной, а также хронической боли [2].

Боль представляет собой защитную реакцию организма в ответ на повреждение ткани. Постоперационная боль может быть результатом хирургического лечения различных стоматологических заболеваний. Это острая боль, которая может ощущаться пациентом вплоть до 5 суток после операции [3]. Постоперационная боль по своей этиологии связана с активацией ноцицепторов в результате их повреждения во время хирургического вмешательства. Вследствие этого непосредственно на месте раны формируется зона первичной гипералгезии, а затем уже вокруг места повреждения образуется зона вторичной гипералгезии [4]. Постоперационный период сопровождается у пациента не только болью и отеком в месте вмешательства, но и нарушением метаболических, гормональных и других процессов, протекающих в организме. В связи с этим неустранение боли может привести как к физическим и эмоциональным страданиям, так и к расстройствам гомеостаза [3].

Целью постоперационного обезболивания является устранение или уменьшение боли и связанного с ней дискомфорта. Это является обязательным условием для устранения лишних страданий пациента, улучшения качества жизни и снижения затрат на здравоохранение в результате отсутствия необходимости дополнительных посещений врача [5].

К лечебным мероприятиям по уменьшению постоперационной боли относятся: холодовой компресс (местная гипотермия операционного поля), медикаментозная терапия, рекомендации по гигиене полости рта и режиму питания, уменьшение постоперационного отека (дренирование раны, гемостаз), своевременное направление пациента на перевязку [6].

Как правило, при медикаментозной терапии используются такие лекарственные средства, как опиоиды, местные анестетики, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), глюкокортикостероиды, центральные анальгетики [3, 6].

Местные анестетики используются для облегчения постоперационной боли, уменьшения кровотечения и физиологической реакции на процедуру [7]. Однако эти лекарственные вещества действуют непродолжительно: период действия большинства из них составляет менее восьми часов. Например, однократная инъекция приводит к достижению максимальной концентрации анестетика в плазме в течение 30–45 минут, а полное его выведение происходит через 6 часов [8]. Несколько составов с пролонгированным высвобождением, содержащие местные анестетики, получили одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), включая инъекционный препарат с бупивакаином EXPAREL® [9] и кремы для местного обезболивания Emla® (содержит лидокаин и прилокаин) и SonoPrep® (содержит лидокаин) [10].

Пероральные опиоиды высокоэффективны для снятия боли, но требуют ответственного самолечения и обладают высоким потенциалом для развития неблагоприятных системных эффектов, включая нарушение сна, тошноту, неврологическую дисфункцию, угнетение кровообращения или дыхания и даже зависимость [11, 12]. Применение нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) в постоперационном периоде ограничено рядом противопоказаний, таких как язвенная болезнь, бронхиальная астма, почечная недостаточность, гиповолемия, тромбоцитопения, геморрагические проявления. В этих случаях для устранения болевого синдрома можно применять препараты центрального действия (парацетамол) [6, 13].

Основными параметрами, обеспечивающими высокую комплаентность пациента проводимой пострезекционной терапии, является скорость наступления эффекта и его продолжительность, отсутствие системных побочных эффектов, таргетность действия системы доставки, отсутствие необходимости в медицинской манипуляции по ее удалению. Все это не может быть достигнуто при применении вышеперечисленных средств в существующих на данный момент лекарственных формах.

Наиболее распространенным методом обезболивания в стоматологии по-прежнему является традиционная анестезия с использованием шприцов и игл. При использовании инъекционной анестезии происходит механическая травма слизистой оболочки полости рта и при этом пациент испытывает болевые ощущения еще до введения самого анестетика. Беспокойство и страх, возникающие до и во время инъекции, остаются препятствием для пациентов при получении стоматологического лечения [14].

Одной из проблем пероральных лекарственных форм является несоблюдение пациентом режима лечения, так как требуется частый и последовательный прием препарата для поддержания терапевтической концентрации лекарственного вещества. Однако многие пациенты не соблюдают режим дозирования, и неудобство частого и постоянного применения снижает приверженность пациентов к лечению [15].

Таким образом, в настоящее время стоматологическая практика располагает не слишком широким инструментарием и возможностями по увеличению приверженности пациентов проводимой терапии, следовательно, современная стоматология нуждается в таких системах доставки обезболивающих веществ, которые бы повышали комплаентность пациентов.

Современные подходы к достижению длительного обезболивания предполагают включение лекарственного вещества в биосовместимый полимерный носитель, который контролирует кинетику его высвобождения [16].

Помимо обезболивания, существуют и другие проблемы пострезекционной терапии: кровотечение из раны, микробный воспалительный процесс. Особенно часто это происходит при развитии такого пострезекционного осложнения, как альвеолярный остит, при котором не осуществляется нормальная последовательность заживления лунки. Основной причиной этого является преждевременный лизис тромба, после чего возможно присоединение инфекции, сопровождающееся сильной болью и повышенной температурой. Вследствие этого пациенты вынуждены тратить время на дополнительное лечение. Данное обстоятельство, а также потеря продуктивного времени стоматолога-хирурга приводят к неизвестным, но потенциально значительным экономическим потерям для общества. В связи с этим необходима разработка экономичных методов обеспечения нормального заживления лунки после удаления зуба с минимальной болезненностью [17].

Для лечения пострезекционной боли требуется препарат, который одновременно служил бы кровоостанавливающим средством, а также средством контролируемой доставки обезболивающего вещества [18].

Современным решением вышеперечисленных проблем может стать разработка новой системы доставки, а именно имплантата, формируемого *in situ,* в том числе за счет включения соответствующих активных фармацевтических субстанций – обезболивающих, антифибринолитиков, антисептиков и антибиотиков.

Целью исследования являлось обобщение научных данных и обоснование актуальности вопроса фармацевтической разработки новой стоматологической системы доставки – *in situ* имплантата.

Объектом исследования являлись современные лекарственные формы, нашедшие применение в стоматологической практике. Особое внимание уделялось исследованию вопроса разработки таргетных систем *in situ* и удобных способов внедрения их в стоматологическую пострезекционную терапию.

Научный поиск осуществлялся по основным поисково-информационным и библиотечным базам публикаций: Science Direct, Scopus, Web of Science, PubMed, Google Scholar, E-library, а также в базе данных патентного поиска Федерального института промышленной собственности (ФИПС) с использованием ключевых слов: «постоперационная боль (postoperative pain)», «стоматологическая боль (dental pain)», «обезболивание в стоматологии (dental analgesia)», «стоматологические материалы (dental materials)», «*in situ* имплантат (*in situ* implant)», «стоматологические *in situ* системы (dental *in situ* systems)», «полимеры для *in situ* систем (*in situ* systems polymers)».

Поиск проводился с февраля по октябрь 2022 года. Анализировались публикации за период с 2000 года по настоящее время.

В статье описаны существующие на данный момент системы *in situ* для решения стоматологических проблем, которые могли бы служить прототипом системы доставки обезболивающего вещества непосредственно в лунку зуба; полимеры, использующиеся для их создания и возможности высвобождения лекарственных веществ; а также приводится обсуждение достоинств и недостатков существующих лекарственных форм, применяющихся как местно, так и для оказания системного действия с целью обезболивания, в сравнении с системами *in situ*, имеющими определенные преимущества и большой потенциал для развития.

По результатам поиска в одной из крупнейших англоязычных текстовых баз данных медицинских и биологических публикаций PubMed, созданной Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI), виден возрастающий в последнее время интерес к *in situ* системам, а именно имплантатам: число результатов поиска по запросу «*in situ* forming implant» значительно возрастает в XXI веке (рисунок 1) и достигает наибольших значений в последние 5 лет с максимумом в 2020 году – 80 результатов (рисунок 2).

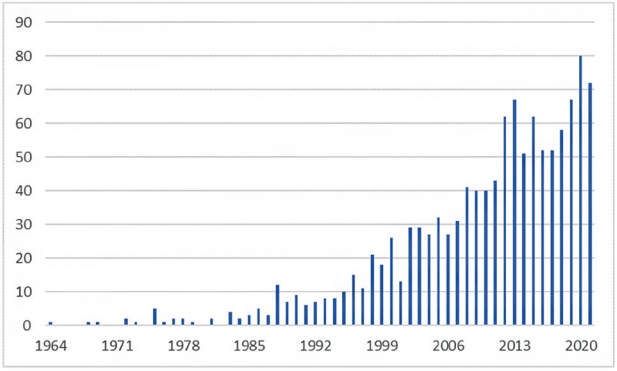


Рисунок 1. Распределение результатов поиска в базе данных PubMed по запросу «*in situ* forming implant» по годам

Figure 1. Distribution of search results in the PubMed database for the query "*in situ* forming implant" by year

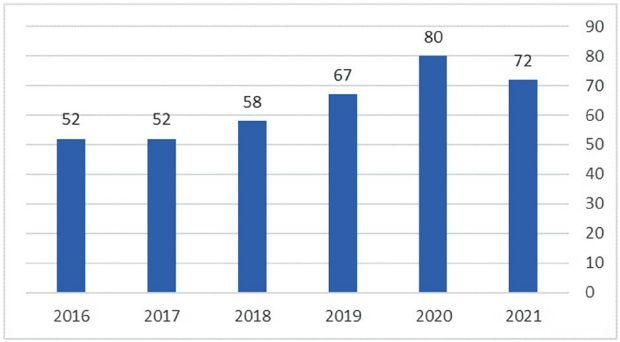


Рисунок 2. Количество результатов поиска в базе данных PubMed по запросу «*in situ* forming implant» за последние 5 лет:

2016 год – 52 результата; 2017 год – 52 результата; 2018 год – 58 результатов; 2019 год – 67 результатов; 2020 год – 80 результатов; 2021 год (по состоянию на 1 ноября) – 72 результата

Figure 2. Number of PubMed search results for "*in situ* forming implant" over the last 5 years:

2016 – 52 results; 2017 – 52 results; 2018 – 58 results; 2019 – 67 results; 2020 – 80 results; 2021 (as of November 1) – 72 results

Данная статистика наглядно демонстрирует, что разработка таких *in situ* систем, как имплантаты, – актуальное и перспективное направление современной фармацевтической разработки.

Ассортимент стоматологических лекарственных форм для применения в пострезекционной терапии

Существующие подходы к медикаментозному устранению стоматологической боли обладают определенным набором недостатков, которые связаны не только с фармакологическим эффектом той или иной группы лекарственных веществ, но и с теми лекарственными формами, в которых они применяются.

Так, растворы для полоскания не могут обеспечить длительный и необходимый по силе фармакологический эффект в связи с непродолжительным нахождением в ротовой полости и ограниченным контактом раствора с поврежденной слизистой оболочкой.

Недостатки лекарственных форм для местной доставки лекарственных веществ в виде гелей связаны с очищающим действием слюны, что приводит к быстрому удалению препарата из места нанесения и, соответственно, снижению фармакологического эффекта [19]. Несмотря на то что местноанестезирующие гели легко наносятся, они распределяются по всей слизистой оболочке полости рта, что вызывает онемение губ, языка и щек, а также высока вероятность проглатывания геля [20].

В отличие от растворов или гелей инъекционное введение местных анестетиков может обеспечить локальность действия, однако оказывает относительно

кратковременный эффект, не обеспечивая пролонгированное высвобождение [8], и связано с дополнительными болевыми ощущениями и, следовательно, дискомфортом пациента. Также при инъекционном введении повышается вероятность развития системных побочных эффектов [21].

Назначение твердых пероральных лекарственных форм – таблеток или капсул, содержащих НПВС, является наиболее популярным и высокоэффективным решением для лечения боли в стоматологии [12, 13, 22]. Но, помимо того, что в данном случае также отсутствует таргетность действия лекарственного вещества, прием НПВС сопряжен с развитием системных побочных эффектов, характерных для препаратов данной группы, риск развития которых обычно выше при приеме внутрь по сравнению с другими путями введения [23, 24].

В стоматологической практике также используются бинты, тампоны и турунды в качестве перевязочного материала, в том числе пропитанные раствором лекарственного вещества [25]. Но они имеют ряд недостатков, ограничивающих возможность их перспективного применения: как правило, состоят не из биодеградируемого материла, что обусловливает необходимость его извлечения, а значит, повторного визита к врачу [26]; их применение может приводить к вторичной контаминации раны, так как не обеспечивается полная стерильность при манипуляции с материалами из хлопка [27], а структура материала, очевидно, не может обеспечить контролируемое высвобождение лекарственного вещества.

В стоматологии в настоящее время нашли применение губки. Они представляют собой коллагеновую или желатиновую основу, которая может использоваться как самостоятельно (гемостатические губки), так и включать в себя лекарственные вещества – антифибринолитики, противомикробные и противовоспалительные средства. Губки используются для остановки постоперационного кровотечения или для лечения альвеолита путем закладывания в лунку после удаления зуба [26].

Известны коммерческие средства: КОЛАПОЛ[1] (ООО «Научно-производственная компания «ПОЛИСТОМ», Россия), представляющий собой коллагеновые пластины – губчатые фрагменты небольшого размера, которые могут содержать антибактериальные составляющие (линкомицин, метронидазол) и применяются в том числе после сложного удаления зуба, дентальной имплантации и других хирургических манипуляций; АЛЬВОСТАЗ[2] (ООО «НКФ Омега-Дент», Россия) – гемостатическая губка с йодоформом, которая представляет собой специальное средство для профилактики и лечения альвеолита. Она оказывает свое действие в течение нескольких часов, затем постепенно рассасывается в лунке зуба.

Однако эти средства не являются лекарственными препаратами, а относятся к стоматологическим материалам (медицинским изделиям), и, следовательно, к ним не предъявляются такие же требования в отношении стандартизации и контроля качества, как к лекарственным препаратам. По данным Государственного реестра лекарственных средств[3] (ГРЛС), в настоящее время на территории Российской Федерации зарегистрировано только одно лекарственное средство в лекарственной форме губки – «Губка гемостатическая коллагеновая», в показаниях к применению которого указано кровотечение из альвеолярной лунки после удаления зубов.

В целом губка как лекарственная форма довольно перспективна. В статье [28] описаны коллагеновые губки, содержащие хлорамфеникол. В исследовании они продемонстрировали не только противомикробную активность, но и замедленное высвобождение хлорамфеникола.

В исследовании [2] описаны губки с ибупрофеном, их получение; кроме того, изучено высвобождение ибупрофена *in vitro*. Исследованы их структурно-морфологические характеристики с помощью инфракрасной спектроскопии и тестов на водопоглощение, а также показано, что лекарственная форма обеспечивает замедленное высвобождение действующего вещества, а значит, может стать хорошим решением проблемы стоматологического обезболивания.

Как уже было сказано выше, преимущества губок заключаются в их биосовместимости (коллаген является биосовместимым веществом) [29], способности к биодеградации (их не нужно извлекать после применения в отличие от тампонов) [30]. Они способны обеспечивать замедленное высвобождение лекарственных веществ и, таким образом, пролонгировать фармакологический эффект [2, 28, 29]. Однако они также не лишены определенных недостатков: например, коллаген, использующийся в качестве матрицы, несмотря на свойство биосовместимости и способность к биодеградации, является веществом животного происхождения, а это, в свою очередь, обусловливает трудности его получения из животного сырья [31] и стандартизации для использования в составе лекарственного препарата. Несмотря на то, что губки являются стерильными и вводятся в рану с соблюдениями правил асептики, риск вторичной микробной контаминации сохраняется. Более того, наложение губок требует использования дополнительных материалов и инструментов – пинцетов, а если губку необходимо нарезать перед применением, очевидно, снижается точность дозирова-

[1] Инструкция по применению материала КОЛАПОЛ КП. Доступно по: http://polystom.ru/instruktsiya-po-primeneniyu-materiala-kolapol-kp/ Ссылка активна на 29.10.2021.

[2] АЛЬВОСТАЗ губка – Омега Дент. Доступно по: http://omegadent.ru/catalog/gemostatiki/483/ Ссылка активна на 29.10.2021.

[3] Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: http://grls.rosminzdrav.ru. Ссылка активна на 31.10.2021.

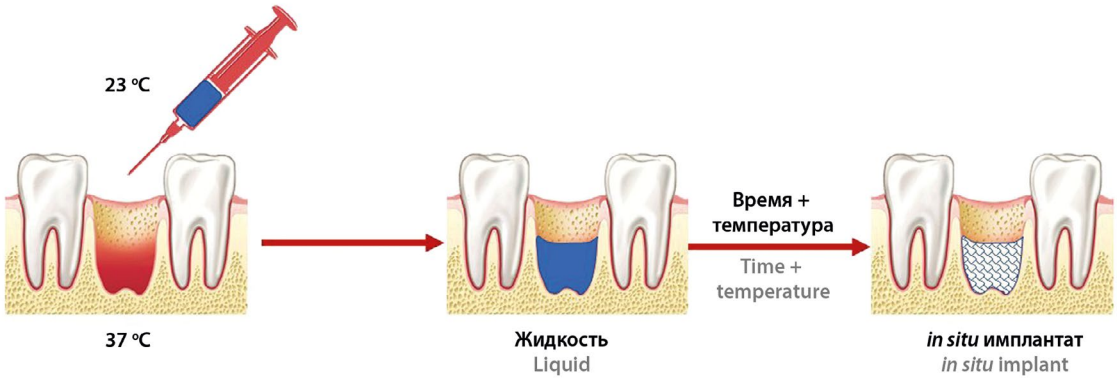


Рисунок 3. Формирование *in situ* имплантата на основе термореверсивного полимера в альвеолярной лунке после удаления зуба

Figure 3. *In situ* formation of a thermoreversible polymer implant in the alveolar socket after tooth extraction

ния. Это создает дополнительные трудности при применении лекарственной формы.

Таким образом, принимая во внимание достоинства и недостатки используемых в медицинской практике лекарственных форм и стоматологических материалов, а также связанные с их применением проблемы, можно прийти к заключению о необходимости поиска новых решений в фармацевтической разработке стоматологических лекарственных форм для обезболивания в пострезекционной терапии.

Стоматологические системы in situ

Решить вышеперечисленные проблемы, связанные с традиционными методами обезболивания, и, соответственно, повысить эффективность терапии могут системы доставки *in situ*. Одно из перспективных направлений в современной фармацевтической разработке – создание *in situ* имплантатов.

В соответствии с определением, приводимым в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ)[1], имплантат – это стерильная твердая лекарственная форма, имеющая подходящие для введения в ткани тела размеры и форму, предназначенная для имплантации и высвобождающая действующее вещество в течение длительного периода времени. Имплантаты представляют собой полимерную основу (матрикс) с равномерно распределенным в ней действующим веществом, которое способно в течение определенного времени высвобождаться из основы в месте имплантации.

Имплантат *in situ* представляет собой лекарственную форму, формирующуюся непосредственно при контакте с тканями живого организма в результате фазового перехода из жидкости в гель в ответ на изменения условий среды, например температуры, pH, ионного состава [32].

Это зависит от того, полимер какого типа является его основой: он может обладать свойством термореверсивности, фазочувствительности или pH-/ионной чувствительности и быть растворенным в воде, биосовместимом растворителе и/или буферном растворе.

Предполагаемый механизм формирования стоматологического *in situ* имплантата для использования в пострезекционной терапии можно представить следующим образом: система, состоящая из полимера, растворителя и действующего вещества, находящаяся в биофармацевтической упаковке (например, преднаполненном шприце), представляет собой жидкость при комнатной температуре и вводится в лунку зуба после его удаления и остановки кровотечения (при помощи стерильного тампона, гемостатической губки и/или путем ушивания десны). При этом в лунке формируется кровяной сгусток, то есть кровотечение из открытой раны на момент введения препарата отсутствует. При соприкосновении с тканями десны жидкость застывает (при температуре тела в месте введения, если полимер-гелеобразователь обладает свойством термочувствительности), точно принимая форму альвеолярной лунки (рисунок 3) и закрепляясь в ней за счет механической фиксации или посредством дополнительных медицинских приспособлений. Так, для закрепления в альвеолярной лунке препарата Atridox® специалистами используются составы стоматологических пленок или адгезивных паст (Coe-Pak™ или Octyldent™)[33].

В соответствии с ГФ РФ XIV издания биодеградируемые имплантаты, как правило, производятся из синтетических алифатических полиэфиров – полигликолевой кислоты, полимолочной кислоты, сополимеров полигликолевой и полимолочной кислот и др. Наиболее часто в качестве биодеградируемого полимера для производства имплантатов используют сополимер молочной и гликолевой кислот

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Федеральная электронная медицинская библиотека Министерства здравоохранения Российской Федерации. Доступно по: http://www.femb.ru. Ссылка активна на 31.10.2021.

(PLGA). Это подтверждается и результатами научного поиска: так, при поиске в базе данных PubMed по запросу «*in situ* implant…», где вместо «…» употреблялись названия наиболее распространенных полимеров, наибольшее число результатов было по запросу «PLGA *in situ* implant» (рисунок 4). В связи с этим в обзоре будут несколько более подробно рассмотрены свойства этих сополимеров для оценки возможности их использования при создании новой системы *in situ*.

Сополимеры молочной и гликолевой кислоты – поли-лактид-со-гликолиды (PLGA) давно известны и достаточно хорошо изучены, широко применяются для производства биодеградируемых нитей и материалов в хирургической практике, одобрены FDA и Европейским агентством лекарственных средств (EMA) для применения в системах доставки лекарственных средств, тканевой инженерии, медицинских и хирургических устройствах [34]. Это обусловлено такими свойствами, как высокая биосовеместимость и способность к полной биодеградации [35]. В организме сополимеры гидролизуются до молочной и гликолевой кислот, а затем продукты гидролиза удаляются через цикл трикарбоновых кислот [36]. Они характеризуются низкой токсичностью и хорошей биологической совместимостью с тканями живых организмов, а их свойства и скорость деструкции можно регулировать содержанием кристаллической фазы и соотношением звеньев мономеров молочной и гликолевой кислот [37].

PLGA относят к фазочувствительным полимерам, то есть совершающим фазовый переход при замене растворителя. Он растворим в органических растворителях, таких как дихлорметан, тетрагидрофуран, этилацетат, хлороформ, гексафторизопропанол, ацетон и бензиловый спирт, и нерастворим в воде [37]. Как правило, для приготовления систем *in situ* на основе PLGA используют такой биосовместимый и нетоксичный растворитель, как N-метил-пирролидон (NMP) [38–44]. Также имеются сведения, что данный растворитель способствует уменьшению начального выброса действующего вещества из системы [40]. При попадании в водную среду в физиологических условиях органический растворитель диффундирует в окружающие ткани, а вода проникает внутрь полимера, вызывая его осаждение [14, 44]. В условиях *in vitro* при изучении различных физико-химических свойств имплантатов, а также кинетики высвобожде-

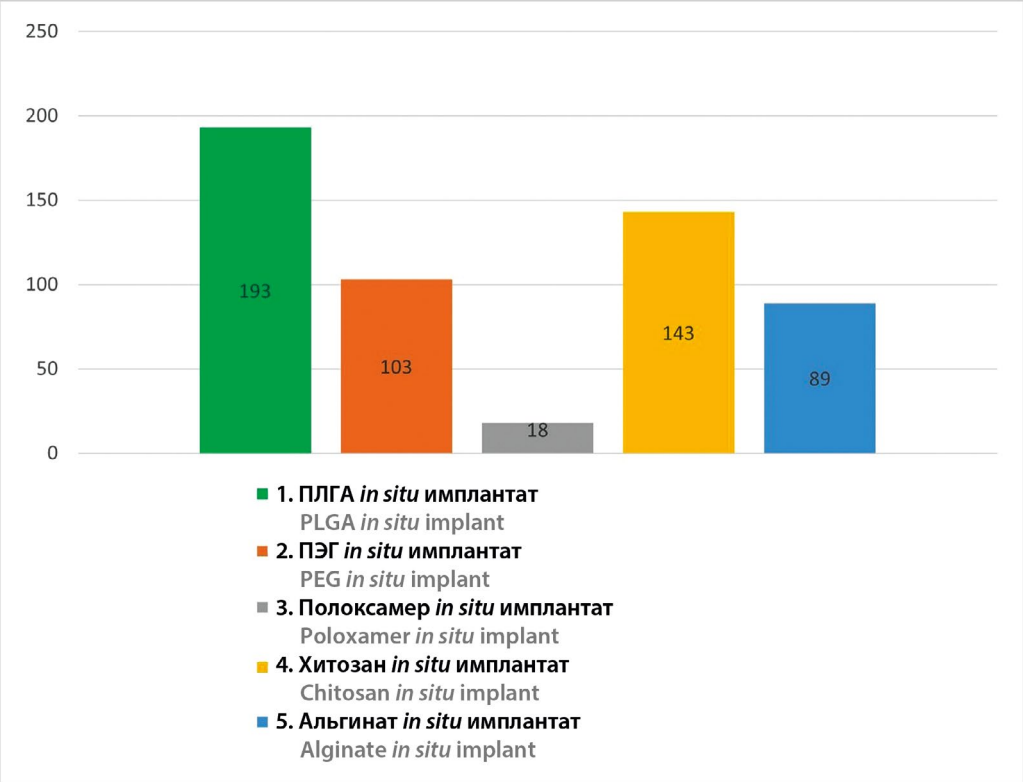


Рисунок 4. Число результатов поиска в базе данных PubMed по запросу «… *in situ* implant», где «…» – конкретный полимер:

1 – 193 результата по запросу «PLGA (poly-lactid-co-glycolid) *in situ* implant»; 2 – 103 результата по запросу «PEG (polyethylene glycol) *in situ* implant»; 3 – 18 результатов по запросу «poloxamer *in situ* implant»; 4 – 143 результата по запросу «chitosan *in situ* implant»; 5 – 89 результатов по запросу «alginate *in situ* implant»

Figure 4. Number of PubMed search results for "...*in situ* implant", where "..." is a specific polymer:

1 – 193 results for "PLGA (poly-lactid-co-glycolid) *in situ* implant"; 2 – 103 results for the query "PEG (polyethylene glycol) *in situ* implant"; 3 – 18 results for "poloxamer *in situ* implant"; 4 – 143 results for "chitosan *in situ* implant"; 5 – 89 results for "alginate *in situ* implant"

ния действующего вещества получают имплантат путем замены растворителя и используют фосфатный буфер с pH около 7,3–7,4 [38–42].

Физико-химические свойства сополимеров PLGA в основном зависят от соотношения мономеров молочной и гликолевой кислот. У них более быстрая кинетика разложения, чем у их гомополимеров – полимолочной кислоты (PLA) или полигликолевой кислоты (PGA) – по отдельности [37]. Молочная кислота менее гидрофильна и, следовательно, имеет более медленную скорость разложения. Соответственно, при увеличении доли молочной кислоты в составе полимера скорость его разложения уменьшается. Наоборот, при увеличении доли гликолевой кислоты разложение PLGA ускоряется. Помимо этого, увеличение содержания гликолевой кислоты приводит к снижению прочности полимера на разрыв. Также от количества мономерных единиц PLA и PGA зависит степень кристалличности, что влияет на механические свойства, способность к набуханию и биодеградацию полимера [34].

Как правило, сополимеры PLGA аморфны и имеют температуру застывания около 45–55 °C. PLGA размягчается во влажной среде, что приводит к снижению температуры застывания и изменению механических свойств полимера [34]. Исследования биоразлагаемости *in vitro* позволяют сделать вывод, что деградация полимера происходит как в щелочной, так и в сильнокислой среде. Однако скорость разложения замедляется в слабокислой и нейтральной среде из-за автокатализа карбоксильными концевыми группами. Таким образом, чтобы настроить механизмы биодеградации полимера и высвобождения лекарственного вещества, необходимо учитывать все факторы для желаемого применения полимерной системы [37].

PLGA способен обеспечивать пролонгированное высвобождение, о чем сообщалось в исследованиях [35, 38–44, 18]. В исследовании [45] было продемонстрировано, что микрочастицы пентоксифиллина на основе PLGA оказывали более длительный эффект по сравнению со «стандартным» пентоксифиллином.

В статье [18] описаны микрочастицы PLGA с местным анестетиком – бупивакаином для лечения постоперационной зубной боли. Эта система с контролируемым высвобождением содержит микрочастицы бупивакаин-PLGA, заключенные в полимерную гемостатическую матрицу. Составы, которые демонстрировали устойчивое высвобождение бупивакаина *in vitro* в течение трех дней, были выбраны для последующего исследования на модели удаления зубов у грызунов. По мере заживления полости раны полимер и матрица растворяются, непрерывно высвобождая бупивакаин. По утверждению авторов, они стремились разработать систему обезболивания, которая сочетает в себе кровоостанавливающий агент и анестетик для контроля зубной боли и лучшего заживления раны после удаления зуба.

Однако, несмотря на широкое применение и множество разработанных систем доставки на его основе, PLGA не лишен определенных недостатков. Самыми значительными из них являются способность к «взрывному» высвобождению действующего вещества в первое время после введения [46], что связано с особенностями механизма деградации полимера; выделение при гидролизе кислот, что приводит к снижению pH в месте применения [47], а значит, может привести к дополнительному раздражению поврежденных тканей; а также довольно долгое время биодеградации [37].

Таким образом, с учетом вышеперечисленных особенностей потенциальная возможность применения сополимера PLGA в качестве основы для стоматологического имплантата *in situ* требует более детального изучения. В дальнейшем рассмотрены примеры существующих систем для стоматологического применения как на основе PLGA, так и других полимеров.

Возможно применение таких биосовместимых полимеров, как полиэтиленгликоль, альгинаты, хитозан, полоксамеры и др. [48–51].

В исследовании [52] изучали свойства полимеров-гелеобразователей для разработки стоматологического геля с цетилпиридиния хлоридом в качестве действующего вещества для лечения болезней пародонта. Представленные результаты о свойствах полимеров и их комбинаций могут быть полезны также при разработке систем *in situ*.

Характерным и важным свойством данной системы должна являться высокая мукоадгезивная способность, что препятствует преждевременной эвакуации имплантата из места нанесения. Использование мукоадгезивных полимеров (например, редкосшитых акриловых полимеров, камедей или гидроксиметилпропилцеллюлозы) улучшает контакт между лекарственной формой и тканями, что обеспечивает более длительное время пребывания на слизистой оболочке [43, 53], а образование геля обусловливает защиту от механических воздействий.

Преимуществами имплантата как системы доставки являются обеспечение длительного пребывания в месте применения и высвобождение лекарственного средства во времени; возможность достижения контролируемого высвобождения, что улучшает эффективность лечения за счет отсутствия необходимости повторного введения и возможности поддержания постоянной концентрации лекарственного вещества в месте применения; простота производственного процесса и минимальное инвазивное введение [54].

Помимо этого, к преимуществам можно отнести более простое введение по сравнению, например, с губками: при введении в рану через шприц жидкий раствор застывает в полости рта, образуя гелевую матрицу, принимающую форму лунки и закрепляющуюся в ней.

В настоящее время разработаны и описаны имплантаты, формирующиеся *in situ*, для различных путей введения, как парентеральных, так и непарентеральных. Но подобных систем для стоматологического применения в пострезекционной терапии практически не существует, патентный поиск в базе данных ФИПС по запросу «стоматологический *in situ* имплантат» не дал релевантных результатов: запатентованы системы для офтальмологического применения [55, 56], а также *in situ* имплантаты с бупренорфином для продолжительного обезболивания при особых состояниях [57]. Научные публикации посвящены созданию и изучению имплантатов *in situ*, которые предлагаются в основном для решения других проблем, в том числе стоматологических.

В обзоре Vigani B. et al. [58] содержится информация о системах доставки *in situ*, которые были разработаны и исследованы в последние 10 лет и применяются для непарентеральных путей введения: офтальмологического, интраназального, буккального, перорального, вагинального и т. д. Также рассматривается полимерный состав этих систем, механизм гелеобразования и результаты исследований высвобождения *in vitro*, что подтверждает существующий научный интерес к разработке и изучению свойств таких лекарственных форм.

Особое внимание следует обратить на буккальные системы доставки, которые применяются для лечения таких заболеваний, как мукозит ротовой полости и периодонтит. Буккальные системы доставки наиболее близки к потенциальным системам для постоперационного обезболивания, так как последние также предполагаются к применению в ротовой полости, то есть в тех же условиях, а следовательно, к ним будут предъявляться похожие требования, они должны обладать подобными свойствами и могут быть изготовлены из тех же полимеров. Таким образом, буккальные системы могут послужить прототипом обезболивающих *in situ* систем, предлагаемых к разработке.

В проведенной ранее этими учеными работе описан термочувствительный мукоадгезивный гель, который предлагается использовать для лечения мукозита – поражения слизистых оболочек полости рта. Гель получали, смешивая полимер триметилхитозан – катионный полисахарид основного характера – с глицеро-2-фосфатом и загружая бензидамина гидрохлоридом в качестве действующего вещества. Полученная система переходит в гель после введения в ротовую полость. По утверждению авторов, она обеспечивает контролируемое высвобождение лекарственного вещества и способна противостоять физиологическим механизмам удаления [59].

Также Vigani B. et al. [60] предложили для нанесения на слизистую оболочку полости рта систему *in situ*, состоящую из к-каррагинана и гидроксипропилцеллюлозы, обладающую низкой вязкостью при комнатной температуре. Система также обладает защитным действием в месте применения и хорошими мукоадгезивными свойствами. К-каррагинан был использован разработчиками в качестве ионочувствительного полимера, способного взаимодействовать с ионами слюны, гидроксипропилцеллюлоза – в качестве мукоадгезивного агента, а кальция хлорид – как соль, способная усиливать взаимодействие к-каррагинана с ионами слюны.

В работе G. Sandri et al. описана термочувствительная композиция в виде спрея для полости рта на основе полоксамера 407 и альгината натрия, используемая для местной доставки лизата тромбоцитов, обладающего ранозаживляющими свойствами. Состав лекарственной формы имеет низкую вязкость при 8 °C и быстро превращается в гель при 34–35 °C, то есть обладает термореверсивностью (за счет полоксамера 407) – одним из необходимых свойств *in situ* систем [61].

Для лечения другого заболевания – периодонтита, представляющего собой воспаление периодонта – пространства между костной тканью лунки и непосредственно зубом, описаны *in situ* системы на основе различных полимеров, предназначенные, как правило, для введения в пародонтальные карманы. A. A. Kassem et al. [62] разработаны системы доставки, содержащие либо мелоксикам (НПВС), либо миноциклина гидрохлорид (антимикробное средство) на основе полоксамера в качестве полимера-гелеобразователя. Было показано, что более высокая концентрация полоксамера обеспечивала большое количество полимерных мицелл, в результате чего высвобождение действующих веществ было пролонгированным. Клиническая оценка препарата с миноциклина гидрохлоридом показала хорошие результаты на пациентах благодаря уменьшению глубины кармана и воспаления десен. *In vitro* данная система высвобождала 85 % активного вещества в течение трех дней.

Для лечения периодонтита M. P. Do et al. [42] предложена разработка *in situ* имплантата с доксициклина гиклатом в качестве активного антимикробного компонента на основе PLGA, растворенного в N-метил-пирролидоне, для введения в периодонтальный карман. Были оценены механические и адгезивные свойства имплантата, определена антибактериальная активность *in vitro*. Для увеличения адгезивной способности имплантата дополнительно были введены пластификаторы – ацетилтрибутилцитрат и дибутилцитрат.

T. Phaechamud et al. [63] был предложен гель, формируемый *in situ*, для введения в пародонтальный карман, также содержащий в качестве действующего вещества доксициклина гиклат и N-метил-пирролидон как биосовместимый растворитель, однако в качестве гелеобразователя использовался холестерин. В качестве пластификатора в систему добавляли бензилбензоат. Были исследованы такие свойства системы, как вязкость, реология, пригодность для

шприцевания, гелеобразование, высвобождение лекарственного вещества, биодеградация и антимикробная активность. Высвобождение лекарственного средства замедлялось при увеличении количества бензилбензоата, в то время как вязкость системы увеличивалась. Системы легко вводились в целевой участок из-за их минимальной силы шприцевания и эффективно подавляли рост микроорганизмов.

В исследовании [43] изучали пролонгированное высвобождение лекарственного средства из биоразлагаемых *in situ* имплантатов для местной доставки метронидазола в пародонтальные карманы. Исследовали влияние полимера (PLGA с кэпом или без него), типа растворителя (смешивающийся с водой или не смешивающийся с водой) и соотношения полимер / лекарственное вещество на высвобождение лекарственного вещества *in vitro*. Длительное высвобождение и низкий начальный выброс метронидазола демонстрировали имплантаты *in situ*, состоящие из блокированного PLGA и N-метил-пирролидона. Для того, чтобы увеличить время пребывания систем доставки *in vivo*, вводили мукоадгезивный полимер (натрий-карбоксиметилцеллюлозу). Это изменяло адгезивную способность, увеличивало вязкость и время высвобождения лекарственного вещества из имплантата.

В работе [64] для лечения периодонтита был предложен загруженный антимикробным агентом гель, формируемый *in situ*, с использованием в качестве матрицы биосовместимого гидрофобного материала – лауриновой кислоты. Гели на основе лауриновой кислоты, нагруженные ванкомицина гидрохлоридом, были приготовлены с использованием различных растворителей: N-метил-пирролидона, 2-пирролидона и диметилсульфоксида (ДМСО). Высокие концентрации лауриновой кислоты обеспечивали более быстрое гелеобразование, так же как и использование ДМСО в качестве растворителя. Система обеспечивала пролонгированное высвобождение лекарственного средства в течение 6 дней благодаря гидрофобным свойствам лауриновой кислоты и быстрому гелеобразованию, что замедляло диффузию ванкомицина гидрохлорида. Гель показал эффективную антимикробную активность при лечении периодонтита. Препарат обладал низкой вязкостью и высокой инъекционной способностью, что обеспечивало простоту его применения.

Описаны комбинированные *in situ* имплантаты, включающие хлоргексидин в качестве антисептического средства и ибупрофен в качестве противовоспалительного. Предлагаемые системы содержат как дигидрохлорид хлоргексидина, так и ибупрофен для обеспечения двойной антибактериальной и противовоспалительной активности для контроля инфекции воспалительной реакции в пародонтальных карманах. Были исследованы их механические и антимикробные свойства. Возможность шприцевания исследуемых жидких форм имплантатов *in situ* и механические свойства сформированных имплантатов определяли с помощью анализатора текстуры. Показано, что при увеличении лекарственной нагрузки усилие, необходимое для выталкивания состава из шприца, увеличивается. Предлагаемые составы затвердевали в пародонтальных карманах пациента, образуя твердые имплантаты, которые точно соответствуют размерам и геометрии полости кармана, что позволяет предполагать, что имплантаты будут оставаться в месте введения в течение необходимого периода времени. Имплантаты показали высокую антибактериальную активность при сохранении подходящих механических свойств. Одновременное высвобождение ибупрофена не уменьшало желаемого противомикробного действия хлоргексидина [44].

Известен и коммерчески доступен препарат Atridox®[1] (TOLMAR Inc., FortColin, CO, США) для лечения хронического периодонтита, представляющий собой *in situ* имплантат с контролируемым высвобождением.

Препарат состоит из двух преднаполненных шприцов: шприц А содержит 450 мг полимолочной кислоты (полимер-гелеборазователь), растворенной в N-метил-пирролидоне (биосовместимый растворитель), а шприц В – 50 мг доксициклина гиклата (антимикробное вещество). Конечный продукт представляет собой смешанное содержимое этих двух шприцев, содержащее 10 % доксициклина гиклата, которое также вводят непосредственно в пародонтальный карман. При контакте с тканью десны жидкость застывает, образуя депо, из которого лекарственное вещество высвобождается в течение 7 дней.

В работе [65] предложена система доставки лорноксикама, формирующая имплантаты *in situ*, для лечения стоматологической и послеоперационной боли. Исследовано два типа имплантатов: на полимерной и неполимерной основе. Растворы полимерных имплантатов были приготовлены с использованием различных концентраций поли-D-L-лактида или D-L-лактид/гликолидного сополимера. Неполимерные системы были приготовлены на основе различных концентраций липидов, таких как цетиловый спирт и стеариловый спирт, а также изобутирата ацетата сахарозы. Для оценки приготовленных смесей исследовали высвобождение действующего вещества *in vitro*, а также *in vivo* на модели кроликов. Полимерные системы показали высвобождение с очень медленной скоростью – в течение 72 часов. Исследование *in vivo* показало, что внутримышечно введенный *in situ* имплантат также демонстрирует длительный характер высвобождения. Таким образом, системы с лорноксикамом могут быть перспективными в качестве удобных инъекционных систем доставки с замедленным высвобождением для лечения стоматологической и послеоперационной боли.

[1] Atridox (Doxycycline Hyclate): Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning (rxlist.com). Доступно по: https://www.rxlist.com/atridox-drug.htm.Ссылка активна на 05.11.2021.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема обезболивания после хирургического вмешательства по удалению зубов очень актуальна в современной стоматологии. Своевременное и эффективное обезболивание является не только вопросом качества жизни пациента, но и целесообразности экономических затрат. Доступный на данный момент ассортимент лекарственных препаратов разных фармакологических групп, существующих в различных лекарственных формах, довольно широк, однако не может предложить систему доставки непосредственно в место вмешательства, которая бы сохранялась в альвеолярной лунке в течение постоперационного периода и обеспечивала контролируемое высвобождение лекарственного вещества и пролонгированное действие.

На основании рассмотренных в данном обзоре систем доставки можно сделать вывод, что разработка систем, формирующихся *in situ*, в том числе имплантатов, для лечения стоматологических заболеваний является перспективным направлением фармацевтической разработки, так как разработаны и активно изучаются *in situ* системы для решения таких стоматологических проблем, как мукозит ротовой полости и периодонтит. Таким образом, разработка стоматологического *in situ* имплантата для обезболивания в пострезекционной терапии обладает большим потенциалом.

Сведения о полимерах, на основе которых создаются *in situ* системы, их свойствах и особенностях (в том числе одного из наиболее популярных – PLGA), механизмах гелеобразования и биодеградации, поведении в условиях, приближенным к условиям *in vivo*, а также о биосовместимых растворителях и других вспомогательных веществах, должны лечь в основу фармацевтической разработки стоматологического *in situ* имплантата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бибик И. В., Житина И. А., Бибик Е. Ю. Современные аспекты применения нестероидных противовоспалительных средств в стоматологической практике. *Морфологический Альманах имени В. Г. Ковешникова*. 2019;17(1):86–95.
2. Tihan G. T., Rău I., Zgârian R. G., Ghica M. V. Collagen-based biomaterials for ibuprofen delivery. *Comptes Rendus Chimie*. 2016;19(3):390–394. DOI: 10.1016/j.crci.2015.09.008.
3. Костина И. Н. Терапия послеоперационной боли в амбулаторной практике стоматолога. *Проблемы Стоматологии*. 2011;(2):27–29.
4. Овечкин А. М. Послеоперационная боль: состояние проблемы и современные тенденции послеоперационного обезболивания. *Регионарная анестезия и лечение острой боли*. 2015;9(2):29–39.
5. American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. Practice guidelines for acute pain management in the perioperative setting: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. *Anesthesiology*. 2012;116(2):248–273. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31823c1030.
6. Кузин А. В. Терапия постоперационного синдрома в хирургической стоматологии. *Институт Стоматологии*. 2018;3(80):90–93.
7. Parekh S., Gardener C., Ashley P. F., Walsh T. Intraoperative local anaesthesia for reduction of postoperative pain following general anaesthesia for dental treatment in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014;(12):CD009742. DOI: 10.1002/14651858.CD009742.pub2.
8. Hu D., Onel E, Singla N., Kramer W. G., Hadzic A. Pharmacokinetic profile of liposome bupivacaine injection following a single administration at the surgical site. *Clinical Drug Investigation*. 2013;33(2):109–115. DOI: 10.1007/s40261-012-0043-z.
9. Saraghi M., Hersh E. V. Three newly approved analgesics: an update. *Anesthesia Progress*. 2013;60(4):178–187. DOI: 10.2344/0003-3006-60.4.178.
10. Paudel K. S., Milewski M., Swadley C. L., Brogden N. K., Ghosh P., Stinchcomb A. L. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Therapeutic Delivery*. 2010;1(1):109–131. DOI: 10.4155/tde.10.16.
11. Becker D. E. Pain management: Part 1: Managing acute and postoperative dental pain. *Anesthesia Progress*. 2010;57(2):67–79. DOI: 10.2344/0003-3006-57.2.67.
12. Hersh E. V., Moore P. A., Grosser T., Polomano R. C., Farrar J. T., Saraghi M., Juska S. A., Mitchell C. H., Theken K. N. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and opioids in postsurgical dental pain. *Journal of Dental Research*. 2020;99(7):777–786. DOI: 10.1177/0022034520914254.
13. Moore P. A., Ziegler K. M., Lipman R. D., Aminoshariae A., Carrasco-Labra A., Mariotti A. Benefits and harms associated with analgesic medications used in the management of acute dental pain: An overview of systematic reviews. *The Journal of the American Dental Association*. 2018;149(4):256–265. DOI: 10.1016/j.adaj.2018.02.012.
14. Ткаченко Т. Б., Фархуллин А. И., Фархуллина А. С. Альтернативные методы местного обезболивания в стоматологии (обзор литературы). *Вестник Новых Медицинских Технологий*. 2020;14(6):24–29. DOI: 10.24411/2075-4094-2020-16759.
15. Hopkins K. A., Vike N., Li X., Kennedy J., Simmons E., Rispoli J., Solorio L. Noninvasive characterization of in situ forming implant diffusivity using diffusion-weighted MRI. *Journal of Controlled Release*. 2019;309:289–301. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.019.
16. Weiniger C. F., Golovanevski L., Domb A. J., Ickowicz D. Extended release formulations for local anaesthetic agents. *Anaesthesia*. 2012;67(8):906–916.
17. Vezeau P. J. Dental extraction wound management: medicating postextraction sockets. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000;58(5):531–537. DOI: 10.1016/s0278-2391(00)90016-8.
18. Shepherd S. D., O'Buckley S. C., Harrington J. M., Haines L. G., Rothrock G. D., Johnson L. M., Nackley A. G. A moldable sustained release bupivacaine formulation for tailored treatment of postoperative dental pain. *Scientific Reports*. 2018;8(12172):1–9. DOI: 10.1038/s41598-018-29696-w.
19. De Araújo D. R., Ribeiro L. N. M., de Paula E. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019;16(7):701–714. DOI: 10.1080/17425247.2019.1629415.
20. Pandit A. P., Pol V. V., Kulkarni V. S. Xyloglucan based in situ gel of lidocaine HCl for the treatment of periodontosis. *Journal of Pharmaceutics*. 2016;2016:1–9. DOI: 10.1155/2016/3054321.
21. Davoudi A., Rismanchian M., Akhavan A., Nosouhian S., Bajoghli F., Haghighat A., Arbabzadeh F., Samimi P., Fiez A., Shadmehr E., Tabari K., Jahadi S. A brief review on the efficacy of different possible and nonpharmacological techniques in eliminating discomfort of local anesthesia injection during dental procedures. *Anesthesia, Essays and Researches*. 2016;10(1):13–16. DOI: 10.4103/0259-1162.167846.
22. Etikala A., Tattan M., Askar H., Wang H. L. Effects of NSAIDs on Periodontal and Dental Implant Therapy. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*. 2019;40(2):e1–e9.
23. Pergolizzi J. V., Magnusson P., LeQuang J. A., Gharibo C., Varrassi G. The pharmacological management of dental pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2020;21(5):591–601. DOI: 10.1080/14656566.2020.1718651.
24. Матюшкин А. И., Иванова Е. А. Эффективность, безопасность и фармакокинетические характеристики нестероидных противовоспалительных препаратов в лекарственных формах для наружного применения (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(5):490–493. DOI: 10.1007/s11094-021-02446-5.
25. Турнаева Е. А. Современный взгляд на лечение постэкстракционного альвеолита в хирургической стоматологической практике. *Международный студенческий научный вестник*. 2018;(1):38.

26. Иорданишвили А. К., Пономарёв А. А., Музыкин М. И., Сериков А. А., Жмудь М. В., Гук В. А., Лысков Н. В., Коровин Н. В., Балин Д. В., Самсонов В. В., Холод Р. Н., Лобейко В. В., Заборовский К. А., Солдатов С. В., Пирожинский В. В., Амро А., Лыкова И. В. Сравнительная оценка эффективности средств для лечения альвеолита. *Институт Стоматологии*. 2017;1(74):51–53.
27. Mathew A., Lee S., Ha W., Nagendrababu V., Rossi-Fedele G. Microbial contamination comparison between cotton pellet and polytetrafluoroethylene tape endodontic spacers: A Systematic Review. *European Endodontic Journal*. 2021;6(2):143–150. DOI: 10.14744/eej.2021.52244.
28. Tihan G, Ungureanu C., Barbaresso R. C., Zgărian R. G., Rău I., Meghea A., Albu Kaya M. G., Ghica M. V. Chloramphenicol collagen sponges for local drug delivery in dentistry. *Comptes Rendus Chimie*. 2015;18(9):986–992. DOI: 10.1016/j.crci.2015.06.004.
29. Ioan D.-C., Rău I., Albu Kaya M. G., Radu N., Bostan M., Zgârian R. G., Tihan G. T., Dinu-Pîrvu C. E., Lupuliasa A., Ghica M. V. Ciprofloxacin-Collagen-Based materials with potential oral surgical applications. *Polymers*. 2020;12(9):1915. DOI: 10.3390/polym12091915.
30. Imhof C., Schlösser L., Stiefel N., Wüest M. Collagen Sponge. European patent EP3034103A1. 2016 Jun. 2022. Available at: https://patents.google.com/patent/EP3034103A1/en. Accessed: 05.11.2021.
31. Felician F. F., Xia C., Qi W., Xu H. Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. *Chemistry & Biodiversity*. 2018;15(5):e1700557. DOI: 10.1002/cbdv.201700557.
32. Kanwar N., Sinha V. R. In situ forming depot as sustained-release drug delivery systems. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2019;36(2):93–136. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018025013.
33. Wanasathop A., Murawsky M., Li S. K. Modification of small dissolution chamber system for long-acting periodontal drug product evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;618:121646. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.121646.
34. Сурья Н., Бхаттачарья С. PLGA – перспективный полимер для доставки лекарственных средств. *Фармация и Фармакология*. 2021;9(5):334–345. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-5-334-345.
35. Ding D., Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Materials Science & Engineering: C*. 2018;92:1041–1060. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-5-334-34510.1016/j.msec.2017.12.036.
36. Nair L., Laurencin C. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007;32:762–798. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
37. Kapoor D. N., Bhatia A., Kaur R., Sharma R., Kaur G., Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 2015;6(1):41–58. DOI: 10.4155/tde.14.91.
38. Sheshala R., Hong G. C., Yee W. P., Meka V. S., Thakur R. R. S. In situ forming phase-inversion implants for sustained ocular delivery of triamcinolone acetonide. *Drug Delivery and Translational Research*. 2019;9(2):534–542. DOI: 10.1007/s13346-018-0491-y.
39. Bode C., Kranz H., Siepmann F., Siepmann J. In-situ forming PLGA implants for intraocular dexamethasone delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;548(1):337–348. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.013.
40. Kamali H., Khodaverdi E, Hadizadeh F, Mohajeri S. A. In-vitro, ex-vivo, and in-vivo evaluation of buprenorphine HCl release from an in situ forming gel of PLGA-PEG-PLGA using N-methyl-2-pyrrolidone as solvent. *Materials Science and Engineering: C.* 2019;96:561–575. DOI: 10.1016/j.msec.2018.11.058.
41. Zhang Q., Fassihi R. Release rate determination from in situ gel forming PLGA implant: a novel 'shape-controlled basket in tube' method. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020;72(8):1038–1048. DOI: 10.1111/jphp.13277.
42. Do M. P., Neut C., Delcourt E., Seixas Certo T., Siepmann J., Siepmann F. In situ forming implants for periodontitis treatment with improved adhesive properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014;88(2):342–350. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.05.006.
43. Kilicarslan M., Koerber M., Bodmeier R. In situ forming implants for the delivery of metronidazole to periodontal pockets: formulation and drug release studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014;40(5):619–624. DOI: 10.3109/03639045.2013.873449.
44. Agossa K., Delepierre A., Lizambard M., Delcourt-Debruyne E., Siepmann J., Siepmann F., Neut C. In-situ forming implants for dual controlled release of chlorhexidine and ibuprofen for periodontitis treatment: Microbiological and mechanical key properties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;60:101956. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101956.
45. Тимченко Т. В., Погорелый В. Е., Воронков А. В., Макарова Л. М., Щербакова Л. И., Компанцев В. А., Медвецкий А. И., Платонова А. Ю. Экспериментальное изучение антитромбоцитарной активности микрочастиц пентоксифиллина на основе поли-DL-лактид-ко-гликолида в сравнении с пентоксифиллином. *Фармация и фармакология*. 2019;7(2):97–104. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-2-97-104.
46. Paillard-Giteau A, Tran V. T., Thomas O., Garric X., Coudane J., Marchal S., Chourpa I., Benoît J. P., Montero-Menei C. N., Venier-Julienne M. C. Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;75(2):128–136. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.03.005.
47. Houchin M. L., Topp E. M. Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(7):2395–2404. DOI: 10.1002/jps.21176.
48. Hasnain M. S., Kiran V., Kurakula M., Rao G. K., Tabish M., Nayak A. K. Use of alginates for drug delivery in dentistry. *Alginates in Drug Delivery*. 2020:387–404. DOI: 10.1016/B978-0-12-817640-5.00015-7.
49. Bernkop-Schnürch A., Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012;81(3):463–469. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.007.
50. Okur N. Ü., Yağcılar A. P., Siafaka P. I. Promising polymeric drug carriers for local delivery: The Case of in situ Gels. *Current Drug Delivery*. 2020;17(8):675–693. DOI: 10.2174/1567201817666200608145748.
51. Bansal M., Mittal N., Yadav S. K., Khan G., Gupta P., Mishra B., Nath G. Periodontal thermoresponsive, mucoadhesive dual antimicrobial loaded in-situ gel for the treatment of periodontal disease: Preparation, in-vitro characterization and antimicrobial study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2018;8(2):126–133. DOI: 10.1016/j.jobcr.2017.12.005.
52. Загорулько Е. Ю., Караваева А. С. Подходы к выбору вспомогательных веществ для геля стоматологического с цетилпиридиния хлоридом. *Фармация и Фармакология*. 2021;9(1):54–63. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-54-63.
53. Bakhrushina E., Anurova M., Demina N., Kashperko A., Rastopchina O., Bardakov A., Krasnyuk I. Comparative study of the mucoadhesive properties of polymers for pharmaceutical use. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2020;8(A):639–645. DOI: 10.3889/oamjms.2020.4930.
54. Suh M. S., Kastellorizios M., Tipnis N., Zou Y., Wang Y., Choi S., Burgess D. J. Effect of implant formation on drug release kinetics of in situ forming implants. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;592:120105. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120105.
55. Robinson M. R., Burke J. A., Schiffman R. M., Ghebremeskel A. N. Intracameral sustained release therapeutic agent implants. United States patent US10278919B2. 2014 Feb. 11. Available at: https://patents.google.com/patent/US10278919B2/en. Accessed: 05.11.2021.
56. Robinson M. R., Burke J. A., Liu H., Orilla W. C., Spada L. T., Whitcup S., Ghebremskel A. N., Hughes P. M., Xu K., Do M. M. Intraocular sustained release drug delivery systems and methods for treating ocular conditions. United States patent US20100247606A1. 2010 Sep. 30. Available at: https://patents.google.com/patent/US20100247606A1/en?oq=US2010%2f0247606A1. Accessed: 05.11.2021.
57. Norton R., Watkins A., Zhou M. Injectable flowable composition comprising buprenorphine. United Kingdom patent GB2513267A. 2014 Oct. 22. Available at: https://patents.google.com/patent/GB2513267A/en?oq=GB+2513267+A. Accessed: 05.11.2021.
58. Vigani B., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M. C., Caramella C. M., Ferrari F. Recent advances in the development of in situ gelling drug delivery systems for non-parenteral administration routes. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):859. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090859.
59. Rossi S., Marciello M., Bonferoni M. C., Ferrari F., Sandri G., Dacarro C., Grisoli P., Caramella, C. Thermally sensitive gels based on chitosan derivatives for the treatment of oral mucositis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(2):248–254. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.10.003.

60. Vigani B., Faccendini A., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M. C., Gentile M., Ferrari F. Development of a mucoadhesive and in situ gelling formulation based on κ-Carrageenan for application on oral mucosa and esophagus walls. I. A Functional In Vitro Characterization. *Marine Drugs*. 2019;17(2):112. DOI: 10.3390/md17020112.
61. Sandri G., Bonferoni M. C., Ferrari F., Rossi S., Del Fante C., Perotti C., Gallanti A., Caramella C. An in situ gelling buccal spray containing platelet lysate for the treatment of oral mucositis. *Current Drug Discovery Technologies*. 2011;8(3):277–285. DOI: 10.2174/157016311796799017.
62. Kassem A. A., Ismail F. A., Naggar V. F., Aboulmagd E. Comparative study to investigate the effect of meloxicam or minocycline HCl in situ gel system on local treatment of periodontal pockets. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(4):1021–1028. DOI: 10.1208/s12249-014-0118-7.
63. Phaechamud T., Setthajindalert O. Cholesterol in situ forming gel loaded with doxycycline hyclate for intra-periodontal pocket delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;99:258–265. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.12.023.
64. Chantadee T., Santimaleeworagun W., Phorom Y., Chuenbarn T., Phaechamud T. Vancomycin HCl-loaded lauric acid in situ-forming gel with phase inversion for periodontitis treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;57:101615. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101615.
65. Yehia S. A., Halim S. A. A., Aziz M. Y. Polymeric and non polymeric injectable in-situ forming implant systems for sustained delivery of lornoxicam: in vitro and in vivo evaluation. *Current Drug Delivery*. 2018;15(8):1193–1203. DOI: 10.2174/1567201815666180320101125.

REFERENCES

1. Bibik I. V., Zhitina I. A., Bibik E. Yu. Modern aspects of the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in dental practice. *Morfologicheskiy al'manakh imeni V. G. Koveshnikova*. 2019;17(1):86–95. (In Russ.)
2. Tihan G. T., Rău I., Zgârian R. G., Ghica M. V. Collagen-based biomaterials for ibuprofen delivery. *Comptes Rendus Chimie*. 2016;19(3):390–394. DOI: 10.1016/j.crci.2015.09.008.
3. Kostina I. N. Therapy of postoperative pain in the outpatient practice of a dentist. *Actual Problems in Dentistry*. 2011;(2):27–29. (In Russ.)
4. Ovechkin A. M. Postoperative pain: state of the problem and current trends in postoperative pain relief. *Regional anesthesia and acute pain management*. 2015;9(2):29–39. (In Russ.)
5. American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. Practice guidelines for acute pain management in the perioperative setting: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. *Anesthesiology*. 2012;116(2):248–273. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31823c1030.
6. Kuzin A. V. Therapy of postoperative syndrome in surgical dentistry. *The Dental Institute*. 2018;3(80):90–93. (In Russ.)
7. Parekh S., Gardener C., Ashley P. F., Walsh T. Intraoperative local anaesthesia for reduction of postoperative pain following general anaesthesia for dental treatment in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014;(12):CD009742. DOI: 10.1002/14651858.CD009742.pub2.
8. Hu D., Onel E, Singla N., Kramer W. G., Hadzic A. Pharmacokinetic profile of liposome bupivacaine injection following a single administration at the surgical site. *Clinical Drug Investigation*. 2013;33(2):109–115. DOI: 10.1007/s40261-012-0043-z.
9. Saraghi M., Hersh E. V. Three newly approved analgesics: an update. *Anesthesia Progress*. 2013;60(4):178–187. DOI: 10.2344/0003-3006-60.4.178.
10. Paudel K. S., Milewski M., Swadley C. L., Brogden N. K., Ghosh P., Stinchcomb A. L. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Therapeutic Delivery*. 2010;1(1):109–131. DOI: 10.4155/tde.10.16.
11. Becker D. E. Pain management: Part 1: Managing acute and postoperative dental pain. *Anesthesia Progress*. 2010;57(2):67–79. DOI: 10.2344/0003-3006-57.2.67.
12. Hersh E. V., Moore P. A., Grosser T., Polomano R. C., Farrar J. T., Saraghi M., Juska S. A., Mitchell C. H., Theken K. N. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and opioids in postsurgical dental pain. *Journal of Dental Research*. 2020;99(7):777–786. DOI: 10.1177/0022034520914254.
13. Moore P. A., Ziegler K. M., Lipman R. D., Aminoshariae A., Carrasco-Labra A., Mariotti A. Benefits and harms associated with analgesic medications used in the management of acute dental pain: An overview of systematic reviews. *The Journal of the American Dental Association*. 2018;149(4):256–265. DOI: 10.1016/j.adaj.2018.02.012.
14. Tkachenko T. B., Farkhullin A. I., Farkhullina A. S. Alternative methods of local anesthesia in the dentistry (literature review). *Journal of New Medical Technologies*. 2020;14(6):24–29. (In Russ.) DOI: 10.24411/2075-4094-2020-16759.
15. Hopkins K. A., Vike N., Li X., Kennedy J., Simmons E., Rispoli J., Solorio L. Noninvasive characterization of in situ forming implant diffusivity using diffusion-weighted MRI. *Journal of Controlled Release*. 2019;309:289–301. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.07.019.
16. Weiniger C. F., Golovanevski L., Domb A. J., Ickowicz D. Extended release formulations for local anaesthetic agents. *Anaesthesia*. 2012;67(8):906–916.
17. Vezeau P. J. Dental extraction wound management: medicating postextraction sockets. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000;58(5):531–537. DOI: 10.1016/s0278-2391(00)90016-8.
18. Shepherd S. D., O'Buckley S. C., Harrington J. M., Haines L. G., Rothrock G. D., Johnson L. M., Nackley A. G. A moldable sustained release bupivacaine formulation for tailored treatment of postoperative dental pain. *Scientific Reports*. 2018;8(12172):1–9. DOI: 10.1038/s41598-018-29696-w.
19. De Araújo D. R., Ribeiro L. N. M., de Paula E. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019;16(7):701–714. DOI: 10.1080/17425247.2019.1629415.
20. Pandit A. P., Pol V. V., Kulkarni V. S. Xyloglucan based in situ gel of lidocaine HCl for the treatment of periodontosis. *Journal of Pharmaceutics*. 2016;2016:1–9. DOI: 10.1155/2016/3054321.
21. Davoudi A., Rismanchian M., Akhavan A., Nosouhian S., Bajoghli F., Haghighat A., Arbabzadeh F., Samimi P., Fiez A., Shadmehr E., Tabari K., Jahadi S. A brief review on the efficacy of different possible and nonpharmacological techniques in eliminating discomfort of local anesthesia injection during dental procedures. *Anesthesia, Essays and Researches*. 2016;10(1):13–16. DOI: 10.4103/0259-1162.167846.
22. Etikala A., Tattan M., Askar H., Wang H. L. Effects of NSAIDs on Periodontal and Dental Implant Therapy. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*. 2019;40(2):e1–e9.
23. Pergolizzi J. V., Magnusson P., LeQuang J. A., Gharibo C., Varrassi G. The pharmacological management of dental pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2020;21(5):591–601. DOI: 10.1080/14656566.2020.1718651.
24. Matyushkin A. I., Ivanova E. A. Efficacy and Safety of Topical Dosage Forms of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and their Pharmacokinetic Determinants (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(5):490–493. (In Russ.) DOI: 10.1007/s11094-021-02446-5.
25. Turnaeva E. A. Modern view on treatment of the post-extracting alveolitis in surgical stomatologic practice. *International Student Scientific Magazine*. 2018;(1):38. (In Russ.)
26. Iordanishvili A. K., Ponomarev A. A., Muzykin M. I., Serikov A. A., Zhmud' M. V., Guk V. A., Lyskov N. V., Korovin N. V., Balin D. V., Samsonov V. V., Kholod R. N., Lobeyko V. V., Zaborovskiy K. A., Soldatov S. V., Pirozhinskiy V. V., Amro A., Lykova I. V. Comparative assessment of efficiency medicinal agents for treatment of the alveolitis. *The Dental Institute*. 2017;1(74):51–53. (In Russ.)
27. Mathew A., Lee S., Ha W., Nagendrababu V., Rossi-Fedele G. Microbial contamination comparison between cotton pellet and polytetrafluoroethylene tape endodontic spacers: A Systematic Review. *European Endodontic Journal*. 2021;6(2):143–150. DOI: 10.14744/eej.2021.52244.
28. Tihan G, Ungureanu C., Barbaresso R. C., Zgărian R. G., Rău I., Meghea A., Albu Kaya M. G., Ghica M. V. Chloramphenicol collagen sponges for local drug delivery in dentistry. *Comptes Rendus Chimie*. 2015;18(9):986–992. DOI: 10.1016/j.crci.2015.06.004.
29. Ioan D.-C., Rău I., Albu Kaya M. G., Radu N., Bostan M., Zgârian R. G., Tihan G. T., Dinu-Pîrvu C. E., Lupuliasa A., Ghica M. V. Ciprofloxacin-Collagen-Based materials with potential oral surgical applications. *Polymers*. 2020;12(9):1915. DOI: 10.3390/polym12091915.
30. Imhof C., Schlösser L., Stiefel N., Wüest M., inventors. Collagen Sponge. European patent EP3034103A1. 2016 Jun 2022. Available at: https://patents.google.com/patent/EP3034103A1/en. Accessed: 05.11.2021.

31. Felician F. F., Xia C., Qi W., Xu H. Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. *Chemistry & Biodiversity*. 2018;15(5):e1700557. DOI: 10.1002/cbdv.201700557.
32. Kanwar N., Sinha V. R. In situ forming depot as sustained-release drug delivery systems. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2019;36(2):93–136. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018025013.
33. Wanasathop A., Murawsky M., Li S. K. Modification of small dissolution chamber system for long-acting periodontal drug product evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;618:121646. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.121646.
34. Surya N., Bhattacharyya S. PLGA – the smart polymer for drug delivery. Pharmacy & Pharmacology. 2021;9(5):334–345. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-5-334-345.
35. Ding D., Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Materials Science & Engineering: C*. 2018;92:1041–1060. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-5-334-34510.1016/j.msec.2017.12.036.
36. Nair L., Laurencin C. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007;32:762–798. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
37. Kapoor D. N., Bhatia A., Kaur R., Sharma R., Kaur G., Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 2015;6(1):41–58. DOI: 10.4155/tde.14.91.
38. Sheshala R., Hong G. C., Yee W. P., Meka V. S., Thakur R. R. S. In situ forming phase-inversion implants for sustained ocular delivery of triamcinolone acetonide. *Drug Delivery and Translational Research*. 2019;9(2):534–542. DOI: 10.1007/s13346-018-0491-y.
39. Bode C., Kranz H., Siepmann F., Siepmann J. In-situ forming PLGA implants for intraocular dexamethasone delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;548(1):337–348. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.013.
40. Kamali H., Khodaverdi E, Hadizadeh F, Mohajeri S. A. In-vitro, ex-vivo, and in-vivo evaluation of buprenorphine HCl release from an in situ forming gel of PLGA-PEG-PLGA using N-methyl-2-pyrrolidone as solvent. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;96:561–575. DOI: 10.1016/j.msec.2018.11.058.
41. Zhang Q., Fassihi R. Release rate determination from in situ gel forming PLGA implant: a novel 'shape-controlled basket in tube' method. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020;72(8):1038–1048. DOI: 10.1111/jphp.13277.
42. Do M. P., Neut C., Delcourt E., Seixas Certo T., Siepmann J., Siepmann F. In situ forming implants for periodontitis treatment with improved adhesive properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014;88(2):342–350. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.05.006.
43. Kilicarslan M., Koerber M., Bodmeier R. In situ forming implants for the delivery of metronidazole to periodontal pockets: formulation and drug release studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2014;40(5):619–624. DOI: 10.3109/03639045.2013.873449.
44. Agossa K., Delepierre A., Lizambard M., Delcourt-Debruyne E., Siepmann J., Siepmann F., Neut C. In-situ forming implants for dual controlled release of chlorhexidine and ibuprofen for periodontitis treatment: Microbiological and mechanical key properties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;60:101956. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101956.
45. Timchenko T. V., Pogorelyi V. E., Voronkov A. V., Makarova L. M., Scherbakova L. I., Kompantsev V. A., Medvetskyi A. I., Platonova A. Y. Experimental study of anti-thrombotic activity of pentoxyfillin microparticles: based on poly-DL-lactide-co-glycolide in comparison with pentoxyfillin. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(2):97–104. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-2-97-104.
46. Paillard-Giteau A, Tran V. T., Thomas O., Garric X., Coudane J., Marchal S., Chourpa I., Benoît J. P., Montero-Menei C. N., Venier-Julienne M. C. Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;75(2):128–136. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.03.005.
47. Houchin M. L., Topp E. M. Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(7):2395–2404. DOI: 10.1002/jps.21176.
48. Hasnain M. S., Kiran V., Kurakula M., Rao G. K., Tabish M., Nayak A. K. Use of alginates for drug delivery in dentistry. *Alginates in Drug Delivery*. 2020:387–404. DOI: 10.1016/B978-0-12-817640-5.00015-7.
49. Bernkop-Schnürch A., Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012;81(3):463–469. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.007.
50. Okur N. Ü., Yağcılar A. P., Siafaka P. I. Promising polymeric drug carriers for local delivery: The Case of in situ Gels. *Current Drug Delivery*. 2020;17(8):675–693. DOI: 10.2174/1567201817666200608145748.
51. Bansal M., Mittal N., Yadav S. K., Khan G., Gupta P., Mishra B., Nath G. Periodontal thermoresponsive, mucoadhesive dual antimicrobial loaded in-situ gel for the treatment of periodontal disease: Preparation, in-vitro characterization and antimicrobial study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2018;8(2):126–133. DOI: 10.1016/j.jobcr.2017.12.005.
52. Zagorulko E. Yu., Karavaeva A. S. Approached to the selection of excipients for dental gel with cetylpyridinium chloride. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(1):54–63. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-1-54-63.
53. Bakhrushina E., Anurova M., Demina N., Kashperko A., Rastopchina O., Bardakov A., Krasnyuk I. Comparative study of the mucoadhesive properties of polymers for pharmaceutical use. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2020;8(A):639–645. DOI: 10.3889/oamjms.2020.4930.
54. Suh M. S., Kastellorizios M., Tipnis N., Zou Y., Wang Y., Choi S., Burgess D. J. Effect of implant formation on drug release kinetics of in situ forming implants. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;592:120105. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120105.
55. Robinson M. R., Burke J. A., Schiffman R. M., Ghebremeskel A. N. Intracameral sustained release therapeutic agent implants. United States patent US10278919B2. 2014 Feb. 11. Available at: https://patents.google.com/patent/US10278919B2/en. Accessed: 05.11.2021.
56. Robinson M. R., Burke J. A., Liu H., Orilla W. C., Spada L. T., Whitcup S., Ghebremskel A. N., Hughes P. M., Xu K., Do M. M. Intraocular sustained release drug delivery systems and methods for treating ocular conditions. United States patent US20100247606A1. 2010 Sep. 30. Available at: https://patents.google.com/patent/US20100247606A1/en?oq=US2010%2f0247606A1. Accessed: 05.11.2021.
57. Norton R., Watkins A., Zhou M. Injectable flowable composition comprising buprenorphine. United Kingdom patent GB2513267A. 2014 Oct. 22. Available at: https://patents.google.com/patent/GB2513267A/en?oq=GB+2513267+A. Accessed: 05.11.2021.
58. Vigani B., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M. C., Caramella C. M., Ferrari F. Recent advances in the development of in situ gelling drug delivery systems for non-parenteral administration routes. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):859. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090859.
59. Rossi S., Marciello M., Bonferoni M. C., Ferrari F., Sandri G., Dacarro C., Grisoli P., Caramella, C. Thermally sensitive gels based on chitosan derivatives for the treatment of oral mucositis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(2):248–254. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.10.003.
60. Vigani B., Faccendini A., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M. C., Gentile M., Ferrari F. Development of a mucoadhesive and in situ gelling formulation based on κ-Carrageenan for application on oral mucosa and esophagus walls. I. A Functional In Vitro Characterization. *Marine Drugs*. 2019;17(2):112. DOI: 10.3390/md17020112.
61. Sandri G., Bonferoni M. C., Ferrari F., Rossi S., Del Fante C., Perotti C., Gallanti A., Caramella C. An in situ gelling buccal spray containing platelet lysate for the treatment of oral mucositis. *Current Drug Discovery Technologies*. 2011;8(3):277–285. DOI: 10.2174/157016311796799017.
62. Kassem A. A., Ismail F. A., Naggar V. F., Aboulmagd E. Comparative study to investigate the effect of meloxicam or minocycline HCl in situ gel system on local treatment of periodontal pockets. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(4):1021–1028. DOI: 10.1208/s12249-014-0118-7.
63. Phaechamud T., Setthajindalert O. Cholesterol in situ forming gel loaded with doxycycline hyclate for intra-periodontal pocket delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;99:258–265. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.12.023.
64. Chantadee T., Santimaleeworagun W., Phorom Y., Chuenbarn T., Phaechamud T. Vancomycin HCl-loaded lauric acid in situ-forming gel with phase inversion for periodontitis treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;57:101615. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101615.
65. Yehia S. A., Halim S. A. A., Aziz M. Y. Polymeric and non polymeric injectable in-situ forming implant systems for sustained delivery of lornoxicam: in vitro and in vivo evaluation. *Current Drug Delivery*. 2018;15(8):1193–1203. DOI: 10.2174/1567201815666180320101125.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1624
УДК 615.1; 615.322

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Методы определения афлатоксинов и охратоксина А в лекарственном растительном сырье (обзор)

У. В. Иванова[1]✉, И. В. Гравель[1, 2]

[1] 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, 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

✉ **Контактное лицо:** Иванова Ульяна Валерьевна. **E-mail:** ivanova.uliana@spcpu.ru

ORCID: У. В. Иванова – https://orcid.org/0000-0002-8962-9133; И. В. Гравель – https://orcid.org/0000-0002-3735-2291.

Статья поступила: 25.10.2023 **Статья принята в печать:** 25.12.2023 **Статья опубликована:** 09.01.2024

Резюме

Введение. Афлатоксины и охратоксин А представляют собой вторичные метаболиты микроскопических плесневых грибов и несут серьезную угрозу здоровью человека и животных. Данные токсины являются канцерогенными, тератогенными, гепатотоксичными, нефротоксичными веществами, также классифицированы Международным агентством по изучению рака (IARC) как канцерогены IA и IIB класса. В настоящее время предельно допустимые концентрации афлатоксинов и охратоксина А в Российской Федерации регулируются только в продуктах питания на основании технического регламента Таможенного союза 021 «О безопасности пищевой продукции», лекарственное растительное сырье не регламентируется. Неблагоприятные экологические и биологические условия (температура, влажность, качество воздуха, насекомые и т. д.) на этапах послеуборочной обработки и хранения могут способствовать заражению плесневыми грибами, что может привести к контаминации лекарственного сырья афлатоксинами и охратоксином А. В связи с этим важным этапом контроля качества сырья является изучение методов анализа, которые используются в современной аналитической практике, и выбор чувствительного метода для обнаружения данных токсинов.

Текст. В данном обзоре были рассмотрены существующие методы очистки проб, использующиеся на этапе пробоподготовки: твердофазная экстракция, иммуноаффинная колонка, QuEChERS. Были изучены все современные методы анализа для идентификации афлатоксинов и охратоксина А в лекарственном растительном сырье: тонкослойная хроматография, жидкостная хроматография, газовая хроматография и скрининговые методы.

Заключение. В качестве наиболее востребованного метода при подготовке проб к анализу был выделен метод QuEChERS, основанный на технологии экстракции твердых фаз. Этот метод сочетает в себе вариабельность подходов к очистке пробы и позволяет исследовать более широкий спектр токсинов. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, обладающий высокой селективностью, многокомпонентностью анализа и низкими пределами обнаружения, был выделен как самый востребованный метод для проведения качественного и количественного анализа.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырье, афлатоксины, охратоксин А, методы анализа, отбор проб, очистка

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

Вклад авторов. Авторы совместно осуществили сбор материалов, анализ и систематизацию литературных данных по методам определения афлатоксинов и охратоксина А в лекарственном растительном сырье. Все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов и в написании текста статьи.

Для цитирования: Иванова У. В., Гравель И. В. Методы определения афлатоксинов и охратоксина А в лекарственном растительном сырье. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):95–109. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1624

Methods for the Determination of Aflatoxins and Ochratoxin A in Medicinal Plant Raw Materials (Review)

Ulyana V. Ivanova[1]✉, Irina V. Gravel[1, 2]

[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

✉ **Corresponding author:** Ulyana V. Ivanova. **E-mail:** ivanova.uliana@spcpu.ru

ORCID: Ulyana V. Ivanova – https://orcid.org/0000-0002-8962-9133; Irina V. Gravel – https://orcid.org/0000-0002-3735-2291.

Received: 25.10.2023 **Revised:** 25.12.2023 **Published:** 09.01.2024

Abstract

Introduction. Aflatoxins and ochratoxin A are secondary metabolites of microscopic mold fungi. They seriously threaten human and animal health. These toxins are carcinogenic, teratogenic, hepatotoxic, nephrotoxic substances. International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified them as class IA and IIB carcinogens. The maximum permissible concentrations of aflatoxins and ochratoxin A in the Russian Federation are currently regulated only in food products according to the Technical Regulation of the Customs Union 021 "On Food Safety". The content of aflatoxins and

© Иванова У. В., Гравель И. В., 2024
© Ivanova U. V., Gravel I. V., 2024

ochratoxin A in medicinal plant raw materials is not regulated in any way. Harmful environmental and biological conditions such as temperature, humidity, air quality, insects and others during post-harvest handling can lead to contamination of medicinal raw materials with aflatoxins and ochratoxin A. Therefore, the detection of these toxins is one of the problems of raw materials quality control.

Text. The present review summarizes the following methods of sample purification, used at the sample preparation stage: solid-phase extraction, immunoaffin column and QuEChERS. This review also summarizes the following modern analysis methods for the identification of aflatoxin and ochratoxin A in medicinal plant raw materials: thin-layer chromatography, liquid chromatography, gas chromatography and screening methods.

Conclusion. The QuEChERS method has been identified as the most popular method for preparing samples for analysis. It is based on solid phase extraction technology. This method combines the variability of approaches to sample purification and allows people to study a wider range of toxins. The high-performance liquid chromatography method has been identified as the most popular method for qualitative and quantitative analysis. It has high selectivity, multicomponent analysis and low detection limits.

Keywords: medicinal plant raw materials, aflatoxins, ochratoxin A, analysis methods, sampling, purification

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

Contribution of the authors. The authors jointly collected materials, analyzed and systematized literature data on methods for determining aflatoxins and ochratoxin A in medicinal plant raw materials. All the authors participated in the discussion of the results obtained and in writing the text of the article.

For citation: Ivanova U. V., Gravel I. V. Methods for the determination of aflatoxins and ochratoxin A in medicinal plant raw materials. *Drug development & registration*. 2024;13(1):95–109. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1624

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что *микотоксины* (МТ) – вторичные метаболиты плесневых грибов, которые оказывают неблагоприятные воздействие на человека, животных, сельскохозяйственные культуры. Они обладают канцерогенными, тератогенными, мутагенными свойствами, оказывают гепатотоксическое, нефротоксическое действие, могут поражать нервную и иммунную системы [1–3].

В настоящее время насчитывается более 400 различных видов МТ, среди которых афлатоксины (АФЛ) и охратоксин А (ОТА) оказывают наиболее опасное воздействие на человека из-за их токсических и канцерогенных свойств. АФЛ представляют собой органические соединения, относятся к классу поликетидов и включают четыре основных типа МТ: B_1, B_2, G_1, G_2. Основными продуцентами АФЛ являются грибы Asp*ergillus flavus, A. parasiticus*, распространенные в мире практически повсеместно [4–6]. Охратоксины включают 3 вида токсинов: A, B и C. ОТА – наиболее распространенный и токсичный из них. ОТА вырабатывается грибами рода *Penicillium verrucosum, P. nordicum, Aspergillus niger, A. ochraceus u A. carbonarius* в различных условиях окружающей среды. АФЛ и ОТА были классифицированы как канцерогены IA и IIB класса Международным агентством по исследованию рака [7–9]. На рисунке 1 приведены основные структурные формулы АФЛ и ОТА.

За последнее десятилетие значительно расширилось использование растительных препаратов во всем мире. Они являются важной частью систем здравоохранения в Африке, Китае, Индии, а также во многих других странах [10–11]. В странах, имеющих налаженную структуру здравоохранения, также широко стало распространяться использование лекарственных средств растительного происхождения как дополнительной терапии [12]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), больше чем 100 миллионов жителей Европы в современное время пользуется традиционной и комплементарной медициной[1].

Загрязнение продуктов питания и продовольственного сырья АФЛ и ОТА контролируется законодательными ограничениями: в Европейском союзе – регламент 2023/915[2] от 25 апреля 2023 года, в Российской Федерации – технический регламент Таможенного союза[3] ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». В лекарственном растительном сырье максимально допустимые уровни содержания МТ установлены начиная с Европейской фармакопеи 7.0[4]: АФЛ B_1 – 2 мкг/кг; 4 мкг/кг – сумма АФЛ B_1, B_2, G_1 и G2 [13]. В Российской Федерации в настоящее

[1] World Health Organization (WHO) WHO Traditional Medicine Strategy: 2014–2023. WHO; Geneva, Switzerland: 2013. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096/ Accessed: 26.05.2023.

[2] European Commission. Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. *Official Journal of the European Union*.2009. L119/103; annex 1. Available at: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915/ Accessed: 20.05.2023.

[3] Технический регламент Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» от 9 декабря 2011 года № 880, прил. 1–3. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/902320560. Ссылка активна на 29.05.2023.

[4] European Pharmacopoeia, 2011. Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), 7th ed. Available at: http://www.fptl.ru/biblioteka/farmacop/EP-7.0-2.pdf. Accessed: 29.05.2023.

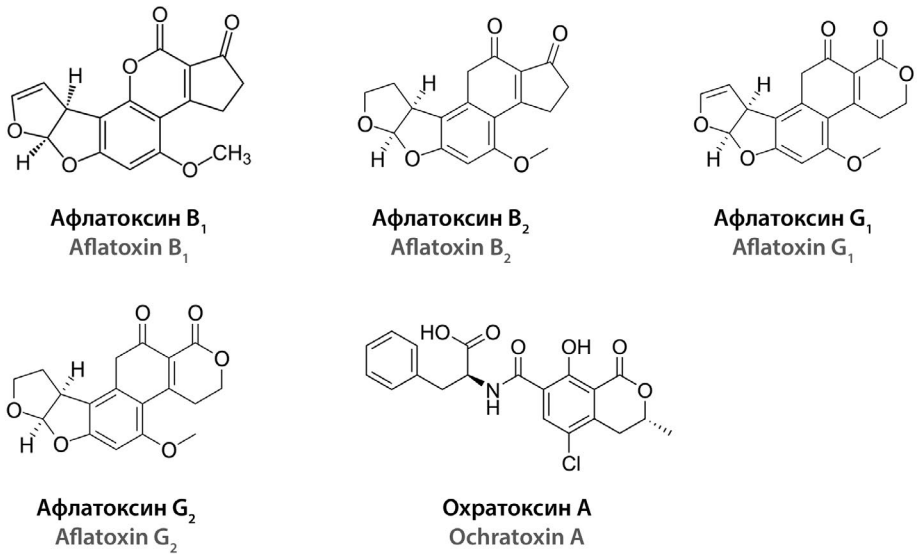


Рисунок 1. **Структурные формулы афлатоксинов и охратоксина А**

Figure 1. **Structure formulas of aflatoxins and ochratoxin A**

время содержание АФЛ и ОТА в лекарственном растительном сырье (ЛРС) не регламентируется.

Несмотря на большое количество имеющихся материалов на тему определения МТ в ЛРС, лишь малая их часть содержит подробное изложение методов определения АФЛ и ОТА. Учитывая потенциальную опасность для здоровья человека, а также сложность проведения процедур пробоподготовки и анализа по их содержанию, изучение данного вопроса становится весьма актуальным. Целью данного обзора были анализ и систематизация литературных данных, опубликованных за последние десятилетия, по методам подготовки проб и определению АФЛ и ОТА в ЛРС.

Способы пробоподготовки лекарственного растительного сырья к анализу на содержание афлатоксинов и охратоксина А

ЛРС имеет в своем составе множество различных биологически активных и сопутствующих веществ, что делает процесс анализа сложным и требует эффективных процедур предварительной обработки образцов. Именно поэтому пробоподготовка является важнейшим этапом при анализе МТ и позволяет произвести удаление сопутствующих компонентов и концентрирование пробы. Она включает в себя несколько этапов: отбор пробы, экстракция и очистка [14].

На этапе отбора проб продовольственного сырья учитывают, что загрязненность МТ по сырью распределяется неравномерно и в местах роста плесени может быть достаточно высокой. Согласно ГОСТ 13586.3–83 «Зерно. Правила приема и отбора проб», образец должен представлять совокупность большого количества маленьких постепенных порций, взятых из различных мест партии. В связи с этим при отборе проб используют 2 способа выборки: статистический и динамический. При статистическом способе отбора пробу отбирают в контейнер и из него производят выборку, при динамическом способе используют автоматические пробоотборники [14–17].

После отбора пробы МТ экстрагируют органическими растворителями в соответствии с характеристиками анализируемого вещества. Структура токсина главным образом определяет метод экстракции, который используется для удаления МТ из биологической матрицы. В настоящее время наиболее распространенными растворителями для экстракции МТ из ЛРС являются «метанол – вода» (MeOH – H_2O) и «ацетонитрил – вода» (MeCN – H_2O), иногда добавляют дополнительные реагенты – кислоты (муравьиная кислота, уксусная кислота) и соли [18]. В таблице 1 приведены примеры методов обнаружения АФЛ и ОТА с помощью различных способов очистки.

Этап очистки используется для устранения примесей из образца и последующей концентрации МТ перед проведением инструментального анализа из-за низкого уровня МТ (на уровне мкг/кг) и сложного химического состава ЛРС. Разработано большое количество методов очистки, способствующих наиболее точному определению МТ в лекарственном сырье, среди них такие методы, как твердофазная экстракция (ТФЭ) и иммуноаффинная колонка (ИАК) [19].

Твердофазная экстракция. ТФЭ широко используется для очистки и выделения МТ, экстрагируемых из ЛРС, в частности АФЛ и ОТА. Основным принци-

Таблица 1. Методы очистки микотоксинов в лекарственном сырье

Table 1. Methods of purification of mycotoxins in herbal raw materials

Способ очистки Cleanup	Микотоксин Mycotoxin	Образец Sample	Экстрагент Extraction solvent	Ссылка Reference
ТФЭ SPE	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 ОТА AFL B_1, B_2, G_1, G_2 Ochratoxin A	Корни китайского батата, американского женьшеня, астрагала, полигалы, володушки и солодки Roots of Chinese yam, American ginseng, astragalus, polygala, bupleurum and liquorice	Метанол : вода (80 : 20, об/об) Methanol : water (80 : 20, v/v)	[20]
ИАК IAC	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 ОТА AFL B_1, B_2, G_1, G_2 Ochratoxin A	Корни истода и семена бусенника обыкновенного Polygalae Radix and Coicis Semen	Метанол : вода (80 : 20, об/об) Methanol : water (80 : 20, v/v)	[21]
ТФЭ SPE	АФЛ B_1 ОТА AFL B_1 Ochratoxin A	Корни солодки и луковицы фритиллярии Licorice roots and fritillary bulbs	Метанол : вода (85 : 15, об/об) Methanol : water (85 : 15,v/v)	[22]
ИАК IAC	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1,G_2	Лекарственные растения Индии Indian medicinal plants	Метанол : вода (80 : 20, об/об) Methanol : water (80 : 20, v/v)	[23]
QuEChERS	АФЛ B_1, B_2, G_1 AFL B_1, B_2, G_1	Травы и травяные настои Herbs and herbal infusions	Вода; +ацетонитрил (1%-я муравьиная кислота) (1 : 1) Water; +Acetonitrile (1 % formic acid) (1 : 1)	[24]

Примечание. АФЛ – афлатоксины; АФЛ B1 – афлатоксин B1; АФЛ B2 – афлатоксин B2; АФЛ G1 – афлатоксин G1; АФЛ G2 – афлатоксин G2; ОТА – охратоксин А; ТФЭ – твердофазная экстракция; ИАК – иммуноаффинная колонка.

Note. AFL – Aflatoxins; AFL B1 – Aflatoxin B1; AFL B2 – Aflatoxin B2; AFL G1 – Aflatoxin G1; AFL G2 – Aflatoxin G2; OTA – Ochratoxin A; SPE – Solid-phase extraction; IAC – immunoaffinity column.

пом технологии ТФЭ является использование небольших одноразовых картриджей, где находится сорбент (твердая неподвижная фаза). Образец пропускают через картридж, МТ сорбируется из матрицы и элюируется другим растворителем [25].

Оптимальные результаты в большинстве случаев получали при использовании одного типа колонки ТФЭ для очистки. Однако для анализа нескольких МТ разной полярности и сложных матриц поступило предложение использования двух колонок ТФЭ в сочетании. Так, при анализе нескольких МТ в настоях из трав предложили использовать совокупность колонок C18-SPE и NH2-SPE, чтобы выделить все требуемые МТ. Образцы экстрагировали с помощью этилацетата / муравьиной кислоты (99 : 1, об/об). Экстракт был поделен на две части, одна из которых была очищена при использовании NH2-SPE, а другая часть была пропущена через колонку C18-SPE, полученные элюаты были объединены для проведения дальнейшего анализа [26].

Иммуноаффинная колонка. Иммуноаффинная колонка – метод очистки, который основывается на взаимодействии антитела (АТ) и антигена (АГ). Принцип работы заключается в колонке, в которой находится нерастворимый носитель, где зафиксированы специфические АТ. В случае, когда носитель отсутствует, АТ находятся в свободном виде, отделенном полупроницаемой мембраной. При пропускании экстракта через колонку МТ образует комплекс с АТ и прочно удерживается на носителе. С помощью элюирующего раствора МТ смывается с колонки и далее анализируется с использованием различных методов [27].

Этот метод, несомненно, имеет некоторые преимущества, в том числе наименьшую потерю МТ и наибольшее удаление примесей. Из этого следует, что применение этого метода как процедуры очистки, в отличие от метода ТФЭ, может улучшить специфичность дальнейшего анализа, понижая таким образом требования к детектору. Однако использование данных колонок имеет несколько существенных недостатков: из-за сложного состава биологических матриц различные соединения, обладающие некоторым сродством к АТ, могут занимать свободные места связывания и тем самым снижать способность связывания для АФЛ и ОТА, что может привести к ложным или неточным результатам [28].

QuEChERS. Одним из наиболее часто используемых методов для извлечения МТ и очистки экстракта является метод QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) – быстрый, дешевый, эффективный, надежный и безопасный. Данный метод предварительной обработки был первоначально разработан для определения пестицидов. Метод основан на экстракции МТ из сырья с использованием смеси ацетонитрил/вода и солей с последующей стадией очистки, которая основывается на ТФЭ. Метод QuEChERS позволяет удалить нежелательные соединения, такие как органические кислоты, липиды, пигменты, сахара и др. [29].

Поскольку АФЛ и ОТА чувствительны к pH, обычно к экстрагенту добавляют раствор муравьиной кислоты, чтобы создать низкий pH и предотвратить образование ионизированной формы [30]. На этапе разделения фаз обычно используются сульфат магния и хлорид натрия с целью уменьшения количества воды в образце. Для очистки применяют сорбент C18, который удаляет из образца жиры, стерины, другие неполярные примеси; первичные/вторичные амины (PSA) для удаления органических и жирных кислот и сахара или графитированную сажу (GCB) для удаления пигмента [31].

Аналитические методы определения афлатоксинов и охратоксина А в сырье растительного происхождения

На сегодняшний день, помимо метода тонкослойной хроматографии (ТСХ), наиболее часто используемыми методами для получения высокоточных результатов являются жидкостная хроматография (ЖХ) и газовая хроматография (ГХ) в сочетании со специальными детекторами. Жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС) является наиболее предпочтительным методом для совместного определения различных МТ, таких как АФЛ и ОТА, принадлежащих к разным химическим группам. В таблице 2 приведены примеры обнаружения АФЛ и ОТА различными методами анализа.

Тонкослойная хроматография. Одним из первых методов обнаружения МТ является тонкослойная хроматография (ТСХ), которая считается традиционной с момента открытия АФЛ. ТСХ основывается на применении пластин с нанесенной неподвижной и подвижной фазами. Определение анализируемого МТ проводится, когда на пластину одновременно вносят экстракт образца и стандартные растворы МТ с известной концентрацией. Различные соединения в смеси движутся по пластине с разной скоростью из-за того, что есть различия в закономерностях их разделения между неподвижной и подвижной жидкой фазами. На таком принципе базируется разделение в смеси экстракта веществ. Флуоресцирующие вещества можно выявить при помощи УФ-излучения, а все остальные – используя специфические реагенты [46]. Bugno и соавт. (2006) с помощью метода ТСХ показали, что наибольшее количество контаминации наблюдалось в надземных частях растений (50,0 %) и 54,9 % образцов превышало предел, установленный Фармакопеей США [47].

Невысокие чувствительность и селективность являются существенными недостатками ТСХ. Вместе с увеличением требований к точности данных и количественного определения постепенно метод ТСХ совершенствуется до метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и процент использования ТСХ при идентификации АФЛ B_1 в образцах кукурузы в 2002 году снижается с 48 до 7 % [48].

ТСХ также применяется нередко в качестве скрининг-метода МТ в ЛРС (таблица 3), так как этот метод отличается быстротой, надежностью, удобен для проведения серийных анализов и может одновременно определять до 30 различных МТ, требуя для анализа минимальное количество затрат и оборудования [49].

Можно сделать вывод, что метод ТСХ широко используется в качестве скрининг-метода для определения АФЛ и ОТА для большого числа серий, включая такие растения, как мята перечная (*Mentha piperita),* мелисса лекарственная (*Melissa officinalis*), ромашка аптечная (*Chamomilla recutita*) и солодка голая (*Glycyrrhiza glabra)*.

Жидкостная хроматография. В последние годы метод ВЭЖХ – наиболее распространенный метод количественного определения АФЛ. В сочетании с различными детекторами практически все МТ были выделены и обнаружены методом ВЭЖХ. Наиболее часто при определении АФЛ и ОТА используются ВЭЖХ с масс-спектрометром (ВЭЖХ-МС), ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометром (ВЭЖХ-МС/МС) и ультра-ВЭЖХ-МС/МС (УВЭЖХ-МС/МС) с различными вариантами пробоподготовки. ВЭЖХ используется Европейской фармакопеей 11.0 для определения АФЛ B_1 в ЛРС [54–56]. ВЭЖХ с флуоресцентным детектором (ВЭЖХ-ФЛД) широко используется для определения АФЛ в матрицах лекарственных растений и рекомендуется в фармакопеях многих стран и регионов. В отличие от методов, основанных на газовой хроматографии (ГХ), полярные соединения МТ доступны без необходимости дериватизации. Однако флуоресценция АФЛ значительно подавляется при использовании смесей водных растворителей в обращенно-фазовой хроматографии, поэтому для определения используют дериватизацию [57].

Газовая хроматография. Газовая хроматография обладает высокой чувствительностью, селективностью, точностью, прецизионностью и часто используется в качестве еще одного метода, с помощью которого можно определить МТ. Этот метод позволяет в одно и то же время проводить и количественное, и качественное определение МТ, в том числе нескольких. После того, как образец был очищен, часто требуется стадия дериватизации, а именно ацилирование или силилирование. Причиной тому – недостаточная летучесть МТ при температуре колонки или невозможность их преобразования в летучие производные [58]. Поскольку ОТА не является летучим, он был преобразован в его О-метиловый эфир и обнаружен методом масс-спектрометрии [59]. Данный метод определения широко используется для таких МТ, как трихотецены А: у них мало свободных гидроксильных групп и отсутствует кетоновая группа в положении С-8, именно поэтому их невозможно обнаружить методом ВЭЖХ с УФ-излучением. Однако данный метод анализа имеет относительно низкую скорость, дорогостоящее оборудование и высокие требования к технологии и эксплуатации [60].

Таблица 2. Методы анализа афлатоксинов и охратоксина А в лекарственном сырье

Table 2. Methods of identification of aflatoxins and ochratoxin A in herbal raw materials

Метод Method	**Микотоксин** Mycotoxin	**Количество образцов (*n*)** Number of samples (*n*)	**Наименования образцов** Names of samples	**Экстрагент** Extraction solvent	**Источник** Reference
ВЭЖХ HPLC	АФЛ B_1, G_1, G_2 AFL B_1, G_1, G_2	23	Аир обыкновенный *(Acorus calamus)* Кассия узколистная *(Cassia angustifolia)* Кориандр посевной *(Coriandrum sativum)* Фенхель обыкновенный *(Foeniculim vulgare)* Мята перечная *(Mentha piperita)* Calamus *(Acorus calamus)* Cassia *(Cassia angustifolia)* Coriander *(Coriandrum sativum)* Fennel *(Foeniculim vulgare)* Peppermint *(Mentha piperita)*	Метанол : вода (70:30, об/об) Methanol : water (70:30, v/v)	[32]
	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	28	Лекарственное растительное сырье Таиланда Medicinal plant raw materials of Thailand	Метанол : вода (80:20, об/об) Methanol : water (80:20, v/v)	[33]
	АФЛ B_1 AFL B_1	13	Альпиния лекарственная *(Alpinia officinarum)* Центелла азиатская *(Centella asiatica)* Солодка голая *(Glycyrrhiza glabra)* Мускатный орех *(Myristica fragrans)* Alpinia officinalis *(Alpinia officinarum)* Centella *(Centella asiatica)* Licorice *(Glycyrrhiza glabra)* Nutmeg *(Myristica fragrans)*	Вода Water	[34]
	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	10	Фиточаи Китая Herbal tea of China	Хлороформ : ацетонитрил Chloroform : acetonitrile	[35]
	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 OTA AFL B_1, B_2, G_1, G_2 Ochratoxin A	48	Женьшеня ложного корни и корневища Notoginseng radix et rhizoma	Ацетонитрил : вода (84:16, об/об) для АФЛ Метанол : вода (80:20, об/об) для ОТА Acetonitrile – water (84:16, v/v) for AFL Methanol : water (80:20, v/v) for Ochratoxin A	[36][1]
	OTA Ochratoxin A	3 вида лекарственных трав и БАД 3 types of medicinal herbs and nutritional supplements	Дудник китайский *(Angelica sinensis)* Женьшень обыкновенный *(Panax ginseng)* Chinese Angelica *(Angelica sinensis)* Ginseng *(Panax ginseng)*	Ацетонитрил : вода (60:40, об/об) Acetonitrile : water (60:40, v/v)	[37]
	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	129	Образцы зеленого чая *(Camellia sinensis)* Samples of green tea *(Camellia sinensis)*	Смесь растворов: [уксусная кислота : вода (1:99) + 10 % NaCl] и [толуол : ацетонитрил : уксусная кислота (75:24:1)] Mixture of solutions: [acetic acid : water (1:99) + 10 % NaCl] and [toluene : acetonitrile:acetic acid (75:24:1)]	[38]
	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	241	–	Метанол : вода (70:30, об/об) Methanol : water (70:30, v/v)	[39]
	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	50	Солодка уральская *(Glycyrrhiza uralensis)* Трава мяты (Herba menthae) Листья сенны (Folia sennae) Licorice *(Glycyrrhiza uralensis)* Mint herb (Herba menthae) Senna leaves (Folia sennae)	Метанол : вода (70:30, об/об) Methanol : water (70:30, v/v)	[40]

Продолжение таблицы 2

Метод Method	**Микотоксин** Mycotoxin	**Количество образцов (*n*)** Number of samples (*n*)	**Наименования образцов** Names of samples	**Экстрагент** Extraction solvent	**Источник** Reference
ВЭЖХ HPLC	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	24	Плоды фенхеля (Foeniculi fructus) Боярышника плоды (Crataegi fructus) Аниса звездчатого плоды (*Anisi stellati* fructus) Корни солодки (Glycyrrhizae radices) Fennel fruits (Foeniculi fructus) Hawthorn fruit (Crataegi fructus) Anise fruits (*Anisi stellati* fructus) Licorice roots (Glycyrrhizae radices)	Метанол : вода (80 : 20, об/об) Methanol : water (80 : 20, v/v)	[41]
	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	70	Боярышника плоды (Crataegi fructus) Аралии континентальной корни (*Araliae continentalis* radices) Трава мяты (Menthae herba) Аниса звездчатого плоды (*Anisi stellati* fructus) Hawthorn fruit (*Crataegi fructus*) Aralia continental roots (*Araliae continentalis radices*) Mint herb (*Menthae herba*) Star anise fruit (*Anisi stellati fructus*)	Метанол : вода (70 : 30, об/об) Methanol : water (70 : 30, v/v)	[42]
ИХА ICA	АФЛ B_1 AFL B_1		Аниса звездчатого плоды (*Anisi stellati fructus*) Star anise fruit (*Anisi stellati fructus*)	Метанол : вода (60 : 40, об/об) Methanol : water (60 : 40, v/v)	[42]
	АФЛ B_1 AFL B_1	37	Тмин Мята Тимьян Анис Сумах Кориандр Ромашка Шиповник Cumin Mint Thyme Anise Sumac Coriander Camomile Rosehip	Метанол : вода (70 : 30, об/об) Methanol : water (70 : 30, v/v)	[43]
	АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 ОТА AFL B_1, B_2, G_1, G_2 Ochratoxin A	84	Корень алтея (*Althea officinalis*) Листья сенны (*Cassia angustifolia*) Боярышник (*Crataegus oxyacantha/monogyna*) Хвощ полевой (*Equisetium arvense*) Листья эвкалипта (*Eucalyptus* sp.) Плоды фенхеля (*Foeniculum vulgare*) Корни солодки (*Glycyrrhiza glabra*) Цветки ромашки (*Matricaria chamomilla*) Листья мелиссы (*Melissa officinalis*) Листья мяты перечной (*Mentha piperita*) Пассифлора инкарнатная (*Passiflora incarnata*) Листья подорожника (*Plantago lanceolata*) Кора крушины (*Rhamnus frangula*) Листья шалфея (*Salvia officinalis*) Одуванчик (*Taraxacum officinale*)	Ацетонитрил : вода (84 : 16, об/об) Acetonitrile : water (84 : 16, v/v)	[44]

Окончание таблицы 2

Метод Method	**Микотоксин** Mycotoxin	**Количество образцов (*n*)** Number of samples (*n*)	**Наименования образцов** Names of samples	**Экстрагент** Extraction solvent	**Источник** Reference
ИХА ICA			Крапива (*Urtica dioica*) Корни валерианы (*Valeriana officinalis*) Marshmallow root (*Althea officinalis*) Senna leaves (*Cassia angustifolia*) Hawthorn (*Crataegus oxyacantha/monogyna*) Horsetail field (*Equisetum arvense*) Eucalyptus leaves (*Eucalyptus* sp.) Fennel fruits (*Foeniculum vulgare*) Licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) Chamomile flowers (*Matricaria chamomilla*) Melissa leaves (*Melissa officinalis*) Peppermint leaves (*Mentha piperita*) Passionflora incarnate (*Passiflora incarnata*) Plantain leaves (*Plantago lanceolata*) Buckthorn bark (*Rhamnus frangula*) Sage leaves (*Salvia officinalis*) Dandelion (*Taraxacum officinale*) Nettle (*Urtica dioica*) Valerian roots (*Valeriana officinalis*)		
	АФЛ B_1 AFL B_1	40	Гастродия высокая (*Gastrodia elata*) Гастродия (*Gastrodia elata*) Пория кокосовидная (*Poria cocos*) Блетилла полосатая (*Bletilla striata*) Дудник даурский (*Angelica dahurica*) Gastrodia high (*Gastrodia elata*) Gastrodia (*Gastrodia elata*) Poria (*Poria cocos*) Blethilla (*Bletilla striata*) Angelica (*Angelica dahurica*)	–	[45]

Таблица 3. Обнаружение афлатоксинов и охратоксина А методом тонкослойной хроматографии в лекарственном растительном сырье

Table 3. Detection of aflatoxins and ochratoxin A by thin-layer chromatography in herbal raw materials

Микотоксин Mycotoxin	**Образец** Sample	**Наименования образцов** Names of samples	**Источник** Reference
АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 ОТА AFL B_1, B_2, G_1, G_2 Ochratoxin A	91	Полынь горькая (*Artemisia absinthium*) Алтей лекарственный (*Althaea officinalis*) Анис обыкновенный (*Pimpinella anisum*) Лопух большой (*Arctium lappa*) Ромашка аптечная (*Chamomilla recutita*) Фенхель обыкновенный (*Foeniculim vulgare*) Крушина ольховидная (*Rhamnus frangula*) Мелиса лекарственная (*Melissa officinalis*) Дуб черешчатый (*Quercus robur*) Кассия остролистная (*Cassia senna*) Валериана лекарственная (*Valeriana officinalis*) Wormwood (*Artemisia absinthium*) Marshmallow (*Althaea officinalis*) Anise (*Pimpinella anisum*) Burdock (*Arctium lappa*) Chamomile (*Chamomilla recutita*) Fennel (*Foeniculim vulgare*) Buckthorn (*Rhamnus frangula*) Melissa (*Melissa officinalis*) Oak (*Quercus robur*) Cassia (*Cassia senna*) Valerian (*Valeriana officinalis*)	[47]

Окончание таблицы 3

Микотоксин **Mycotoxin**	**Образец** **Sample**	**Наименования образцов** **Names of samples**	**Источник** **Reference**
АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	152	Красавка обыкновенная (*Atropa belladonna*) Боярышник колючий (*Crataegus oxyacantha*) Ромашка аптечная (*Chamomilla recutita*) Чистотел большой (*Chelidonium majus*) Belladonna *(Atropa belladonna)* Hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) Chamomile (*Chamomilla recutita*) Celandine (*Chelidonium majus)*	[50]
АФЛ B_1 ОТА AFL B_1 Ochratoxin A	62	Береза обыкновенная (*Betula alba*) Мята перечная *(Mentha piperita*) Хвощ полевой (*Equisetum arvense*) Бузина черная (*Sambucus nigra*) Тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*) Крапива жгучая (*Urtica urens*) Липа крупнолистная (*Tillia grandifolia*) Мать-и-мачеха обыкновенная (*Tussilago farfara*) Стальник колючий (*Ononis spinosa*) Шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*) Боярышник колючий (*Crataegus oxyacantha*) Толокнянка обыкновенная (*Arctostaphylos uva-ursi*) Алтей лекарственный (*Althaea officinalis*) Мелиса лекарственная (*Melissa officinalis*) Фенхель обыкновенный *(Foeniculim vulgare*) Можжевельник обыкновенный *(Juniperus communis*) Золототысячник малый *(Centaurium erythraea*) Полынь горькая (*Artemisia absinthium*) Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum*) Birch (*Betula alba*) Peppermint (*Mentha piperita*) Meadow pine (*Equisetum arvense*) Elderberry (*Sambucus nigra*) Yarrow (*Achillea millefolium*) Nettle (*Urtica urens*) Linden (*Tillia grandifolia*) Coltsfoot (*Tussilago farfara*) Rest-harrow (*Ononis spinosa*) Sage (*Salvia officinalis*) Hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) Marshmallow (*Althaea officinalis*) Melissa (*Melissa officinalis*) Fennel (*Foeniculim vulgare*) Juniper (*Juniperus communis*) Centaury (*Centaurium erythraea*) Wormwood (*Artemisia absinthium*) Thyme (*Thymus serpyllum*)	[51]
АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 ОТА AFL B_1, B_2, G_1, G_2 Ochratoxin A	30	Барбарис обыкновенный (*Berberis vulgaris*) Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra*) Мак снотворный (*Papaver somniferum*) Barberry (*Berberis vulgaris*) Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Opium poppy (*Papaver somniferum*)	[52]
АФЛ B_1, B_2, G_1, G_2 AFL B_1, B_2, G_1, G_2	63	Аир обыкновенный (*Acorus calamus*) Фенхель обыкновенный (*Foeniculim vulgare*) Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra*) Calamus (*Acorus calamus*) Fennel (*Foeniculim vulgare*) Licorice (*Glycyrrhiza glabra*)	[53]

Скрининговые методы анализа

Скрининингновые методы – необходимый инструмент, который помогает контролировать уровни МТ. Для быстрого скрининга может быть использована большая часть иммунологических методов. Как правило, они являются качественными методами анализа, демонстрирующими отсутствие и наличие МТ. Скорость проведения анализа, небольшая стоимость анализа, простота пробоподготовки – достоинства экспресс-скрининга, однако ложноположительные результаты лишь один из недостатков, присущих этому методу. Тем не менее разнообразие видов иммунологических методов все больше появляется и стремительно продолжает свое развитие.

Иммуноферментный анализ. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) широко используется для скрининга МТ. ИФА основывается на специфическом взаимодействии АТ с АГ, которое приводит к образованию комплекса АГ-АТ и с помощью добавления ферментного субстрата – окрашиванию его в синий цвет. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации МТ в образце или стандарте. Чтобы остановить ферментативную реакцию, добавляют раствор и измеряют оптическую плотность в лунках планшета на фотометре при 450 нм [61–62]. На данный момент этот метод является одним из самых востребованных методов анализа на основе АТ благодаря его преимуществам: высокой специфичности, быстрой скорости, простоте конструкции и разумной цене оборудования [63]. Для обычных МТ, в том числе АФЛ и ОТА, доступны некоторые коммерческие наборы для проведения ИФА-тестов. Обычные ИФА на планшете требуют равновесия реакции АГ-АТ, что потребовало бы времени инкубации около 1–2 часов, в настоящее время большинство имеющихся в продаже наборов для ИФА-тестирования МТ работают на кинетической фазе связывания, что сокращает время инкубации до минут [64]. Погрешность определения МТ с помощью тест-систем составляет около 30 %, при этом ложноотрицательные результаты отсутствуют, а ложноположительные могут быть [65].

Иммунохроматографический анализ. Иммунохроматографический анализ (ИХА) используется в анализе МТ с начала своей разработки и завоевал популярность по всему миру в этой сфере. Это эффективная скрининговая технология, обладает значительными достоинствами – простотой и быстротой, основана на взаимодействии специфического характера АТ и определяемого вещества – АГ. Введенная метка помогает провести идентификацию и количественное определение комплекса. Среди меток, которые могут быть применены, выделяют разнообразные частицы с особыми свойствами: красящие вещества (наночастицы коллоидного углерода и золота), биолюминесцентные, фосфоресцентные, флуоресцентные (ковалентно связаны с латексными частицами), парамагнитные (закреплены на латексных частицах), а также ферментные (по принципу ИФА). Как правило, такой анализ используется, чтобы провести экспресс-скрининг некоторых МТ, например АФЛ, ОТА [66].

В 2018 году Hu и соавт. было проведено исследование, в котором были использованы ИХА – полоски с золотыми наночастицами для проведения быстрого скрининга АФЛ B1 в корнях и корневищах растений из разных регионов Китая, обладающих лекарственными свойствами и имеющих крахмал и полисахариды в своем составе. 5 мкг/кг – предел обнаружения АФЛ B1 в предоставленных материалах. Этот результат подтвердили методом ЖХ-МС/МС (6,12 мкг/кг) [45]. ИХА является надежным, быстрым и экономичным методом обнаружения отдельных видов МТ в лекарственном сырье растительного происхождения, но подойдет лишь для предварительного скрининга, так как не является количественным методом [67].

Результаты сравнительного анализа методов определения (таблица 4) показали, что ВЭЖХ обладает наибольшими преимуществами для анализа МТ: высокой чувствительностью, селективностью и точностью анализа, что наиболее подходит для определения АФЛ и ОТА в ЛРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В составе ЛРС содержится множество различных биологически активных соединений, из-за которых пробоподготовка образца является одним из самых сложных и важных этапов обнаружения АФЛ и ОТА. Экстракцию МТ из образцов сухого сырья осуществляют смесями 60–90 % полярного органического растворителя и воды. Для увеличения степени извлечения применяют шейкеры и ультразвуковые бани. Для очистки экстрактов используют методы ТФЭ, ИАК и QuEChERS. После проведенного анализа и оценки всех недостатков и преимуществ способов очистки определен наиболее подходящий способ – метод QuEChERS. Несмотря на то, что ИАК позволяет селективно выделять МТ, стоимость и специфичность использования ограничивают область ее использования, в то время как QuEChERS дает широкий выбор подходов к очистке, дешевизну и простоту использования, что позволяет исследовать различные по структуре МТ.

Хроматографические методы анализа являются наиболее универсальными и широко используемыми для определения МТ в ЛРС. Традиционным методом считается ТСХ, но сейчас этот метод применяется все реже, потому что требования к точности данных растут. В связи с этим все чаще применяется ВЭЖХ. Этот метод особенно удобен для качественного и количественного определения АФЛ и ОТА. Часто применяется для этих целей ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-ФЛД.

Скрининговые методы также широко используются для анализа АФЛ и ОТА в лекарственном и пищевом сырье, так как обладают таким рядом преиму-

Таблица 4. Сравнительный анализ методов определения афлатоксинов и охратоксина А в лекарственном растительном сырье

Table 4. Results of a comparative analysis of methods for determining aflatoxins and ochratoxin A in herbal raw materials

Метод Method	Достоинства Advantages	Недостатки Disadvantages
ТСХ TLC	Простота пробоподготовки. Простота и дешевизна оборудования Ease of sample preparation. Simplicity and cheapness of equipment	Низкая чувствительность обнаружения Low detection sensitivity
ГХ GC	Высокая чувствительность и точность анализа. Высокая разделительная способность. Низкие пределы обнаружения High sensitivity and accuracy of analysis. High separation capacity. Low detection limits	Дорогостоящее оборудование. Сложность пробоподготовки. Невозможность разделения и анализа смесей нелетучих соединений. Требуется дериватизация Expensive equipment. Complexity of sample preparation. Inability to separate and analyze mixtures of non-volatile compounds. Derivatization is required
ВЭЖХ HPLC	Высокая чувствительность и точность анализа. Высокая селективность разделения. Низкие пределы обнаружения. Многокомпонентность анализа. Широкий диапазон линейности High sensitivity and accuracy of analysis. High separation selectivity. Low detection limits. Multicomponent analysis. Wide range of linearity	Требуется сложное дорогостоящее оборудование и высококвалифицированный персонал. Сложность пробоподготовки. Время анализа Requires complex expensive equipment and highly qualified personnel. Complexity of sample preparation. Analysis time
Скрининговые методы Screening methods	Высокая специфичность и чувствительность. Быстрота определения. Доступность оборудования High specificity and sensitivity. Speed of detection. Availability of equipment	Ложноположительные результаты False positive results

ществ, как быстрота, простота и стоимость, но результаты часто неточные. Количество таких методов стремительно растет, но требует подтверждения более чувствительными методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zain M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2011;15(2):129–144. DOI: 10.1016/j.jscs.2010.06.006.
2. Hao W., Li A., Wang J., An G., Guan S. Mycotoxin Contamination of Feeds and Raw Materials in China in Year 2021. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022;9:1–11. DOI: 10.3389/fvets.2022.929904.
3. Pallares N., Berrada H., Font G., Ferrer E. Mycotoxins occurrence in medicinal herbs dietary supplements and exposure assessment. *Journal of Food Science and Technology*. 2022;59(7):2830–2841. DOI: 10.1007/s13197-021-05306-y.
4. Su C., Hu Y., Gao D., Luo Y., Amanda J. C., Jiao X., Gao W. Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins on Root Herbs from Chinese Markets. *Journal of Food Protection*. 2018;81(5):754–761. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-405.
5. Yu J., Yang M., Han J., Pang X. Fungal and mycotoxin occurrence, affecting factors, and prevention in herbal medicines: a review. *Toxin Reviews*. 2022;41(3):976–994. DOI: 10.1080/15569543.2021.1925696.
6. Zhao D. T., Gao Y. J., Zhang W. J., Bi T. C., Wang X., Ma C. X., Rong R. Development a multi-immunoaffinity column LC-MS-MS method for comprehensive investigation of mycotoxins contamination and co-occurrence in traditional Chinese medicinal materials. *Journal of Chromatography B*. 2021;1178:122730. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122730.
7. Adam M. A. A., Tabana Y. M., Musa K. B., Sandai D. A. Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer (review). *Oncology Reports*. 2017;1321–1336. DOI: 10.3892/or.2017.5424.
8. Wei G., Guo X., Liang Y., Liu C., Zhang G., Liang C., Huang Z., Zheng Y., Chen S., Dong L. Occurrence of fungi and mycotoxins in herbal medicines and rapid detection of toxin-producing fungi. *Environmental Pollution*. 2023;333:122082. DOI: 10.1016/j.envpol.2023.122082.
9. Areo O. M., Phoku Z. J., Gbashi S., Njoben B. P. A preliminary study of multi-mycotoxins contamination in some selected South Africa medicinal plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2020;32(6):426–433. DOI: 10.9755/ejfa.2020.v32.i6.2113.
10. Zhu Y. P., Woerdenbag H. J. Traditional Chinese herbal medicine. *Pharmacy World and Science*. 1995;17:103–112. DOI: 10.1007/BF01872386.
11. Singh B. K., Tiwari S., Maurya A., Kumar S., Dubey N. K. Fungal and mycotoxin contamination of herbal raw materials and their protection by nanoencapsulated essential oils: An overview. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022;39:102257. DOI: 016/j.bcab.2021.102257.
12. Pallares N., Tolosa J., Ferrer E., Berrada H. Mycotoxins in raw materials, beverages and supplements of botanicals: A review of occurrence, risk assessment and analytical methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 2022;165:113013. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113013.
13. Altyn I., Twaruzek M. Mycotoxin Contamination Concerns of Herbs and Medicinal Plants. *Toxins*. 2020;12(3):182. DOI: 10.3390/toxins12030182.

14. Whitaker T. B. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control*. 2003;14(4):233–237. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00012-4.
15. Iqbal S. Z. Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*. 2021;42:237–247. DOI: 10.1016/j.cofs.2021.07.003
16. Амелин В. Г., Карасева Н. М., Третьяков А. В. Хроматографические методы определения микотоксинов в пищевых продуктах. *Журнал аналитической химии*. 2013;68(3):212–223. DOI: 10.7868/S004445021303002X.
17. ГОСТ 13586.3–83. Зерно. Правила приемки и методы отбора проб. М.: Изд-во Стандартинфом; 2009.
18. Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*. 2009;632(2):168–180. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.010.
19. Pallares N., Tolosa J., Ferrer E., Berrada H. Mycotoxins in raw materials, beverages and supplements of botanicals: A review of occurrence, risk assessment and analytical methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 2022;165:113013. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113013.
20. Chunyan S., Yongjian H., Dan G., Yi L., Amanda J. C., Xiaolin J., Weiwei G. Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins on Root Herbs from Chinese Markets. *Journal of Food Protection*. 2018;81(5):754–761. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-405.
21. Zhao D. T., Gao Y. J., Zhang W. J., Bi T. C., Wang X., Ma C. X., Rong R. Development a multi-immunoaffinity column LC-MS-MS method for comprehensive investigation of mycotoxins contamination and co-occurrence in traditional Chinese medicinal materials. *Journal of Chromatography B*. 2021;1178:122730. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122730.
22. Lizhi W., Zhen W., Weiwei G., Juan C., Meihua Y., Ying K., Linfang H., Shilin C. Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A in licorice roots and fritillary bulbs by solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2013;138(2–3):1048–1054. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.066.
23. Sarkar R., Shinde R., Dhanshetty M., Banerjee K. Multi-mycotoxin analysis method using liquid chromatography with tandem mass spectrometry and fluorescence detection in Indian medicinal herbs: Development and validation. *Journal of Chromatography A*. 2022;1677:463310. DOI: 10.1016/j.chroma.2022.463310.
24. Caldeirão L., Sousa J., Nunes L. C. G., Godoy H. T., Fernandes J. O., Cunha S. C. Herbs and herbal infusions: Determination of natural contaminants (mycotoxins and trace elements) and evaluation of their exposure. *Food Research International*. 2021;144:110322. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110322.
25. Żwir-Ferenc A., Biziuk M. Solid Phase Extraction Technique – Trends,Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2006;15(5):677–690.
26. Monbaliu S., Aibo W., Zhang D., Peteghem C. V., Saeger S. D. Multimycotoxin UPLC–MS/MS for Tea, Herbal Infusions and the Derived Drinkable Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(24):12664–12671. DOI: 10.1021/jf1033043.
27. Scott P. M., Trucksess M. W. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *Journal of AOAC international*. 1997;80(5):941–950. DOI: 10.1093/jaoac/80.5.941.
28. Castegnaro M., Tozlovanu M., Wild C., Molinié A., Sylla A., Pfohl-Leszkowicz A. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *Journal of AOAC international*. 2006;50(6):480–487. DOI: 10.1002/mnfr.200500264.
29. Musarurwa H., Chimuka L., Pakade VE., Tavengwa N. T. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019;84:103314. DOI: 10.1016/j.jfca.2019.103314.
30. Zhang S., Lu J., Wang S., Mao D., Miao S., Ji S. Multi-mycotoxins analysis in Pheretima using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry based on a modified QuEChERS method. *Journal of Chromatography B.* 2016;1035:31–41. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.022.
31. Xing Y., Meng W., Sun W., Li D., Yu Z., Tong L., Zhao Y. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 21 mycotoxins in Radix Paeoniae Alba by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. *Journal of Chromatography B*. 2016;1031:202–213. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.07.008.
32. Ali N., Hashim N. H., Saad B., Safan K., Nakajima M., Yoshizawa T. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(12):1763–1772. DOI: 10.1016/j.fct.2005.05.019.
33. Tassaneeyakul W., Razzazi-Fazeli E., Porasuphatana S., Josef B. Contamination of Aflatoxins in Herbal Medicinal Products in Thailand. Mycopathologia. 2004;158(2):239–244. DOI: 10.1023/b:myco.0000041892.26907.b4.
34. Al-Owaisi A., Al-Sadi A. M., Al-Sabahi J. N., Sathish Babu S. P., Al-Harrasi M. M. A., Al-Mahmooli I. H., Abdel-Jalil R., Velazhahan R. In vitro detoxification of aflatoxin B1 by aqueous extracts of medicinal herbs. *All life*. 2022;15:314–324. DOI: 10.1080/26895293.2022.2049900.
35. Zhang R., Tan Z. C., Huang K. C., Wen Y., Li X. Y., Zhao J. L., Liu C. L. A Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by UPLC-MS/MS for Simultaneous Determination of Pesticides and Aflatoxins in Herbal Tea. *Molecules*. 2019;24(6):1029. DOI: 10.3390/molecules24061029.
36. Chen L., Guo W., Zheng Y., Zhou J., Liu T., Chen W., Liang D., Zhao M., Zhu Y., Wu Q., Zhang J. Occurrence and Characterization of Fungi and Mycotoxins in Contaminated Medicinal Herbs. *Toxins*. 2020;12(1):30. DOI: 10.3390/toxins12010030.
37. Filipiak-Szok A., Kurzawa M., Szłyk E., Twarużek M., Błajet-Kosicka A., Grajewski J. Determination of mycotoxins, alkaloids, phytochemicals, antioxidants and cytotoxicity in Asiatic ginseng (Ashwagandha, Dong quai, Panax ginseng). *Chemical Papers*. 2017;71(6):1073–1082. DOI: 10.1007/s11696-016-0028-0.
38. Mannani N., Tabarani A., Abdennebi E. H., Zinedine A. Assessment of aflatoxin levels in herbal green tea available on the Moroccan market. *Food Control*. 2019;108:106882. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106882.
39. Lee D., Lyu J., Lee K. G. Analysis of aflatoxins in herbal medicine and health functional foods. *Food Control*. 2015;48:33–36. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.007.
40. Liu L., Jin H., Sun L., Ma S., Lin R. Determination of Aflatoxins in Medicinal Herbs by High-performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 2012;23(5):469–476. DOI: 10.1002/pca.2343.
41. Chien M. Y., Yang C. M., Huang C. M., Chen C. H. Investigation of aflatoxins contamination in herbal materia medica in a Taiwan pharmaceutical factory. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017;26(3):1154–1159. DOI: 10.1016/j.jfda.2018.01.016.
42. Shim W. B., Kim K., Ofori J. A., Chung Y. C., Chung D. H. Occurrence of Aflatoxins in Herbal Medicine Distributed in South Korea. *Journal of Food Protection*. 2012;75(11):1991–1999. DOI: 10.4315/0362-028x.jfp-12-190.
43. Tosun H., Arslan R. Determination of aflatoxin B1 levels in organic spices and herbs. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:1–4. DOI: 10.1155/2013/874093.
44. Santos L., Marín S., Sanchis V., Ramos A. J. Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009;89(10):1802–1807. DOI: 10.1002/jsfa.3647.
45. Hu S., Dou X., Zhang L., Xie Y., Yang S., Yang M. Rapid detection of aflatoxin B1 in medicinal materials of radix and rhizome by gold immunochromatographic assay. *Toxicon*. 2018;150:144–150. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.05.015.
46. Буклагин Д. С. Методы определения микотоксинов в сельскохозяйственной продукции и кормах. *Техника и технологии в животноводстве*. 2020;4(40):57–67.

47. Bugno A., Almodovar A. A. B., Pereira T. C., Pinto, T. J. A., Sabino M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37(1): 47–51. DOI: 10.1590/S1517-83822006000100009.
48. Honma Y., Naito S., Earnshaw A., Nagashima H., Goto T. Progress in the accuracy of mycotoxin analysis in the last quarter century. *Mycotoxins*. 2004;54(1):33–38. DOI: 10.2520/myco.54.33.
49. Lin L., Zhang J., Wang P., Wang Y., Chen J. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*. 1998;815(1):3–20. DOI: 10.1016/s0021-9673(98)00204-0.
50. Rizzo I., Vedoya G., Maurutto S., Haidukowski M., Edith Varsavsky E. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. *Microbiological Research*. 2004;159(2):113–120. DOI: 10.1016/j.micres.2004.01.013.
51. Halt M. Moulds and Mycotoxins in Herb Tea and Medicinal Plants. *European Journal of Epidemiology*. 1998;14(3):269–274. DOI: 10.1023/a:1007498613538.
52. Ahmad B., Ashiq S., Hussain A., Bashir S., Hussain M. Evaluation of mycotoxins, mycobiota, and toxigenic fungi in selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Fungal Biology*. 2014;118(9–10):776–784. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.06.002.
53. Aiko V., Mehta A. Prevalence of toxigenic fungi in common medicinal herbs and spices in India. *3 Biotech*. 2016;6(159):1–10. DOI: 10.1007/s13205-016-0476-9.
54. Cigic I. K., Prosen H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10(1):62–115. DOI: 10.3390/ijms10010062.
55. Амелин В. Г., Лаврухина О. И. Обеспечение безопасности пищевых продуктов средствами химического анализа. *Журнал аналитической химии*. 2017;72(1):3–49. DOI: 10.7868/S0044450217010030.
56. Яшин А. Я., Веденин А. Н., Яшин Я. И., Василевич Н. И. Контроль качества и безопасности пищевых продуктов методом ВЭЖХ. *Лаборатория и производство*. 2019;1:78–87. DOI: 10.32757/2619-0923.2019.1.5.78.90.
57. Ferreira I. M., Mendes E., Oliveira M. B. Quantification of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in pepper by HPLC/Fluorescence. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2003;27(2):325–334. DOI: 10.1081/jlc-120027103.
58. Chen A., Mao X., Sun Q., Wei Z., Li J., You Y., Zhao J., Jiang G., Wu Y., Wang L., Li Y. Alternaria Mycotoxins: An Overview of Toxicity, Metabolism, and Analysis in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(28):7817–7830. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c03007.
59. Scott P. M. Mycotoxin methodology. *Food Additives and Contaminants*. 1995;12(3):395–403. DOI: 10.1080/02652039509374321.
60. Xu F., Weijun Y., Meihua Y., Zhen O. Latest Advancement for Detection Methods of Mycotoxins in Traditional Chinese Medicine. *World Science and Technology*. 2012;14(5):1944–1952. DOI: 10.1016/S1876-3553(13)60011-3.
61. Резникова Л. Г., Полоневич А. Г., Сравнительный анализ различных методов определения Охратоксина А. *Здоровье и окружающая среда*. 2010;15:445–449.
62. Стёпкин Ю. И., Скопинцева В. Л., Оболонский М. Ф. Использование метода иммуноферментного анализа в лабораторной практике при контроле микотоксинов. *Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья № 57*. 2014;57:67–70.
63. Cigic I. K., Prosen H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10(1):62–115. DOI: 10.3390/ijms10010062.
64. Rahman H. U., Xiaofeng Y., Qiuyu Y., Huali X., Wen Z., Qi Z., Peiwu L. Specific Antigen Based and Emerging Detection Technologies of Mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;99(11):4869–4877. DOI: 10.1002/jsfa.9686.
65. Родникова А. А., Белецкий С. Л. Экспресс-контроль уровня микотоксинов в зерне и продуктах его переработки при длительном хранении. *Научный сборник Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей для государственных нужд*. 2016;5:43–46.
66. Урусов А. Е., Костенко С. Н., Свешников П. Г., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. Определение охратоксина А иммунохроматографическим методом. *Журнал аналитической химии*. 2011;66(8):884–890.
67. Тринеева О. В. Методы и перспективы определения микотоксинов в лекарственном растительном сырье (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):67–109. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-67-109.

REFERENCES

1. Zain M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2011;15(2):129–144. DOI: 10.1016/j.jscs.2010.06.006.
2. Hao W., Li A., Wang J., An G., Guan S. Mycotoxin Contamination of Feeds and Raw Materials in China in Year 2021. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022;9:1–11. DOI: 10.3389/fvets.2022.929904.
3. Pallares N., Berrada H., Font G., Ferrer E. Mycotoxins occurrence in medicinal herbs dietary supplements and exposure assessment. *Journal of Food Science and Technology*. 2022;59(7):2830–2841. DOI: 10.1007/s13197-021-05306-y.
4. Su C., Hu Y., Gao D., Luo Y., Amanda J. C., Jiao X., Gao W. Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins on Root Herbs from Chinese Markets. *Journal of Food Protection*. 2018;81(5):754–761. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-405.
5. Yu J., Yang M., Han J., Pang X. Fungal and mycotoxin occurrence, affecting factors, and prevention in herbal medicines: a review. *Toxin Reviews*. 2022;41(3):976–994. DOI: 10.1080/15569543.2021.1925696.
6. Zhao D. T., Gao Y. J., Zhang W. J., Bi T. C., Wang X., Ma C. X., Rong R. Development a multi-immunoaffinity column LC-MS-MS method for comprehensive investigation of mycotoxins contamination and co-occurrence in traditional Chinese medicinal materials. *Journal of Chromatography B*. 2021;1178:122730. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122730.
7. Adam M. A. A., Tabana Y. M., Musa K. B., Sandai D. A. Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer (review). *Oncology Reports*. 2017;1321–1336. DOI: 10.3892/or.2017.5424.
8. Wei G., Guo X., Liang Y., Liu C., Zhang G., Liang C., Huang Z., Zheng Y., Chen S., Dong L. Occurrence of fungi and mycotoxins in herbal medicines and rapid detection of toxin-producing fungi. *Environmental Pollution*. 2023;333:122082. DOI: 10.1016/j.envpol.2023.122082.
9. Areo O. M., Phoku Z. J., Gbashi S., Njoben B. P. A preliminary study of multi-mycotoxins contamination in some selected South Africa medicinal plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2020;32(6):426–433. DOI: 10.9755/ejfa.2020.v32.i6.2113.
10. Zhu Y. P., Woerdenbag H. J. Traditional Chinese herbal medicine. *Pharmacy World and Science*. 1995;17:103–112. DOI: 10.1007/BF01872386.
11. Singh B. K., Tiwari S., Maurya A., Kumar S., Dubey N. K. Fungal and mycotoxin contamination of herbal raw materials and their protection by nanoencapsulated essential oils: An overview. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022;39:102257. DOI: 016/j.bcab.2021.102257.
12. Pallares N., Tolosa J., Ferrer E., Berrada H. Mycotoxins in raw materials, beverages and supplements of botanicals: A review of occurrence, risk assessment and analytical methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 2022;165:113013. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113013.
13. Altyn I., Twaruzek M. Mycotoxin Contamination Concerns of Herbs and Medicinal Plants. *Toxins*. 2020;12(3):182. DOI: 10.3390/toxins12030182.
14. Whitaker T. B. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control*. 2003;14(4):233–237. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00012-4.
15. Iqbal S. Z. Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*. 2021;42:237–247. DOI: 10.1016/j.cofs.2021.07.003

16. Amelin V. G., Karaseva N. M., Tretyakov A. V. Chromatographic methods for the determination of mycotoxins in food products. *Journal of Analytical Chemistry*. 2013;68(3):212–223. (In Russ.) DOI: 10.7868/S004445021303002X.
17. GOST 13586.3-83. Grain. Acceptance Rules and Sampling Methods. Moscow: *Standartinform Publishing House*; 2009. (In Russ.)
18. Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*. 2009;632(2):168–180. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.010.
19. Pallares N., Tolosa J., Ferrer E., Berrada H. Mycotoxins in raw materials, beverages and supplements of botanicals: A review of occurrence, risk assessment and analytical methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 2022;165:113013. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113013.
20. Chunyan S., Yongjian H., Dan G., Yi L., Amanda J. C., Xiaolin J., Weiwei G. Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins on Root Herbs from Chinese Markets. *Journal of Food Protection*. 2018;81(5):754–761. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-405.
21. Zhao D. T., Gao Y. J., Zhang W. J., Bi T. C., Wang X., Ma C. X., Rong R. Development a multi-immunoaffinity column LC-MS-MS method for comprehensive investigation of mycotoxins contamination and co-occurrence in traditional Chinese medicinal materials. *Journal of Chromatography B*. 2021;1178:122730. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122730.
22. Lizhi W., Zhen W., Weiwei G., Juan C., Meihua Y., Ying K., Linfang H., Shilin C. Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A in licorice roots and fritillary bulbs by solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2013;138(2–3):1048–1054. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.066.
23. Sarkar R., Shinde R., Dhanshetty M., Banerjee K. Multi-mycotoxin analysis method using liquid chromatography with tandem mass spectrometry and fluorescence detection in Indian medicinal herbs: Development and validation. *Journal of Chromatography A*. 2022;1677:463310. DOI: 10.1016/j.chroma.2022.463310.
24. Caldeirão L., Sousa J., Nunes L. C. G., Godoy H. T., Fernandes J. O., Cunha S. C. Herbs and herbal infusions: Determination of natural contaminants (mycotoxins and trace elements) and evaluation of their exposure. *Food Research International*. 2021;144:110322. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110322.
25. Żwir-Ferenc A., Biziuk M. Solid Phase Extraction Technique – Trends,Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2006;15(5):677–690.
26. Monbaliu S., Aibo W., Zhang D., Peteghem C. V., Saeger S. D. Multimycotoxin UPLC–MS/MS for Tea, Herbal Infusions and the Derived Drinkable Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(24):12664–12671. DOI: 10.1021/jf1033043.
27. Scott P. M., Trucksess M. W. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *Journal of AOAC international*. 1997;80(5):941–950. DOI: 10.1093/jaoac/80.5.941.
28. Castegnaro M., Tozlovanu M., Wild C., Molinié A., Sylla A., Pfohl-Leszkowicz A. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. *Journal of AOAC international*. 2006;50(6):480–487. DOI: 10.1002/mnfr.200500264.
29. Musarurwa H., Chimuka L., Pakade VE., Tavengwa N. T. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019;84:103314. DOI: 10.1016/j.jfca.2019.103314.
30. Zhang S., Lu J., Wang S., Mao D., Miao S., Ji S. Multi-mycotoxins analysis in Pheretima using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry based on a modified QuEChERS method. *Journal of Chromatography B*. 2016;1035:31–41. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.022.
31. Xing Y., Meng W., Sun W., Li D., Yu Z., Tong L., Zhao Y. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 21 mycotoxins in Radix Paeoniae Alba by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. *Journal of Chromatography B*. 2016;1031:202–213. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.07.008.
32. Ali N., Hashim N. H., Saad B., Safan K., Nakajima M., Yoshizawa T. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(12):1763–1772. DOI: 10.1016/j.fct.2005.05.019.
33. Tassaneeyakul W., Razzazi-Fazeli E., Porasuphatana S., Josef B. Contamination of Aflatoxins in Herbal Medicinal Products in Thailand. Mycopathologia. 2004;158(2):239–244. DOI: 10.1023/b:myco.0000041892.26907.b4.
34. Al-Owaisi A., Al-Sadi A. M., Al-Sabahi J. N., Sathish Babu S. P., Al-Harrasi M. M. A., Al-Mahmooli I. H., Abdel-Jalil R., Velazhahan R. In vitro detoxification of aflatoxin B1 by aqueous extracts of medicinal herbs. *All life*. 2022;15:314–324. DOI: 10.1080/26895293.2022.2049900.
35. Zhang R., Tan Z. C., Huang K. C., Wen Y., Li X. Y., Zhao J. L., Liu C. L. A Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by UPLC-MS/MS for Simultaneous Determination of Pesticides and Aflatoxins in Herbal Tea. *Molecules*. 2019;24(6):1029. DOI: 10.3390/molecules24061029.
36. Chen L., Guo W., Zheng Y., Zhou J., Liu T., Chen W., Liang D., Zhao M., Zhu Y., Wu Q., Zhang J. Occurrence and Characterization of Fungi and Mycotoxins in Contaminated Medicinal Herbs. *Toxins*. 2020;12(1):30. DOI: 10.3390/toxins12010030.
37. Filipiak-Szok A., Kurzawa M., Szłyk E., Twarużek M., Błajet-Kosicka A., Grajewski J. Determination of mycotoxins, alkaloids, phytochemicals, antioxidants and cytotoxicity in Asiatic ginseng (Ashwagandha, Dong quai, Panax ginseng). *Chemical Papers*. 2017;71(6):1073–1082. DOI: 10.1007/s11696-016-0028-0.
38. Mannani N., Tabarani A., Abdennebi E. H., Zinedine A. Assessment of aflatoxin levels in herbal green tea available on the Moroccan market. *Food Control*. 2019;108:106882. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106882.
39. Lee D., Lyu J., Lee K. G. Analysis of aflatoxins in herbal medicine and health functional foods. *Food Control*. 2015;48:33–36. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.007.
40. Liu L., Jin H., Sun L., Ma S., Lin R. Determination of Aflatoxins in Medicinal Herbs by High-performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 2012;23(5):469–476. DOI: 10.1002/pca.2343.
41. Chien M. Y., Yang C. M., Huang C. M., Chen C. H. Investigation of aflatoxins contamination in herbal materia medica in a Taiwan pharmaceutical factory. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017;26(3):1154–1159. DOI: 10.1016/j.jfda.2018.01.016.
42. Shim W. B., Kim K., Ofori J. A., Chung Y. C., Chung D. H. Occurrence of Aflatoxins in Herbal Medicine Distributed in South Korea. *Journal of Food Protection*. 2012;75(11):1991–1999. DOI: 10.4315/0362-028x.jfp-12-190.
43. Tosun H., Arslan R. Determination of aflatoxin B1 levels in organic spices and herbs. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:1–4. DOI: 10.1155/2013/874093.
44. Santos L., Marín S., Sanchis V., Ramos A. J. Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009;89(10):1802–1807. DOI: 10.1002/jsfa.3647.
45. Hu S., Dou X., Zhang L., Xie Y., Yang S., Yang M. Rapid detection of aflatoxin B1 in medicinal materials of radix and rhizome by gold immunochromatographic assay. *Toxicon*. 2018;150:144–150. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.05.015.
46. Buklagin D. S., Methods for determining mycotoxins in agricultural products and feed. *Equipment and technologies in animal husbandry*. 2020;4(40):57–67. (In Russ.)
47. Bugno A., Almodovar A. A. B., Pereira T. C., Pinto, T. J. A., Sabino M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37(1): 47–51. DOI: 10.1590/S1517-83822006000100009.
48. Honma Y., Naito S., Earnshaw A., Nagashima H., Goto T. Progress in the accuracy of mycotoxin analysis in the last quarter century. *Mycotoxins*. 2004;54(1):33–38. DOI: 10.2520/myco.54.33.
49. Lin L., Zhang J., Wang P., Wang Y., Chen J. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chroma-

tographic methods. *Journal of Chromatography A*. 1998;815(1):3–20. DOI: 10.1016/s0021-9673(98)00204-0.
50. Rizzo I., Vedoya G., Maurutto S., Haidukowski M., Edith Varsavsky E. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. *Microbiological Research*. 2004;159(2):113–120. DOI: 10.1016/j.micres.2004.01.013.
51. Halt M. Moulds and Mycotoxins in Herb Tea and Medicinal Plants. *European Journal of Epidemiology*. 1998;14(3):269–274. DOI: 10.1023/a:1007498613538.
52. Ahmad B., Ashiq S., Hussain A., Bashir S., Hussain M. Evaluation of mycotoxins, mycobiota, and toxigenic fungi in selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Fungal Biology*. 2014;118(9–10):776–784. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.06.002.
53. Aiko V., Mehta A. Prevalence of toxigenic fungi in common medicinal herbs and spices in India. *3 Biotech*. 2016;6(159):1–10. DOI: 10.1007/s13205-016-0476-9.
54. Cigic I. K., Prosen H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10(1):62–115. DOI: 10.3390/ijms10010062.
55. Amelin V. G., Lavrukhina O. I. Ensuring Food Safety by Means of Chemical Analysis. *Journal of Analytical Chemistry*. 2017;72(1):3–49. (In Russ.)
56. Yashin A. Ya., Vedenin A. N., Vasilevich N. I. Quality Control and Food Safety by HPLC. *Laboratory and Production*. 2019;1:78–87. (In Russ.) DOI: 10.32757/2619-0923.2019.1.5.78.90.
57. Ferreira I. M., Mendes E., Oliveira M. B. Quantification of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in pepper by HPLC/Fluorescence. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2003;27(2):325–334. DOI: 10.1081/jlc-120027103.
58. Chen A., Mao X., Sun Q., Wei Z., Li J., You Y., Zhao J., Jiang G., Wu Y., Wang L., Li Y. Alternaria Mycotoxins: An Overview of Toxicity, Metabolism, and Analysis in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(28):7817–7830. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c03007.
59. Scott P. M. Mycotoxin methodology. *Food Additives and Contaminants*. 1995;12(3):395–403. DOI: 10.1080/02652039509374321.
60. Xu F., Weijun Y., Meihua Y., Zhen O. Latest Advancement for Detection Methods of Mycotoxins in Traditional Chinese Medicine. *World Science and Technology*. 2012;14(5):1944–1952. DOI: 10.1016/S1876-3553(13)60011-3.
61. Reznikova L. G., Polonevich A. G., Comparative analysis of various methods for determining Ochratoxin A. *Health and environment*. 2010;15:445–449. (In Russ.).
62. Stepkin Yu. I., Skopintseva V. L., Obolonsky M. F. Use of the enzyme-linked immunoassay method in laboratory practice in the control of mycotoxins. *Scientific and medical bulletin of the Central Black Earth Region № 57*. 2014;57:67–70. (In Russ.)
63. Cigic I. K., Prosen H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10(1):62–115. DOI: 10.3390/ijms10010062.
64. Rahman H. U., Xiaofeng Y., Qiuyu Y., Huali X., Wen Z., Qi Z., Peiwu L. Specific Antigen Based and Emerging Detection Technologies of Mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;99(11):4869–4877. DOI: 10.1002/jsfa.9686.
65. Rodnikova A. A., Beletsky S. L. Express control of the level of mycotoxins in grain and its processing products during long-term storage. *Scientific collection Innovative technologies of production and storage of material values for state needs*. 2016;5:43–46. (In Russ.)
66. Urusov A. E., Kostenko S. N., Sveshnikov P. G., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Determination of Ochratoxin A by immunochromatographic method. *Journal of Analytical Chemistry*. 2011;66(8):884–890. (In Russ.)
67. Trineeva O. V. Methods and Prospects for Determination of Mycotoxins in Medicinal Herbal Raw Materials (Review). *Drug development & registration*. 2020;9(3):67–109. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-67-109.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1332
УДК 615.071

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Люминесцентная микроскопия в идентификации близкородственных видов на примере рода *Persicaria* Mill.

А. А. Гудкова✉, А. С. Чистякова, А. И. Сливкин, А. С. Болгов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Гудкова Алевтина Алексеевна. **E-mail:** al.f84@mail.ru

ORCID: А. А. Гудкова – https://orcid.org/0000-0002-1275-5000; А. С. Чистякова – https://orcid.org/0000-0002-8291-9904;
А. И. Сливкин – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354; А. С. Болгов – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953.

Статья поступила: 30.09.2022 **Статья принята в печать:** 25.01.2024 **Статья опубликована:** 26.01.2024

Резюме

Введение. Вопрос стандартизации и оценки качества лекарственного растительного сырья в настоящее время является одним из важнейших. Для этого оценивается ряд параметров, первичным из которых является подлинность анализируемого растительного объекта. Проблема идентификации официнальных, а также новых перспективных видов растений, особенно при наличии близкородственных примесных видов, характерна для многих семейств и родов, среди которых можно выделить род *Persicaria* Mill. (горец). Два вида этого рода, на которые разработана нормативная документация (ФС), используются в медицинской практике. Схожесть морфолого-анатомических признаков видов растений диктует необходимость использования дополнительных современных методов анализа, позволяющих всесторонне выявлять характерные особенности видов. Одним из подобных селективных методов диагностики растительного сырья, наряду с общеизвестными и используемыми в фармацевтическом анализе, является люминесцентная микроскопия.

Цель. Целью являлось изучение особенностей люминесценции близкородственных видов рода горец *Persicaria* Mill. для усовершенствования процесса стандартизации официнальных видов сырья.

Материалы и методы. Для работы были использованы 10 видов рода *Persicaria* Mill. семейства *Polygonaceae* Juss., наиболее часто встречающиеся в Центральном Черноземье: *P. maculosa* Gray, *P. tomentósa* Bicknell, *P. lapathifólia* Delarbre, *P. nodósa* Opiz, *P. scábra* Moldenke, *P. brittingeri* Opiz, *P. hydropiper* Delarbre, *P. mínor* Opiz, *P. amphibia* Delarbre, *P. amphibia* var. *terréstris* Munshi & Javeid. Растения срезали на высоте около 15 см от почвы во время массового цветения летом 2020 года в Воронежской области, высушивали в тени. Предварительно перед проведением исследования растения были разделены на морфологические составляющие (стебли, листья, черешки, раструбы, цветки, плоды), для чего использовались гербарные образцы в высушенном виде, и рассматривались отдельные части, расправленные на предметном стекле. Для оценки люминесценции объектов использовали микроскоп «Микромед-3 Люм» (Россия) с корпусом люминесцентной насадки.

Результаты и обсуждение. Выявлено, что общим для всех изученных видов является интенсивная флуоресценция крупных трихом, проводящей системы, замыкающих клеток устьиц, утолщений клеточных стенок и – у некоторых видов – содержимого вместилищ и железок. Выявлен ряд характерных особенностей люминесценции тканей для изучаемых видов: *P. hydropiper* на всех морфологических частях имеет многочисленные ярко светящиеся вместилища и железки. Для *P. maculosa* впервые установлено наличие крупных вместилищ по жилкам. Околоцветник, железки и нитевидные волоски раструба *P. brittingeri* имеют отчетливо видимую желтовато-зеленую люминесценцию. Железки листа *P. tomentósa,* в отличие от других видов, не имеют свечения. Околоцветники *P. scábra* и *P. tomentósa* имеют желтовато-оранжевое свечение. Пленчатые трихомы хорошо заметны у *P. lapathifólia* и выделяются коричневатым оттенком. Наибольшее количество длинных пучковых трихом, имеющих яркое зеленоватое свечение, характерно для *P. amphibia* var. *terréstris.*

Заключение. Метод люминесцентной микроскопии был впервые применен для анализа и выявления идентификационных параметров близкородственных видов рода *Persicaria*, установлены и визуализированы новые диагностические особенности, способствующие максимально точной идентификации видов рода *Persicaria.*

Ключевые слова: люминесцентная микроскопия, подлинность, близкородственные виды, примеси, род горец

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

Вклад авторов. А. А. Гудкова и А. И. Сливкин отвечали за организационную часть исследования, осуществляли планирование эксперимента, постановку целей и задач исследования, участвовали в обсуждении полученных результатов. А. С. Чистякова и А. С. Болгов участвовали в заготовке объектов исследования, их идентификации, приведении в стандартное состояние и подготовке к исследованию. А. С. Болгов выполнил английский перевод. Все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Гудкова А. А., Чистякова А. С., Сливкин А. И., Болгов А. С. Люминесцентная микроскопия в идентификации близкородственных видов на примере рода *Persicaria* Mill. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):110–119. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1332

Luminescence Microscopy in the Identification of Closely related Species Using the Example of the Genus *Persicaria* Mill.

Alevtina A. Gudkova✉, Anna S. Chistyakova, Aleksei I. Slivkin, Aleksei S. Bolgov

Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394018, Russia

✉ **Corresponding author:** Alevtina A. Gudkova. **E-mail:** al.f84@mail.ru

© Гудкова А. А., Чистякова А. С., Сливкин А. И., Болгов А. С., 2024
© Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Slivkin A. I., Bolgov A. S., 2024

ORCID: Alevtina A. Gudkova – https://orcid.org/0000-0002-1275-5000; Anna S. Chistyakova – https://orcid.org/0000-0002-8291-9904; Aleksei I. Slivkin – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354; Aleksei S. Bolgov – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953.

Received: 30.09.2022 **Revised:** 25.01.2024 **Published:** 26.01.2024

Abstract

Introduction. The issue of standardization and quality assessment of medicinal plant materials is currently one of the most important. To do this, a number of parameters are evaluated, the primary of which is the assessment of the authenticity of the analyzed plant object. The problem of identifying official species in the presence of closely related species is typical for plants belonging to the genus *Persicaria* Mill., among which only two species are used in medical practice and there is regulatory documentation for the herbs of these plants. The similarity of morphological and anatomical features of plant species acceptable for medical use and impurities interprets the need to use additional modern methods of analysis. One of such selective methods for diagnosing plant materials, along with the well-known and used in pharmaceutical analysis, is luminescence microscopy.

Aim. The goal was to study the features of the luminescence of closely related species of the genus *Persicaria* Mill. to improve the process of their identification and standardization of official types of raw materials.

Materials and methods. For work, 10 species of the genus *Persicaria* Mill. were used from families *Polygonaceae* Juss., most common in the Central Chernozem region: *P. maculosa* Gray, *P. tomentósa* Bicknell, *P. lapathifólia* Delarbre, *P. nodósa* Opiz, *P. scábra* Moldenke, *P. brittingeri* Opiz, *P. hydropiper* Delarbre, *P. minor* Opiz, *P. amphibia* Delarbre, *P. amphibia* var. *terrestris* Munshi & Javeid. The plants were cut at a height of about 15 cm from the soil during mass flowering in the summer of 2020 in the Voronezh region, dried in the shade. Previously, before the study, the plants were divided into morphological components (stems, leaves, petioles, bells, flowers, fruits), for which herbarium samples were used in dried form and individual parts were examined, straightened on a glass slide. To assess the luminescence of objects, a Micromed-3 Lum microscope (Russia) with a luminescent nozzle housing was used.

Results and discussion. It was revealed that the intense fluorescence of large trichomes, the conducting system, guard cells of stomata, thickening of cell walls, and, in some species, the contents of receptacles and glands, is common to all studied species. A number of characteristic features of tissue luminescence for the studied species have been revealed: *P. hydropiper* has numerous brightly luminous receptacles and glands on all morphological parts. For *P. maculosa*, the presence of large receptacles along the veins was established for the first time. The perianth, glandules, and filiform hairs of the bell of *P. brittingeri* are clearly visible and have a yellowish-green luminescence. The leaf glands of *P. tomentósa*, unlike other species, do not have luminescence. The perianths of *P. scábra* and *P. tomentósa* have a yellowish-orange glow. The membranous trichomes are clearly visible in *P. lapathifólia* and stand out with a brownish tint. The largest number of long tufted trichomes with a bright greenish glow is characteristic of *P. amphibia* var. *terrestris*.

Conclusion. The method of luminescence microscopy was first applied to the analysis and identification of identification parameters, new diagnostic features were established and visualized, allowing the most accurate identification of species of the genus *Persicaria*.

Keywords: luminescent microscopy, authenticity, closely related species, impurities, species of the genus *Persicaria* Mill.

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

Contribution of the authors. Alevtina A. Gudkova and Aleksei I. Slivkin were responsible for the organizational part of the study, carried out the planning of the experiment, setting the goals and objectives of the study, and participated in the discussion of the results. Anna S. Chistyakova and Aleksei S. Bolgov participated in the preparation of research objects, their identification, bringing them to a standard state, and preparation for the study. Aleksei S. Bolgov made an English translation. All authors participated in the discussion of the obtained results in the format of a scientific discussion.

For citation: Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Slivkin A. I., Bolgov A. S. Luminescence microscopy in the identification of closely related species using the example of the genus *Persicaria* Mill. *Drug development & registration*. 2024;13(1):110–119. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1332

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос качества лекарственного растительного сырья в настоящее время является одним из важнейших. Для этого оценивается ряд параметров, первичным из которых является подлинность анализируемого растительного объекта.

Процесс определения подлинности растительного сырья затрудняется зачастую видовым разнообразием, в частности наличием близкородственных видов, имеющих сходные морфологические и анатомические признаки с официнальными объектами, однако выступающих в качестве примесей при заготовке последних [1].

Одним из первых этапов стандартизации растительного сырья, согласно Государственной фармакопее РФ XIV (ГФ РФ), является анализ его подлинности, что достигается оценкой внешних и анатомических характеристик объекта. Для этого могут быть использованы различные виды микроскопического анализа, в том числе и люминесцентная микроскопия, являющаяся селективным методом диагностики растительного сырья. Данный метод в последнее время все чаще привлекает внимание и вызывает интерес ученых, о чем свидетельствует ряд научных работ [2–13].

Люминесцентная микроскопия в совокупности с другими видами микроскопического анализа позволяет увеличить достоверность полученных результатов, что особенно важно при определении подлинности объектов для снижения числа случаев фальсификации продукции.

Проблема идентификации официнальных видов при наличии близкородственных характерна для многих видов растения, в том числе и видов рода горец *Persicaria* Mill., которые являются наиболее изменчивыми из всех представителей семейства гречишных [14] и повсеместно распространенных на территории РФ [15].

Данный род насчитывает, согласно разным источникам, от 66[1] [16] до 150 видов [14, 17], среди которых только два вида используются в медицинской практике и включены в ГФ РФ (ФС «Горца почечуйного трава» и ФС «Горца перечного трава»)[2]. Остальные виды рода *Persicaria* образуют обширные заросли, произрастая вместе с официнальными на одной территории, имеют сходное морфологическое строение, из-за чего ошибочно могут быть заготовлены. Несмотря на то, что все виды относятся к одному роду, химический состав примесных видов может быть отличным от комплекса биологически активных соединений официнальных, что повлечет за собой проявление иных фармакологических эффектов [18–22].

На сегодня в разных литературных источниках встречаются данные по морфологии, анатомии и гистологии травы некоторых видов горцев, что подробно освещено в работах отечественных и зарубежных авторов [22–29]. В работах [25, 29] описаны основные морфологические признаки травы и подземных органов горца почечуйного, визуализировано строение черешка и главной жилки. Анатомическое строение листьев изучаемых растений приведено в работах [23, 26, 29, 30]. Анатомии стебля пяти разных видов горцев, произрастающих на территории Индии, в том числе и горцев почечуйного и перечного, было уделено внимание ученых Университета Аллахабада [24]. Louis P. Ronse Decraenefls в своей работе изучал особенности морфологического и анатомического строения плодов в трибах Persicarieae и Polygonaceae [27].

Ghazalah Yasmin с соавт. [28] занимались изучением морфологии пыльцы 10 видов рода горец, среди которых фигурируют горцы перечный, земноводный и щавелелистный. Однако в научной литературе не описаны особенности люминесценции тканей разных морфологических органов видов рода горец, что позволяет более детально диагностировать видовую принадлежность растений, выявлять дополнительные особенности в строении и указывает на актуальность проведенного исследования.

Целью являлось изучение особенностей люминесценции близкородственных видов рода горец *Persicaria* Mill. для усовершенствования процесса стандартизации официнальных видов сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения сравнительного исследования особенностей люминесценции тканей близких видов растений были выбраны растения семейства гречишных (*Polygonaceae* Juss.), рода горец (персикария) (*Persicaria* Mill.), наиболее часто встречающиеся в Центральном Черноземье, которые условно разделены на 4 ряда: *Persicariaeformes* Kom., куда включен горец почечуйный *(Persicaria maculosa* Gray); *Lapathiiformes* Worosch., куда были отнесены горец шероховатый (*Persicaria scábra* Moldenke), горец войлочный (*Persicaria tomentósa* Bicknell), горец щавелелистный (*Persicaria lapathifólia* Delarbre), горец узловатый (*Persicaria nodósa* Opiz), горец Бриттингера (*Persicaria brittingeri* Opiz); *Hydropiperformes* Kom., где состоят горец перечный (*Persicaria hydropiper* Delarbre) и горец малый (*Persicaria mínor* Opiz); *Amphibia* Kom., включающий две разновидности горца земноводного – водную форму (*Persicaria amphibia* Delarbre) и наземную форму (*Persicaria amphibia* var. *terréstris* Munshi & Javeid) [30, 31]. Заготовке подлежала трава растений, которую срезали на высоте около 15 см от почвы во время массового цветения летом 2020 г. в Воронежской области (г. Воронеж).

Предварительно перед проведением исследования растения были разделены на морфологические составляющие (стебли, листья, черешки, раструбы, цветки, плоды), для чего использовались гербарные образцы в высушенном виде, и рассматривались отдельные части, расправленные на предметном стекле, согласно ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов», ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» ГФ РФ XIV[3]. Для оценки люминесценции объектов использовали микроскоп «Микромед-3 Люм» (Россия) с корпусом люминесцентной насадки (Россия) (лаборатория фитониринга проф. М. Поппа ФГБОУ ВО ВГУ). Микрофотографии были сделаны с помощью видеокамеры Levenhuk C310 NG (КНР).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате эксперимента были обнаружены признаки, частично описанные в более ранних работах [29, 30], а также выявлены новые диагностические особенности изучаемых растений. Данный вид анали-

[1] The Plant List. Available at: http://www.theplantlist.org. Accessed: 25.11.2022.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 25.11.2022.

[3] Государственная фармакопея Российской Федерации. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. Ссылка активна на 25.11.2022.

за служил одним из способов оценки морфологии поверхности с визуализацией автолюминесценции (без применения флуорохромов) некоторых структур, имеющих решающее значение для идентификации видов. Характер свечения тканей обусловлен присутствием разных биологически активных соединений, растворенных в клеточном соке. Представители семейства гречишных рассматриваются в качестве источников фенольных соединений, в частности флавоноидов, что объясняет желтовато-зеленый цвет люминесценции тканей растений.

Подробный анализ характера и топографии свечения видов рода *Persicaria* показал общие особенности: например, наиболее интенсивно флуоресцируют крупные трихомы, проводящая система, замыкающие клетки устьиц, утолщения клеточных стенок и – у некоторых видов – содержимое выделительных структур (вместилищ и железок).

Анализ люминесценции поверхности листа *P. amphibia* показал отсутствие свечения поверхности листовой пластинки ввиду наличия плотной кутикулы и отсутствия трихом, что является отличительной особенностью данного вида, в то время как у родственного *P. amphibia* var. *terréstris* на обеих поверхностях листа, но преимущественно на нижней, визуализируется зеленоватое свечение многочисленных пучковых трихом и главной жилки (рисунки 1, А, Б). Люминесценция тканей стеблей и черешков этих представителей рода не имеет диагностического значения.

При анализе люминесценции тканей околоцветника видов ряда Amphibia отчетливо заметно свечение проводящих пучков, расположенных по жилкам лепестков венчика, в то время как другие структуры (железки) не дают специфического свечения.

В рамках видов ряда Lapathiiformes люминесцентная картина объектов различается для видов внутри ряда. Из сходных признаков следует отметить отчетливую люминесценцию яркого зеленого цвета пучковых трихом, расположенных по краю листа и по его поверхности (рисунок 2, А), а также слабое свечение нитевидных трихом, которые хорошо визуализируются при проведении классического микроскопического анализа и являются характерным признаком видов изучаемого ряда (рисунок 2, Б).

Одной из главных диагностических особенностей представителей ряда Lapathiiformes являются железки, в видимом свете желтоватого цвета, располагающиеся на нижней стороне листа. Характер свечения данных структур у видов различен: у *P. scábra* и *P. brittingeri* они светятся желтовато-зеленым цветом, однако не дают свечения и имеют вид темных пятен у *P. tomentósa* (рисунки 2, В, Г), у остальных видов ряда железки не имеют люминесценции и незаметны. На жилках снизу листа *P. lapathifólia* визуализируются коричневого цвета пленчатые трихомы (рисунок 2, Д). Эпидермис черешков листьев за счет наличия кутикулы имеет зеленовато-коричневый оттенок (рисунок 2, Е). Сводные данные по характеру люминесценции видов ряда приведены в таблице 1.

Свечение листа *P. maculosa* в целом повторяет общую люминесцентную картину рода *Persicaria*. На жилке у основания листа *P. maculosa* и на его черешке встречаются вместилища, которые не были выявлены при стереомикроскопическом анализе и анатомической оценке растения (рисунок 4).

Отличительной особенностью люминесценции *P. hydropiper* является наличие на всех морфологических частях люминесцирующих ярко-желто-зеленым светом вместилищ и четырехклеточных железок (которые также характерны для горца малого, но имеют менее интенсивное свечение) (рисунок 5), имеющих одно-, двухклеточную ножку и многоклеточную головку, а также отчетливо выделяются коричневатые пленчатые волоски по жилкам снизу листа.

Как известно, виды рода *Persicaria* характеризуются наличием раструбов. Клетки раструбов и пучковые волоски на них у всех представителей имеют плотные стенки и обладают незначительной люминесценцией (желто-зеленого и оранжевого цвета).

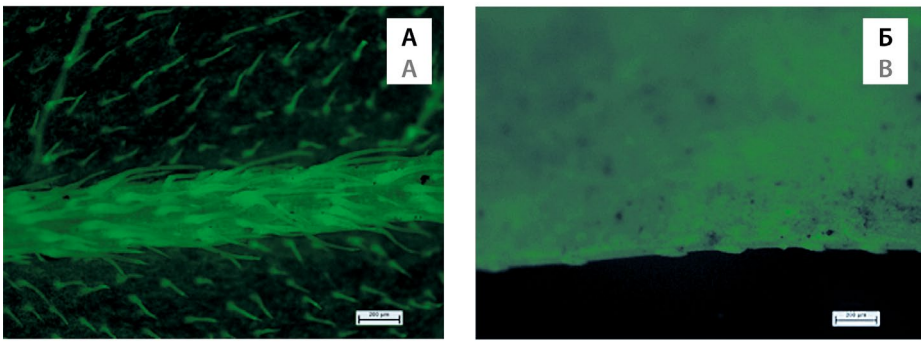


Рисунок 1. Люминесценция листовой пластинки:
А – *Persicaria amphibia* var. *terréstris*; Б – *Persicaria amphibia* (ув. х40)

Figure 1. Luminescence of the leaf:
A – *Persicaria amphibia* var. *terréstris*; B – *Persicaria amphibia* (x40)

Таблица 1. Сравнительная характеристика люминесценции видов ряда Lapathiiformes

Table 1. Comparative characteristics of the luminescence of species of the Lapathiiformes series

Вид / признак **Plant species / diagnostic character**	*Persicaria lapathifólia*	*Persicaria scábra*	*Persicaria tomentósa*	*Persicaria nodósa*	*Persicaria brittingeri*
Стебель, черешок **A stem, a petiole**					
Эпидермис Epidermis	Зеленовато-коричневый оттенок Greenish brown tint				
Пучковые трихомы Bundle trichomes	Не визуализируются Not rendered				
Пленчатые трихомы Membranous trichomes	Коричневая Brown				
Лист **A leaf**					
Эпидермис Epidermis	Темно-зеленая Dark green				
Пучковые трихомы Bundle trichomes	Яркая зеленовато-желтая Bright greenish yellow				
	Вытянутые, по всей верхней стороне и краю листа, редко по жилкам снизу Elongated, along the entire upper side and edge of the leaf, rarely along the veins below	Конические, редкие по верхней стороне и краю листа, редко по жилкам снизу Conical, sparse along the upper side and edge of the leaf, rarely along the veins below	Конические, по верхней стороне листа, редкие, удлиненные снизу Conical, on the upper side of the leaf, rare elongated from below	Сильно вытянутые, по всей верхней стороне и краю листа, многочисленны по жилкам снизу Strongly elongated, along the entire upper side and edge of the leaf, numerous along the veins below	По жилкам с обеих сторон и краю листа Along the veins on both sides and the edge of the leaf
Пленчатые трихомы Membranous trichomes	Коричневая Brown	Не визуализируются Not rendered			
Нитевидные трихомы Filamentous trichomes	Слабая зеленоватая Weak green				
Железки Glands	Не визуализируются Not rendered	Зеленоватая Greenish	Темные пятна Dark spots	Не визуализируются Not rendered	Зеленоватая Greenish
Раструб **A bell**					
Эпидермис Epidermis	Слабая зеленоватая Weak green				
Нитевидные трихомы Filamentous trichomes	Не визуализируются Not rendered				Слабая зеленая Weak green
Железки Glands	Не визуализируются Not rendered				Яркая желтовато-зеленая Bright yellowish green
Околоцветник An perianth					
Железки Glands	Не визуализируются Not rendered	Желтовато-оранжевая Yellowish orange		Не визуализируются Not rendered	Яркая желтовато-зеленая Bright yellowish green
Плод **A fruit**					
Поверхность плода Fruit surface	Яркое голубое Bright blue				

Исключением являются раструбы *P. brittingeri*, на поверхности которых ярко люминесцируют овальные образования, предположительно железки, с многоклеточной головкой и тонкой ножкой. Раструбы *P. maculosa* имеют слабое зеленовато-коричневое свечение, а у *P. hydropiper* визуализируется яркое зеленоватое свечение многочисленных вместилищ (рисунок 6).

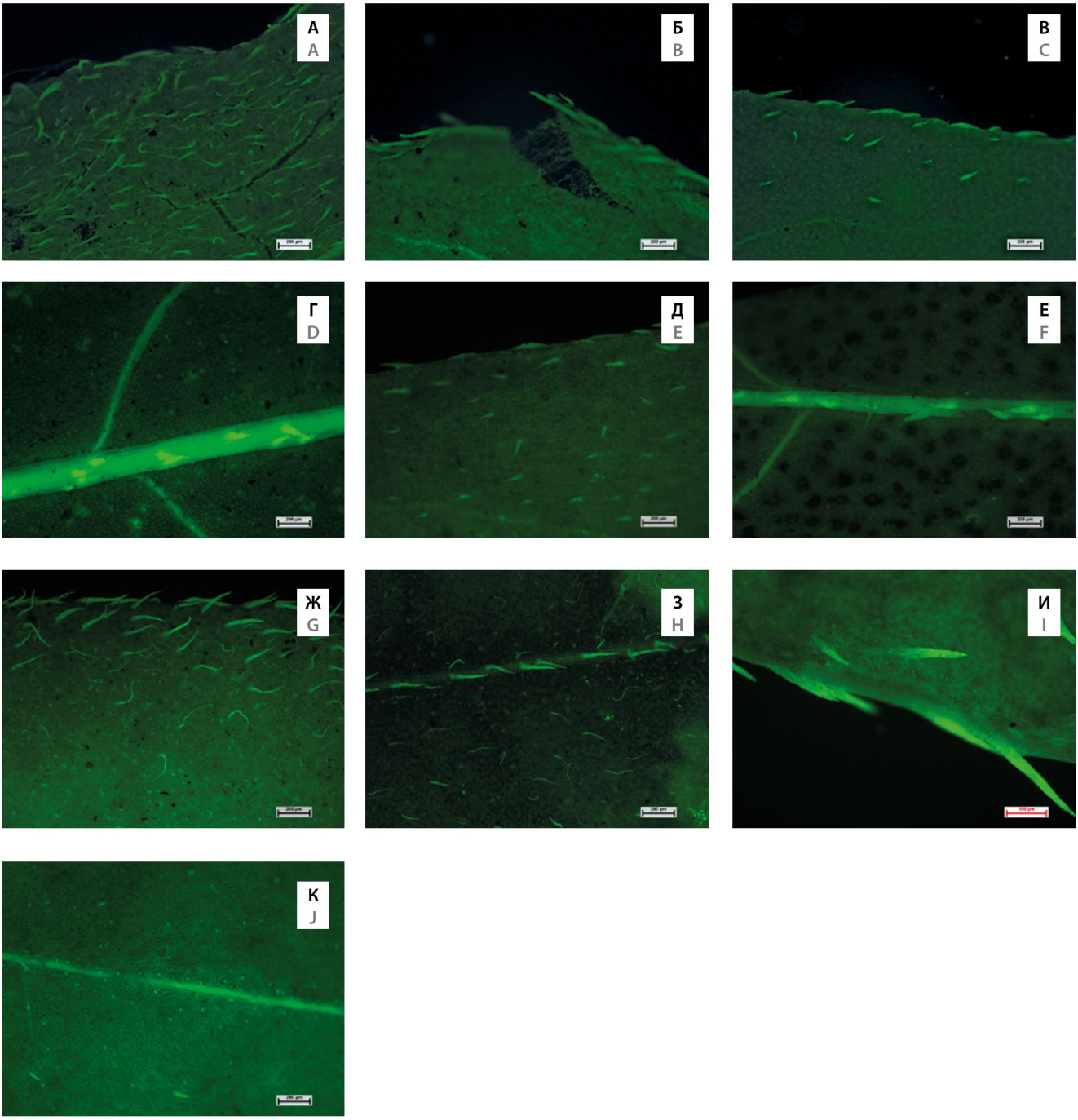


Рисунок 2. Люминесценция листьев видов рода *Persicaria* на примерах листа:

***P. lapathifólia*: А – верхняя сторона; Б – нижняя сторона (ув. х40). *P. scábra*: В – верхняя сторона; Г – нижняя сторона. *P. tomentósa*: Д – верхняя сторона; Е – нижняя сторона (ув. х40). *P. nodósa*: Ж – верхняя сторона; З – нижняя сторона. *P. brittingeri*: И – верхняя сторона; К – нижняя сторона**

Figure 2. Luminescence of leaves of species of the genus *Persicaria* on the examples:

***P. lapathifólia*: A – leaf upper side; B – lower side (x40). Luminescence of a *P. scábra*: C – leaf upper side; D – lower side. *P. tomentósa*: E – upper side; F – lower side (increase x40). *P. nodósa*: G – upper side; H – lower side. *P. brittingeri*: I – upper side; J – lower side**

В результате оценки люминесценции структур околоцветника выявлено, что в большинстве случаев при проведении люминесцентного анализа железки не визуализируются, однако на околоцветнике и цветоносах *P. brittingeri*, *P. scábra* (В), *P. tomentósa* железки имеют яркое зеленоватое свечение (рисунок 7).

Плоды всех видов изучаемого рода имеют яркое голубое свечение, что связано, очевидно, с присутствием в них жирного масла (рисунок 8).

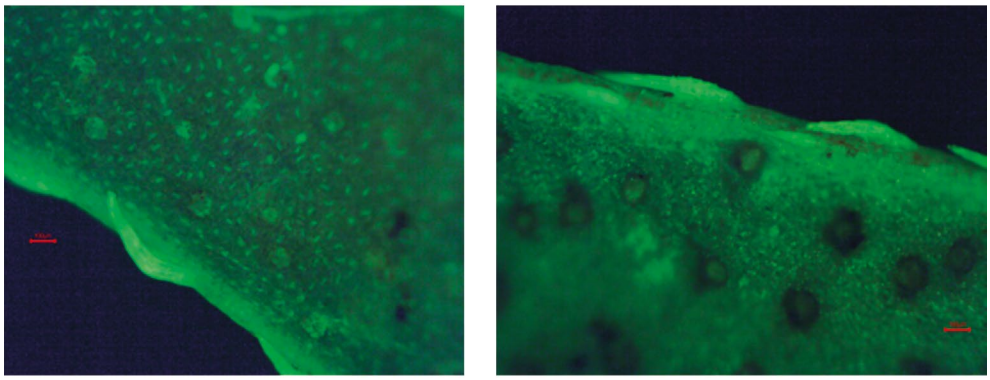


Рисунок 3. **Люминесценция железок видов рода *Persicaria* на примерах:**
А – *P. scábra* (ув.100); Б – *P. tomentósa* (ув. х100)

Figure 3. **Luminescence of glands of species of the genus *Persicaria* in examples:**
A – *P. scábra* (x100); B – *P. tomentosa* (x100)

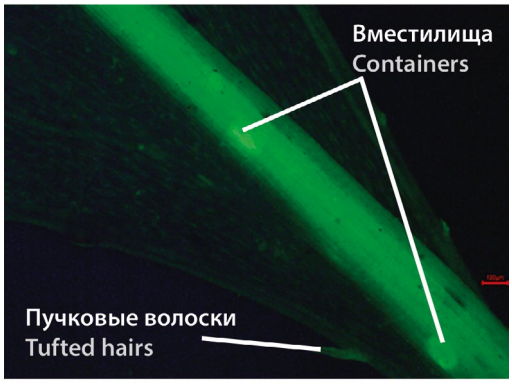


Рисунок 4. **Люминесценция фрагмента листа *P. maculosa* (ув. х40)**

Figure 4. **Luminescence of a *P. maculosa* leaf fragment (x40)**

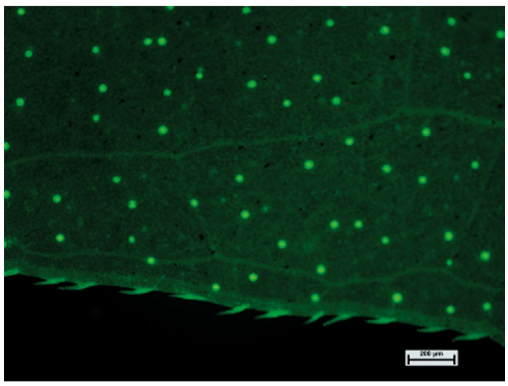


Рисунок 5. **Люминесценция фрагмента листа *P. hydropiper* (ув. х40)**

Figure 5. **Luminescence of a *P. hydropiper* leaf fragment (x40)**

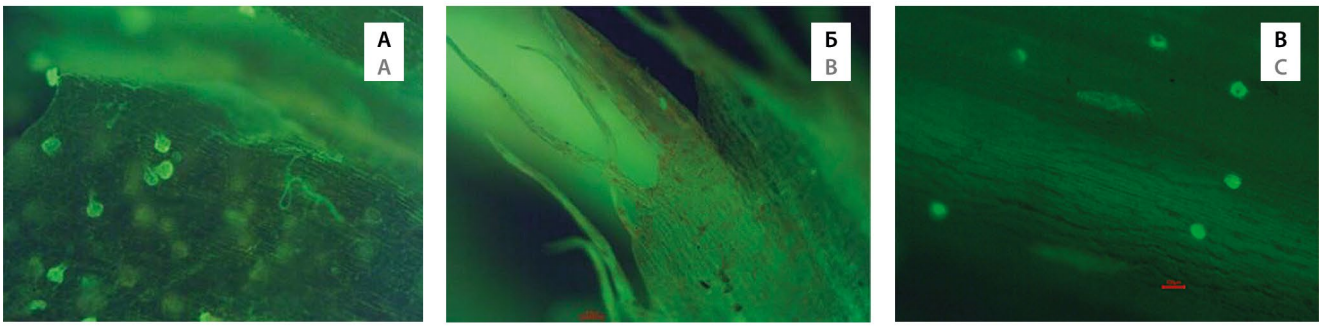


Рисунок 6. **Люминесценция фрагментов раструбов:**
А – *P. brittingeri* (ув. х100); Б – *P. maculosa* (ув. х40); В – *P. hydropiper* (ув. х100)

Figure 6. **Luminescence of fragments of bells:**
A – *P. brittingeri* (x100); B – *P. maculosa* (x40); C – *P. hydropiper* (x100)

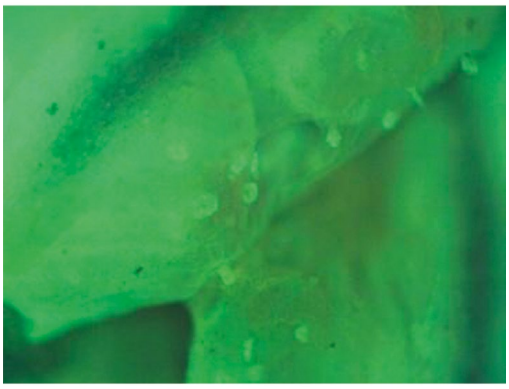


Рисунок 7. Люминесценция фрагмента околоцветника *P. scábra* (ув. x100)

Figure 7. Luminescence of a fragment of the perianth of *P. scábra* (x100)

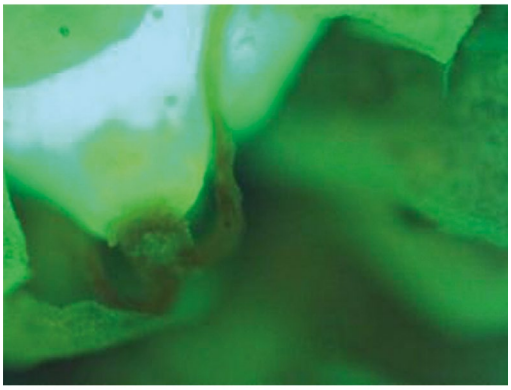


Рисунок 8. Люминесценция фрагмента плода *P. tomentósa* (ув. x100)

Figure 8. Luminescence of a *P. tomentósa* fruit fragment (x100)

Таким образом, информация о люминесценции изучаемых видов может быть применена для дифференцировки видовой принадлежности данной группы растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод люминесцентной микроскопии был впервые применен для анализа и выявления идентификационных параметров видов рода *Persicaria*. Выявлен ряд характерных особенностей люминесценции тканей для изучаемых видов: *P. hydropiper* на всех морфологических частях имеет многочисленные ярко светящиеся вместилища и железки. Для *P. maculosa* впервые установлено наличие крупных вместилищ по жилкам. Околоцветник, железки и нитевидные волоски раструба *P. brittingeri* отчетливо заметны, имеют желтовато-зеленую люминесценцию. Железки листа *P. tomentósa,* в отличие от других видов, не имеют свечения. Околоцветники *P. scábra* и *P. tomentósa* имеют желтовато-оранжевое свечение. Пленчатые трихомы у *P. lapathifólia* хорошо заметны и выделяются коричневатым оттенком. Наибольшее количество длинных пучковых трихом, имеющих яркое зеленоватое свечение, характерно для *P. amphibia* var. *terréstris*.

Полученная информация может быть использована в качестве дополнительной для определения подлинности официнальных видов рода *Persicaria*, а также имеет важное значение в дальнейшем в случае включения в ранг официнальных видов, являющихся на настоящий момент примесными, и необходимости разработки нормативной документации на представленные в работе виды растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зименкина Н. И., Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Люминесцентный анализ коры ореха грецкого (*Juglans regia* L.). В сб.: Международная научная конференция «От растения до лекарственного препарата». Москва. 04–05 июня 2020. С. 233–238. Доступно по: http://www.fbm.msu.ru/science/conference/detail/?ELEMENT_ID=19663. Ссылка активна на 25.11.2022.
2. Никитина А. С., Логвиненко Л. А., Никитина Н. В., Нигарян С. А. Морфометрическое и гистохимическое исследование травы мелиссы лекарственной из коллекции Никитского ботанического сада. *Фармация и фармакология*. 2018;6(6):504–534. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-6-504-534.
3. Гусакова Е. М., Сазанова К. Н., Шарипова С. Х., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Люминесцентная микроскопия цветков лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapitala* Gilib.). В сб.: II Межвузовская научно-практическая конференция «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы». Самара. 07 октября 2017. 128–137 с.
4. Baldacci-Cresp F., Spriet C., Twyffels L., Blervacq A.-S., Neutelings G., Baucher M., Hawkins S. A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. *Plant Journal*. 2020;102(5):1074–1089.
5. Kitin P., Nakaba S., Hunt C. G., Lim S., Funada R. Direct fluorescence imaging of lignocellulosic and suberized cell walls in roots and stems. *AoB PLANTS*. 2020;12(4):1–19.
6. Pegg T. J., Gladish D. K., Baker R. L. Algae to angiosperms: Autofluorescence for rapid visualization of plant anatomy among diverse taxa. *Applications in Plant Sciences*. 2021;9(6):e11437.
7. Соколов Н. С., Белов П. В., Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Морфолого-анатомическое исследование семян каштана конского (*Aesculus hippocastanum*) методом люминесцентной микроскопии. В сб.: II Межвузовская научно-практическая конференция «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы». Самара. 07 октября 2017. С. 138–148.
8. Тринеева О. В., Гудкова А. А., Рудая М. А. Применение люминесцентной микроскопии в анализе анатомо-диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):40–45. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-40-45.
9. Ковалёва Н. А., Тринеева О. В., Гудкова А. А., Сливкин А. И. Изучение морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методами люминесцентной и стереомикроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):123–131. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131.
10. Колосова О. А., Тринеева О. В., Сорокина А. А., Гудкова А. А. Изучение морфологических и анатомо – диагностических признаков сырья валерианы волжской методом люминесцентной микроскопии. *Фармация*. 2021;70(8):26–30. DOI: 10.29296/25419218-2021-08-04.

11. Цибина А. С., Куркин В. А. Актуальные аспекты фармакогностического исследования травы монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.). *Аспирантский вестник Поволжья*. 2021;21(5–6):132–140. DOI: 10.55531/2072-2354.2021.21.3.132-140.
12. Кенбаева А. О., Рыжов М. В., Тарасенко Л. В. Люминесцентный анализ травы сорго белозерного. В сб.: IV Межвузовская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета «Современные проблемы фармакогнозии». Самара. 28 октября 2019. С. 216–223.
13. Васькова А. И., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Люминесцентный анализ листьев тысячелистника хрящеватого (*Achillea cartilaginea* Ledeb.). В сб.: II Межвузовская научно-практическая конференция «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы». Самара. 07 октября 2017. С. 119-127 с.
14. Yasmin G., Khan M. A., Shaheen N., Hayat M. Q. Taxonomic significance of leaf epidermal anatomy of selected *Persicaria* Mill. species of family Polygonaceae from Pakistan. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9:3759–3768.
15. Коломиец Н. Э., Калинкина Г. И., Дмитрук С. Е., Зиновьева А. М. Проблема фальсификации сырья хвоща полевого. *Фармация*. 2006;2:37–42.
16. Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. испр. и доп. М.: КМК; 2014. 635 с.
17. Kantachot C., Chantaranothai P., Simpson D. A. A synopsis of the genus Persicaria (Polygonaceae) in Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)*. 2010;38:128–149.
18. Куркина А. В. Новые подходы к стандартизации сырья перца водяного (*Polygonum hydropiper* L.). *Фундаментальные исследования*. 2013;10:606–609.
19. Куркина А. В. Стандартизация сырья горца почечуйного (*Polygonum persicaria* L.) *Фундаментальные исследования*. 2013;10:1485–1489.
20. Редкокашин Д. Е. Фитохимическое исследование сырья фармакопейных растений рода Polygonum. В сб.: Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Пятигорск. 2010. С. 102–104.
21. Перова И. Б., Эллер К. И., Мальцева А. А., Чистякова А. С., Сливкин А. И., Сорокина А. А. Флавоноиды травы горца почечуйного. *Фармация*. 2017;66(2):15–19.
22. Юнусходжаева Н. А., Абдуллабекова В. Н. Фенольные соединения травы горца перечного. *Наука и технологии в современном обществе*. 2015;1:123–125.
23. Bunawan H., Talip N. Foliar anatomy and micromorphology of Polygonum minus Huds. and their taxonomic implications. *Noor Australian journal of crop Science*. 2011;5(2):123–127.
24. Sahney M., Shukla V. Stem anatomy of Persicaria Mill. *Indian Journal of Plant Sciences*. 2013;2(4):155–161.
25. Thi K. M., Huynh N. V. A., Pham V. N., Dang T. N. T. Morphological, anatomical and antibacterial characteristics of Persicaria maculosa Gray. plants growing in Lang Sen Wetland Reserve, Long An province, Vietnam. *Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2021;17(03):107–118.
26. Asanai M. F. H., Norhisham C., Siti N. M., Emida R., Azlin S. A review on medicinal benefits of Persicaria minor. *Health Scope*. 2020;3(2):44–50.
27. Decraene L. P. R., S.-P. Hong, Smets E. Systematic significance of fruit morphology and anatomy in tribes Persicarieae and Polygoneae (Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2000;134(1–2):301–337.
28. Yasmin G., Khan M. A., Shaheen N., Hayat M. Q., Zafar M., Ahmad M. Pollen morphological diversity in selected species of *Persicaria* Mill. (Family Polygonaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(10):862–870. DOI: 10.5897/JMPR09.448.
29. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Сорокина А. А., Щепилова О. Н., Коренская И. М., Сливкин А. И. Анатомо-диагностические маркеры в определении подлинности представителей рядов *Persicariaeformes* Kom. и *Lapathiiformes* Worosch. семейства *Polygonaceae* lindl. *Фармация*. 2019;68(8):15–21. DOI: 10.29296/25419218-2019-08-03.
30. Блинова О. Л., Белогонова В. Д. Сравнительный морфолого-анатомический анализ травы горца перечного и горца малого. *Медицинский Альманах*. 2016;2:150–153.
31. Высочина Г. И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишные (*Polygonaceae* juss.). Сообщ. III. Род горец – *Persicaria* Mill. *Turczaninowia*. 2008;11:129–137.

REFERENCES

1. Zimenkina N. I., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. Luminescent analysis of walnut bark (*Juglans regia* L.). In: International scientific conference "From plant to drug". Moscow. June 04–05, 2020. Available at: http://www.fbm.msu.ru/science/conference/detail/?ELEMENT_ID=19663. Accessed: 25.11.2022. (In Russ.)
2. Nikitina A. S., Logvinenko L. A., Nikitina N. V., Nigarjan S. A. Morphometric and histochemical study of the herb Melissa officinalis from the collection of the Nikitsky Botanical Garden. *Pharmacy & Pharmacology*. 2018;6(6):504–534. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-6-504-534.
3. Gusakova E. M., Sazanova K. N., Sharipova S. H., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. Luminescence microscopy of flowers of meadowsweet six-petalled (*Filipendula hexapitala* Gilib.) In: II Interuniversity Scientific and Practical Conference "Pharmaceutical Botany: Modernity and Prospects". Samara. October 07, 2017. P. 128–137. (In Russ.)
4. Baldacci-Cresp F., Spriet C., Twyffels L., Blervacq A.-S., Neutelings G., Baucher M., Hawkins S. A rapid and quantitative safranin-based fluorescent microscopy method to evaluate cell wall lignification. *Plant Journal*. 2020;102(5):1074–1089.
5. Kitin P., Nakaba S., Hunt C. G., Lim S., Funada R. Direct fluorescence imaging of lignocellulosic and suberized cell walls in roots and stems. *AoB PLANTS*. 2020;12(4):1–19.
6. Pegg T. J., Gladish D. K., Baker R. L. Algae to angiosperms: Autofluorescence for rapid visualization of plant anatomy among diverse taxa. *Applications in Plant Sciences*. 2021;9(6):e11437.
7. Sokolov N. S., Belov P. V., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. Morphological and anatomical study of horse chestnut (Aesculus hippocastanum) seeds by luminescent microscopy. In: II Interuniversity Scientific and Practical Conference "Pharmaceutical Botany: Modernity and Prospects". Samara. October 07, 2017. P. 138–148. (In Russ.)
8. Trineeva O. V., Gudkova A. A., Rudaya M. A. Application of Luminescent Microscopy in Analysis of Anatomic-diagnostic Signs of Fruits of Sea Buckthorn. *Drug development & registration*. 2020;9(1):40–45. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-40-45.
9. Kovaleva N. A., Trineeva O. V., Gudkova A. A., Slivkin A. I. Study of Morphological Features of Sea Buckthorn Leaves by Luminescent and Stereomicroscopy Methods. *Drug development & registration*. 2022;11(1):123–131. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-123-131
10. Kolosova O. A., Trineeva O. V., Sorokina A. A., Gudkova A. A. The study of morphological and anatomical – diagnostic features of the raw materials of the *Valeriana wolgensis* by the method of luminescent microscopy. *Pharmacy*. 2021;70(8):26–30. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-08-04.
11. Cibina A. S., Kurkin V. A. Actual aspects of pharmacognostic research of the herb monarda fistulata (*Monarda fistulosa* L.). *Aspirantskiy vestnik Povolzhiya*. 2021;21(5–6):132–140. (In Russ.) DOI: 10.55531/2072-2354.2021.21.3.132-140.
12. Kenbaeva A. O., Ryzhov M. V., Tarasenko L. V. Luminescent analysis of white grain sorghum grass. In: IV Interuniversity scientific and practical conference with international participants stium, dedicated to the 100th anniversary of the Samara State Medical University "Modern problems of pharmaceutical Macognosia". Samara. October 28, 2019. P. 216–223. (In Russ.)

13. Vaskova A.I., Ryzhov V.M., Tarasenko L.V. Luminescent analysis of leaves of cartilaginous yarrow (*Achillea cartilaginea* Ledeb.). In: II Interuniversity Scientific and Practical conference "Pharmaceutical botany: modernity and prospects". Samara. October 07, 2017. P. 119–127. (In Russ.)
14. Yasmin G., Khan M. A., Shaheen N., Hayat M. Q. Taxonomic significance of leaf epidermal anatomy of selected *Persicaria* Mill. species of family Polygonaceae from Pakistan. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9:3759–3768.
15. Kolomiec N. E., Kalinkina G. I., Dmitruk S. E., Zinov'eva A. M. The problem of falsification of Equisetum arvense raw materials. *Pharmacy*. 2006;2:37–42. (In Russ.)
16. Mayevsky P. F. Flora of the middle zone of the European part of Russia. 11th ed. corrected and additional. Moscow: KMK; 2014. 635 p. (In Russ.)
17. Kantachot C., Chantaranothai P., Simpson D. A. A synopsis of the genus Persicaria (Polygonaceae) in Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)*. 2010;38:128–149.
18. Kurkina A. V. New approaches to standardization of water pepper raw materials (*Polygonum hydropiper* L.). *Fundamental research*. 2013;10:606–609. (In Russ.)
19. Kurkina A. V. Standardization of raw materials (*Polygonum persicaria* L.) *Fundamental research*. 2013;10:1485–1489. (In Russ.)
20. Redkokashin D. E. Phytochemical study of raw materials of pharmacopoeial plants of the genus Polygonum. In: Development, research and marketing of new pharmaceutical products. Pyatigorsk. 2010. P. 102–104. (In Russ.)
21. Perova I. B., Jeller K. I., Mal'ceva A. A., Chistjakova A. S., Slivkin A. I., Sorokina A. A. Flavonoids of herb Knotweed. *Pharmacy*. 2017;66(2):15–19. (In Russ.)
22. Junushodzhaeva N. A., Abdullabekova V. N. Phenolic compounds of herb Knotweed pepper. *Nauka i tehnologii v sovremennom obshhestve*. 2015;1:123–125. (In Russ.)
23. Bunawan H., Talip N. Foliar anatomy and micromorphology of Polygonum minus Huds. and their taxonomic implications. *Noor Australian journal of crop Science*. 2011;5(2):123–127.
24. Sahney M., Shukla V. Stem anatomy of Persicaria Mill. *Indian Journal of Plant Sciences*. 2013;2(4):155–161.
25. Thi K. M., Huynh N. V. A., Pham V. N., Dang T. N. T. Morphological, anatomical and antibacterial characteristics of Persicaria maculosa Gray. plants growing in Lang Sen Wetland Reserve, Long An province, Vietnam. *Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2021;17(03):107–118.
26. Asanai M. F. H., Norhisham C., Siti N. M., Emida R., Azlin S. A review on medicinal benefits of Persicaria minor. *Health Scope*. 2020;3(2):44–50.
27. Decraene L. P. R., S.-P. Hong, Smets E. Systematic significance of fruit morphology and anatomy in tribes Persicarieae and Polygoneae (Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2000;134(1–2):301–337.
28. Yasmin G., Khan M. A., Shaheen N., Hayat M. Q., Zafar M., Ahmad M. Pollen morphological diversity in selected species of *Persicaria* Mill. (Family Polygonaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(10):862–870. DOI: 10.5897/JMPR09.448.
29. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sorokina A. A., Shchepilova O. N., Korenskaya I. M., Slivkin A. I. Anatomical and diagnostic markers in determining the authenticity of representatives of the *Persicariaeformes* Com. and *Lapathhiiformes* Vorosh. family *Polygonaseae* lindl. *Pharmacy*. 2019;68(8):15–21. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2019-08-03.
30. Blinova O. L., Belogonova V. D. Comparative morphological and anatomical analysis of the herb Knotweed and Knotweed. *Medicinskij Al'manah*. 2016;2:150–153. (In Russ.)
31. Vysochina G. I. Phenolic compounds in the systematics and phylogeny of the buckwheat family (*Polygonaceae* Juss.). Soobshh. III. Rod gorec – *Persicaria* Mill. *Turczaninowia*. 2008;11:129–137. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1719
UDC 615.072

Check for updates

CC BY 4.0

Research article / Оригинальная статья

Comparative Study of Free Amino Acid Profiles in Underground Organs of Several Species of the Genus Rumex During Different Phases of the Vegetation Cycle

Andrey M. Poluyanov[1, 3]✉, Uliana A. Matvienko[2], Anna Yu. Sokolova[1, 3], Anna E. Savelyeva[1], Natalya A. Durnova[1, 2], Natalya V. Bobkova[1, 4]

[1] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[2] Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky (Razumovsky University). 112, B. Kazachya str., Saratov, Saratov region, 410012, Russia
[3] LLC "Scientific Compliance" (LLC "SC"). 19, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
[4] Lomonosov Moscow State University. Faculty of Fundamental Medicine. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia

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

ORCID: Andrey M. Poluyanov – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; Uliana A. Matvienko – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165; Anna Yu. Sokolova – https://orcid.org/0000-0002-7500-5880; Anna E. Savelyeva – https://orcid.org/0009-0004-9691-9560; Natalya A. Durnova – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519; Natalya V. Bobkova – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019.

Received: 22.12.2023 **Revised:** 26.01.2024 **Published:** 26.01.2024

Abstract

Introduction. Amino acids (AA), the primary metabolites in plants, play a crucial role in various physiological processes, including the synthesis of phenolic compounds. Drug products and dietary supplements made from medicinal plants can become a rich source of both nonessential and essential amino acids. High levels of free amino acids found in herbal raw material often indicate the presence of biotic and abiotic stress in the plants. Therefore, understanding the dynamics of bioactive compound accumulation in plants throughout their phenological phases of development is critical to optimizing their potential health benefits.

Aim. To compare qualitative composition and dynamics of AA accumulation in the underground organs of four representatives of the *Rumex* genus: *R. confertus*, *R. crispus* L., *R. obtusifolius* L., *R. aquaticus* L. of three different vegetative phases.

Materials and methods. Water extracts from underground organs of the studied plants were analyzed using two different methods for qualitative and quantitative analysis. Extracts were applied to the chromatographic plates TLS Silica gel 60 F254 (Merk, Germany) 20 × 20 cm with a micro-syringe (LLC "Tsvet", Russia). After elution, the plates were treated with a 2 % ninhydrin solution. Quantitative analysis was carried out using the SF-2000 spectrophotometer (LLC "OKB Spectr", Russia).

Results and discussion. The amino acid profile of the underground organs of *R. confertus*, *R. crispus* L., *R. obtusifolius* L., *R. aquaticus* L. during three vegetative phases was determined using the TLC method; the quantitative analysis performed using spectrophotometry.

Conclusion. The most diverse amino acid (AA) profiles were found in the withering phase in all *Rumex* species, with up to 9 amino adsorption zones. In contrast, the least diverse AA profiles were observed in the flowering phase, ranging from 2 to 4 adsorption zones. The quantitative content of AA was lowest in the flowering phase, increased during the regrowth phase, and peaked in the withering phase. However, *R. crispus* L. showed an unusual pattern, with the highest quantitative content of AA detected in the regrowth phase.

Keywords: TLC, UV spectrophotometry, phytochemistry, amino acids, Rumex

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

Contribution of the authors. Andrey M. Poluyanov and N. V. Bobkova invented and designed the experiment. Andrey M. Poluyanov, Anna Yu. Sokolova, Uliana A. Matvienko and Anna E. Savelyeva analyzed the objects using the TLC and spectrophotometry methods. Andrey M. Poluyanov, Uliana A. Matvienko, Anna Yu. Sokolova, Natalya A. Durnova and Natalya V. Bobkova participated in data processing. Andrey M. Poluyanov, Uliana A. Matvienko, Anna Yu. Sokolova and Anna E. Savelyeva participated in writing the text of the article. All authors participated in discussion of the results.

For citation: Poluyanov A. M., Matvienko U. A., Sokolova A. Yu., Savelyeva A. E., Durnova N. A., Bobkova N. V. Comparative study of free amino acid profiles in underground organs of several species of the genus rumex during different phases of the vegetation cycle. *Drug development & registration*. 2024;13(1):120–127. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1719

Сравнительное изучение профиля свободных аминокислот в подземных органах нескольких видов рода Rumex на разных фазах вегетационного цикла

А. М. Полуянов[1, 3]✉, У. А. Матвиенко[2], А. Ю. Соколова[1, 3], А. Е. Савельева[1], Н. А. Дурнова[1, 2], Н. В. Бобкова[1, 4]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 410012, Россия, Саратовская область, Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112
[3] Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс» (ООО «СК»). 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 19
[4] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). Факультет фундаментальной медицины. 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1

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

© Poluyanov A. M., Matvienko U. A., Sokolova A. Yu., Savelyeva A. E., Durnova N. A., Bobkova N. V., 2024
© Полуянов А. М., Матвиенко У. А., Соколова А. Ю., Савельева А. Е., Дурнова Н. А., Бобкова Н. В., 2024

ORCID: А. М. Полуянов – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; У. А. Матвиенко – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165;
А. Ю. Соколова – https://orcid.org/0000-0002-7500-5880; А. Е. Савельева – https://orcid.org/0009-0004-9691-9560;
Н. А. Дурнова – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519; Н.В. Бобкова – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019.

Статья поступила: 22.12.2023 **Статья принята в печать:** 26.01.2024 **Статья опубликована:** 26.01.2024

Резюме

Введение. Аминокислоты (АК) являются первичными метаболитами в растениях. Одна из функций – синтез фенольных соединений. Препараты и биологически активные добавки на основе лекарственных растений могут быть доступным источником заменимых и незаменимых АК. Большое содержание АК в свободном виде в растительном сырье чаще всего указывает на наличие биотического и абиотического стресса. Помимо этого – важной задачей является определение динамики накопления биологически активных веществ в зависимости от фенологической фазы развития растения.

Цель. Сравнительное изучение качественного состава и динамики накопления АК в подземных органах четырех представителей рода Rumex: *R. confertus*, *R. crispus* L., *R. obtusifolius* L., *R. aquaticus* L. трех различных фаз вегетации.

Материалы и методы. В качестве анализируемых растворов использовались водные извлечения из подземных органов изучаемых видов рода Rumex, получаемые для качественного и количественного исследования по двум различным методикам. На хроматографические пластинки марки TLS Silica gel 60 F254 (Merk, Германия) 20 × 20 см наносили извлечения микрошприцем (ООО «Цвет», Россия). После элюирования пластинки обрабатывали 2%-м раствором нингидрина. Количественное определение проводилось на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия).

Результаты и обсуждение. Было проведено определение АК методом ТСХ и оценено количественное содержание методом спектрофотомерии в подземных органах четырех представителей рода Rumex: *R. confertus*, *R. crispus* L., *R. obtusifolius* L., *R. aquaticus* L. трех различных фаз вегетации.

Заключение. Наиболее разнообразные профили АК были обнаружены в фазу отмирания надземной части у всех видов Rumex (до 9 зон адсорбции), наименее разнообразные в фазу цветения (от 2 до 4 зон адсорбции). Количественное содержание АК наименьшим было в фазе цветения, возрастало в фазу отрастания и достигало пика в фазу отмирания, исключением является *R. crispus* L., у которого наибольшее количественное содержание АК было отмечено в фазу отрастания.

Ключевые слова: TLC, UV, фитохимия, аминокислоты, щавель

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

Вклад авторов. А. М. Полуянов и Н. В. Бобкова придумали и разработали эксперимент. А. М. Полуянов, А. Ю. Соколова, У. А. Матвиенко и А. Е. Савельева провели исследования методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. А. М. Полуянов, А. Ю. Соколова, У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова и Н. В. Бобкова участвовали в обработке данных. А. М. Полуянов, У. А. Матвиенко, А. Ю. Соколова и А. Е. Савельева участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Полуянов А. М., Матвиенко У. А., Соколова А. Ю., Савельева А. Е., Дурнова Н. А., Бобкова Н. В. Сравнительное изучение профиля свободных аминокислот в подземных органах нескольких видов рода Rumex на разных фазах вегетационного цикла. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):120–127. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1719

INTRODUCTION

Amino acids (hereinafter referred to as AA) are the primary metabolites in plants. They play a vital role in protein synthesis, ion transport, enzyme activation, environmental resistance [1, 2], and phenolic compound synthesis [3].

Drug products and dietary supplements made from medicinal plants, such as those belonging to the Fabaceae, Urticaceae, or other families, can serve as a rich source of both nonessential and essential amino acids [4, 5]. Moreover, research has shown that AA can participate in nervous regulation, exhibit neuroprotective effects [6, 7], and are indispensable to the proper functioning of the cardiovascular system [8]. Of particular note is the importance of essential AA.

While both nonessential and essential amino acids can be synthesized in herbal raw materials, all AA can exist in either a free or bound form within peptides and other compounds. Notably, high concentrations of free-form AA in herbal raw materials often suggest the presence of biotic and abiotic stress [9–11].

Numerous studies report on the content of amino acids in representatives of such families as Nettle (Urticaceae) [12, 13], Oleaster (Elaeagnaceae) [14], Leguminosae (Fabaceae) [15, 16], and others [17, 18]. It has been proven that amino acids are capable of accumulating both in aboveground plant organs and in underground ones. [19–21] The data on the content of amino acids in plant organs is presented in Table 1.

AA can accumulate in different morphological organs of plants in free and bound forms. It is vital to determine the patterns of biologically active substances accumulation throughout phenological phases of plant development.

Table 1. **The content of amino acids in different morphological groups**

Morphological group	Total content of free amino acids, %	Content of essential amino acids, %	Publications
Leaves	11.65–20.21	0.7–7.2	[12, 18]
Herbs	11.26–15.88	4.0–4.17	[15, 16]
Roots	8.39–8.89	2.05–2.46	[16, 22]
Fructus	5.98–13.44	1.74–2.75	[12, 23]
Flowers	5.86–7.34	2.38–3.47	[24, 25]

MATERIALS AND METHODS

Objects of study

The underground organs of *Rumex confertus* Willd, *Rumex aquaticus* L., *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. were harvested for this study during the 2021–2022. All the samples were harvested from the same population (from Rogovskoye settlement, Moscow, Russia, coordinates: 55°14′44.3″N 37°00′34.5″E). The underground organs of the studied species belong to the group of "roots" according to the morphological classification (in *R. confertus* and *R. crispus* L.) or "rhizomes and roots" (in *R. obtusifolius* L. and *R. aquaticus* L.). All of the samples were dried until the moisture content was less than 14 %.

Reagents and solutions

The following aqueous solutions were used as standard samples for the TLC: 0.1 % alanine ≥99 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), arginine ≥99.5 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), asparagine ≥99 % (TLC) (Sigma Aldrich, Germany), aspartic acid ≥99 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), glutamic acid ≥99 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), glutamine ≥99 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), glycine ≥99 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), histidine ≥99 % (TLC) (Sigma Aldrich, Germany), isoleucine ≥98 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), leucine ≥98 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), lysine ≥98 % (TLC) (Sigma Aldrich, Germany), methionine ≥99.5 % (NT) (Sigma Aldrich, Germany), phenylalanine ≥99.0 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), proline ≥99 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), serine ≥99 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), threonine ≥98% (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), tryptophan ≥98% (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany) and valine ≥98% (HPLC) (Sigma Aldrich, Germany), Acetone (c.p., Merck KGaA, Germany), acetic acid (c.p., Vecton, Russia), *n*-butanol (analytically pure, Vecton, Russia), ninhydrin (≥98 % of LLC "Diaem", Russia), ascorbic acid (≥99 % Sigma Aldrich, USA).

Equipment

The moisture content of the crushed Rumex underground organs was determined using the OHAUS MB27 moisture analyzer (OHAUS, USA). The extract from the plant material was applied on the chromatographic plates TLS Silica gel 60 F254 (Merk, Germany) 20 × 20 cm using a microsyringe (LLC "Tsvet", Russia).

SF-2000 spectrophotometer (LLC "OKB Spectr", Russia); Stegler WB-4 water bath (Stegler, China), mechanical pipettes of 100-1000 µl, and of 1000–5000 µl (Sartorius, Germany), analytical balance R200D (Sartorius, Germany).

Sample preparation

To study the amino acid profile of the roots using thin-layer chromatography (TLC), aqueous extracts were prepared at a ratio of 1:5 (herbal raw material:extractant) from the roots of 12 analyzed samples. The extracts were prepared by crushing 1.0 g of herbal raw material into particles that passed through a 2 mm sieve, followed by mixing with 5 ml of distilled water and heating in a water bath with a reflux condenser for 30 minutes [19]. After extraction, the extract was filtered.

For spectrophotometric analysis, aqueous extracts were prepared according to the following method: 1.0 g of herbal raw material was placed in a 250 ml flask and 25 ml of distilled water was added. The mixture was then heated for 30 minutes in a boiling water bath with a reflux condenser. The hot extract was filtered through a small folded paper filter into a 100 ml flask; the filter contaminated with particles was placed in a flask as well for extraction. The extraction was repeated again under the conditions described above, into the same flask. After cooling, the extract was replenished to the volume of 100 ml.

To analyze the extracts, 2 ml of each extract or distilled water (for a blank solution) were combined with 4 ml of phosphate buffer solution (pH 6.4) and 2 ml of 1 % ninhydrin solution, with 2 ml of 0.05 % ascorbic acid solution in a separate 100 ml flask. The entire reaction mixture was heated for another 30 minutes. After rapid cooling, the mixture was replenished to its original volume and analyzed spectrophotometrically (Figure 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Qualitative determination: method development

To determine the optimal sample size for the experiment, a series of tests was conducted using a microsyringe to apply analyzed extracts of varying volumes (ranging from 1 to 10 µL) to chromatographic plates. Our findings indicated that the visibility of spots was compromised at sample volumes below 4 µL, while separation efficiency was adversely affected at volumes exceeding 7 µL. Therefore, the optimum sample volume for the experiments is 5 µL.

Standard samples of AA were applied to chromatographic plates in a volume of 1 µL, and elution was performed twice in a pre-saturated chromatographic cham-

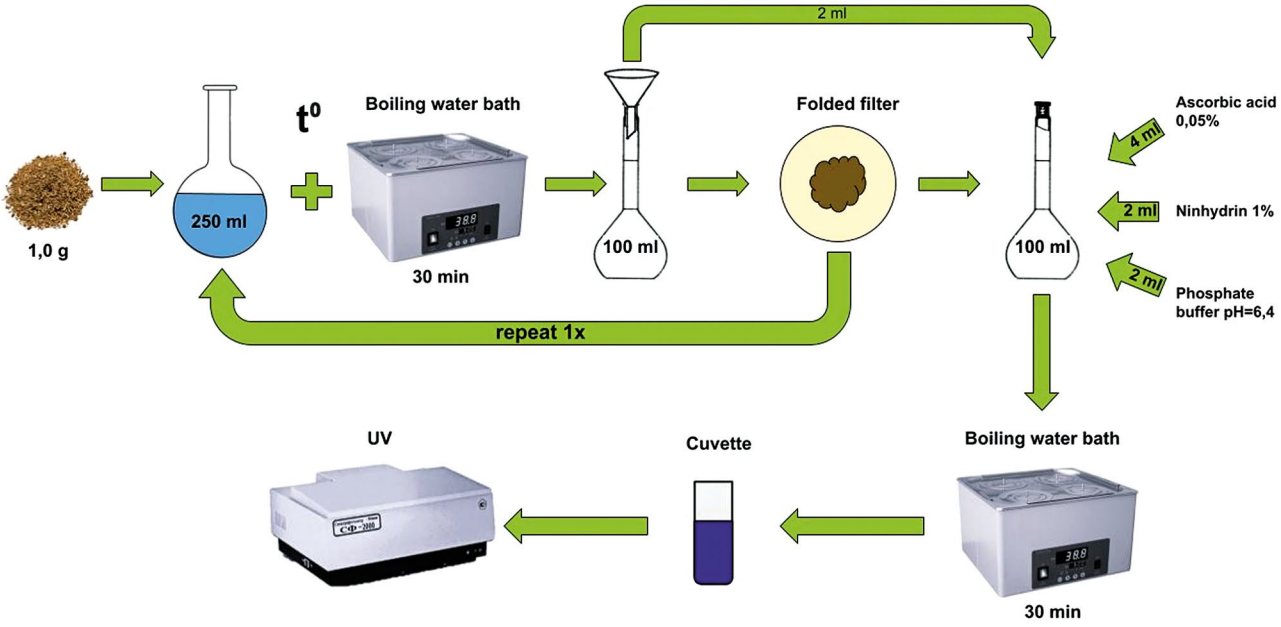


Figure 1. Sample preparation for quantitative analysis of AA

ber utilizing a solvent system composed of *n*-butanol, acetone, glacial acetic acid, and water (35:35:10:20) with a solvent front of 18 cm. Spots were visualized by spraying a 2 % solution of ninhydrin (acetone: *n*-butanol 1:1) onto the plate and drying it in a drying cabinet at a temperature of 105 °C for a period of 15 minutes. The AA in the studied extracts were identified by comparing the Rf values and spot colors to those of standard samples (Figure 2).

The results of the study of AA profiles in the extracts from *R. confertus, R. crispus* L., *R. obtusifolius* L., *R. aquaticus* L. via TLC are shown in Figure 3.

The chemical composition of different *Rumex* species in the flowering phase has been found to be non-identical. Data collected revealed the presence of 2–4 chromatographic zones, which can be classified as non-essential (alanine, serine) and essential (isoleucine, methionine) amino acids. Notably, the richest AA profile was observed in *R. obtusifolius* L., while the least diverse was found in *R. aquaticus* L. Furthermore, isoleucine was detected in the samples of *R. confertus*, *R. obtusifolius* L., and *R. aquaticus* L., while methionine was found in the samples of *R. confertus, R. crispus* L., and *R. obtusifolius* L. These findings imply that the examined types of herbal raw material possess considerable potential for utilization in different pharmaceutical domains.

The TLC profiles of *R. confertus, R. crispus L., R. obtusifolius L., and R. aquaticus* L. during the withering phase show an increase in the number of chromatographic zones, ranging from 5 to 8. The extract of *R. confertus* exhibits an unidentified adsorption zone with an Rf value of 0.91 ± 0.02, while the adsorption zone corresponding to aspartic acid is present in *R. obtusifolius* L. All the studied extracts display an unidentifiable zone with an Rf value of 0.730 ± 0.02.

In the regrowth phase, *R. confertus* displays five chromatographic zones, including an unidentified zone with an Rf value of 0.91 ± 0.02; however, the zone corresponding to alanine disappears.

In *R. crispus* L. two additional adsorption zones corresponding to aspartic acid and phenylalanine appear, meanwhile in *R. obtusifolius* L. the zone with an Rf value of 0.73 ± 0.02 disappears. Notably, *R. aquaticus* L. has the most diverse profile among the four species, featuring 8 chromatographic zones; compared with the withering phase, an adsorption zone corresponding to aspartic acid appears. Interestingly, only *R. obtusifolius* L. retains an unidentified adsorption zone with an Rf value of 0.73 ± 0.02 throughout the regrowth phase.

Isoleucine, methionine, alanine, serine and lysine were found in all of the analyzed samples; four of these AA are essential. The TLC profiles of the aqueous extracts of the roots of *R. crispus* L. and *R. aquaticus* L. during the withering phase are identical, whereas *R. confertus* has an additional adsorption zone during flowering, and *R. obtusifolius* L. has an additional zone attributed to aspartic acid.

The total content of AA was assessed using spectrophotometry after the ninhydrin reaction at a wavelength of 568 nanometers in a 10 mm cuvette (Figure 4).

The total content of free AA (%), expressed as the equivalent of glutamic acid, and the moisture-free herbal raw material (X), was calculated using the following formula:

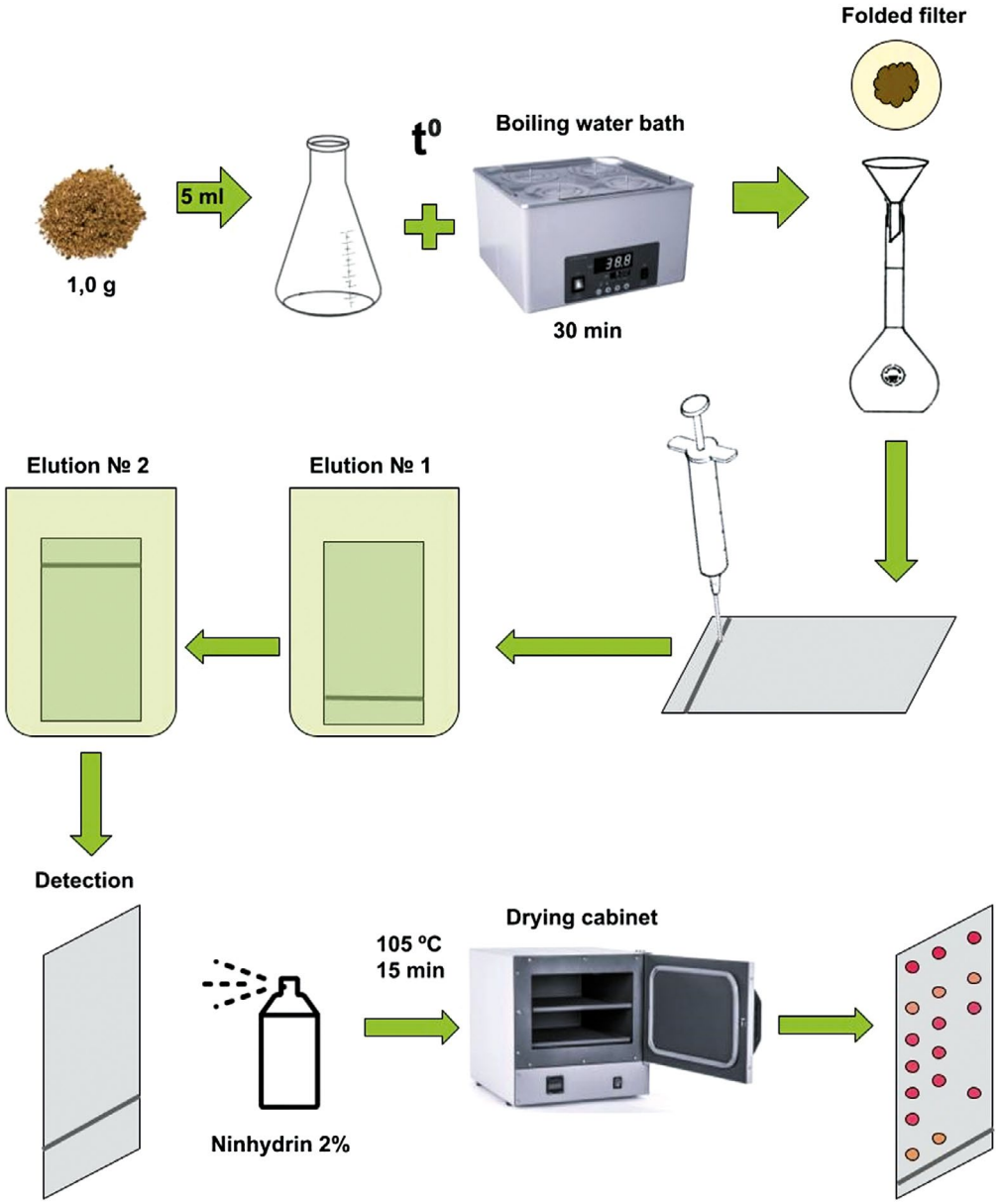


Figure 2. Scheme of TLC- method for the detection of AA

$$\frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 200 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

where A – optical density of the test solution; A_0 – optical density of the standard solution of glutamic acid; a – sample weight (raw materials), g; a_0 – standard sample weight (glutamic acid), g; W– weight loss during drying of raw materials, %.

The results of the spectrophotometric analysis are presented in Table 2 and graphically represented in Figure 5 below.

In *R. confertus*, *R. aquaticus* L., and *R. obtusifolius* L., the maximum total content of AA is observed during the withering phase. Conversely, *R. crispus* L. exhibits the highest total AA content during the regrowth phase, while R. *obtusifolius* has the highest total AA content across both the flowering and withering phases. Notably, R. *confertus* has the lowest total content of AA throughout all phases of vegetation. It is interesting to note that all four species share a common trend of having the minimum amount of AA during the flowering phase.

Previous studies [22, 23] have shown that members of the Rumex genus display the highest total content of phenolic compounds (anthracene derivatives and flavonoids) during the flowering phase. Given that AA act as material for synthesis of secondary metabolites, it can be assumed that the lowest content of AA during the flowering phase and accumulation of bioactive compounds display a negative correlation.

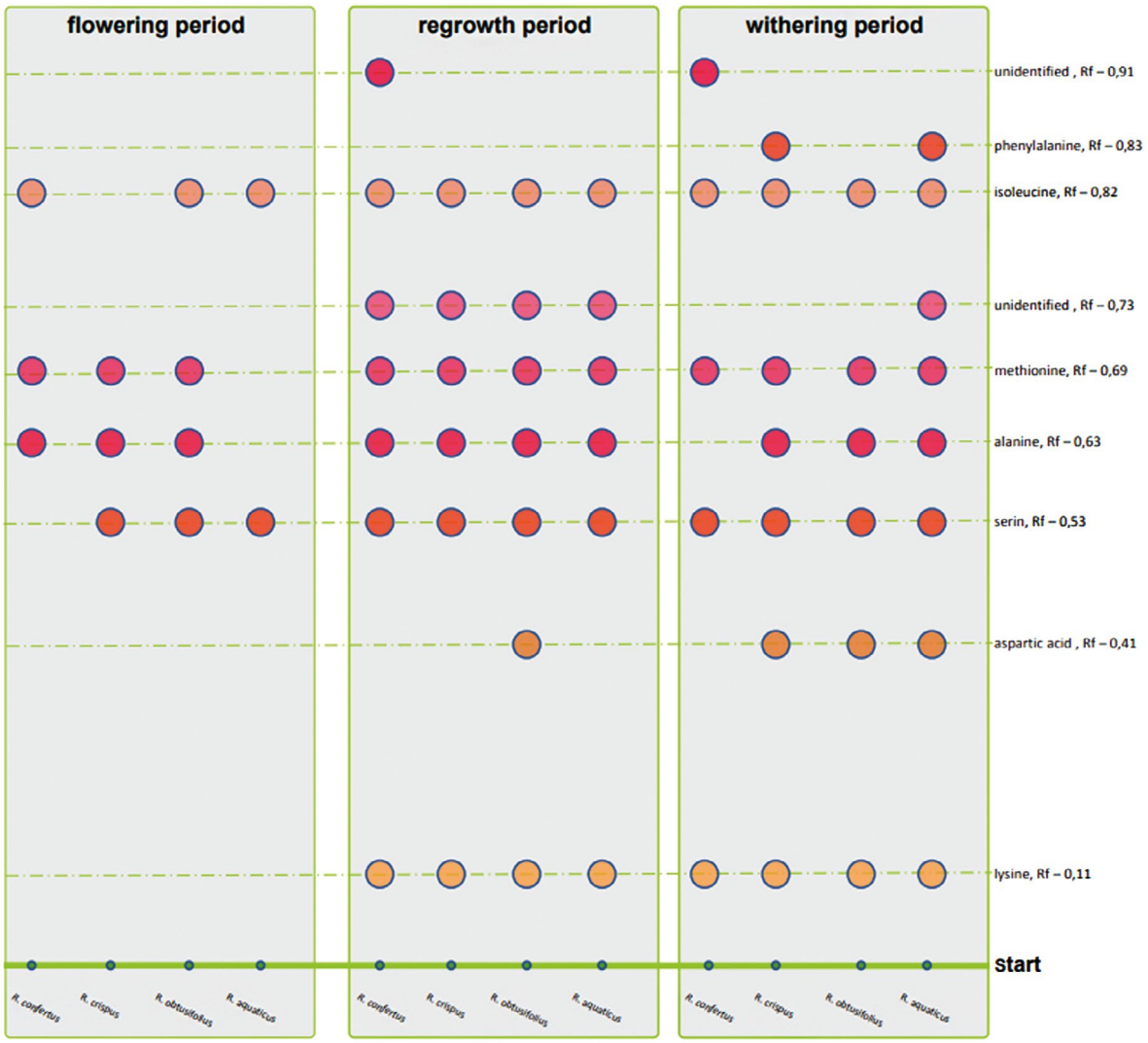


Figure 3. **TLC- profiles of AA for *R. confertus*, *R. crispus* L., *R. obtusifolius* L., *R. aquaticus* L. in the flowering period, regrowth period and withering period**

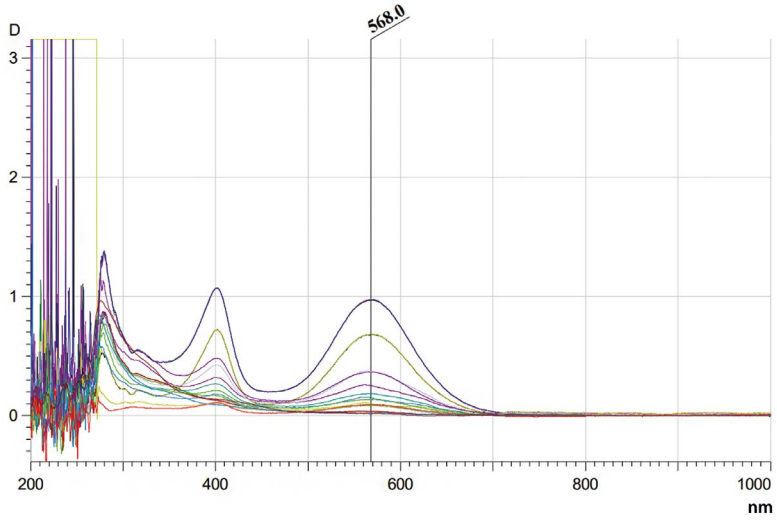


Figure 4. **Spectra of the analyzed objects after reaction with ninhydrin**

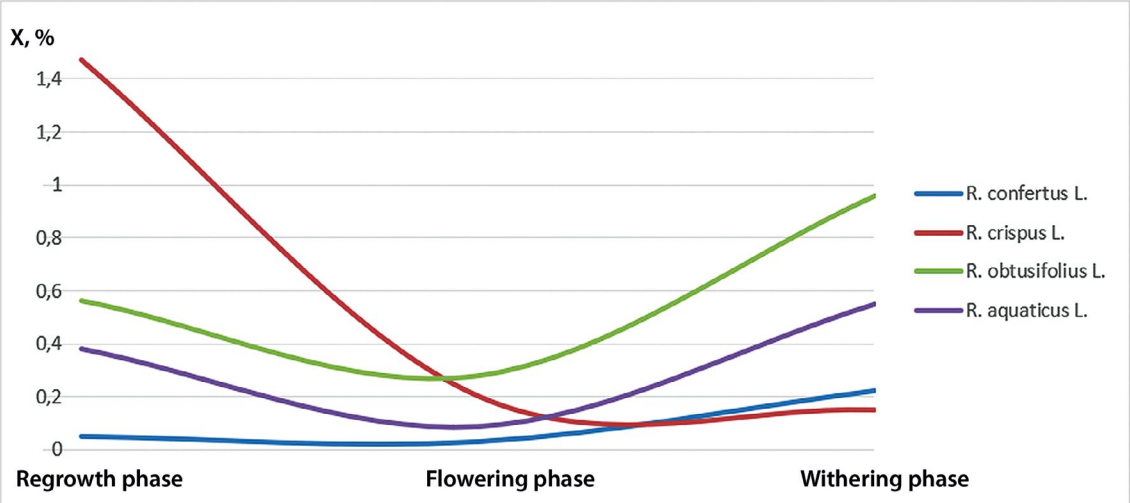


Figure 5. **Comparison of *R. confertus*, *R. crispus* L., *R. aquaticus* L. and *R. obtusifolius* L.**

Table 2. **Results of spectrophotometric analysis for *R. confertus*, *R. crispus* L., *R. aquaticus* L. and *R. obtusifolius* L in %**

Object	Average optical density	X, %
Regrowth phase object		
R. confertus	0.033	0.050 ± 0.004
R. crispus L.	0.969	1.469 ± 0.306
R. aquaticus L.	0.251	0.381 ± 0.046
R. obtusifolius L.	0.371	0.562 ± 0.051
Flowering phase object		
R. confertus	0.020	0.030 ± 0.001
R. crispus L.	0.134	0.203 ± 0.036
R. aquaticus L.	0.057	0.087 ± 0.420
R. obtusifolius L.	0.183	0.278 ± 0.016
Withering phase object		
R. confertus	0.147	0.222 ± 0.015
R. crispus L.	0.099	0.150 ± 0.003
R. aquaticus L.	0.363	0.550 ± 0.040
R. obtusifolius L.	0.632	0.957 ± 0.644

CONCLUSION

During the flowering phase, *R. obtusifolius* L. has the most diverse AA profile, and *R. aquaticus* L. the least. The highest total content of AA is in *R. obtusifolius* L., the lowest in *R. confertus*.

REFERENCES

1. Mavrina P. O., Adamov G. V., Malankina E. L. Effect of alanine on accumulation of phenolic compounds in the leaves of chicory (Cichorium intybus L.). *Vegetable crops of Russia*. 2023;(5):62–67. (In Russ.) DOI: 10.18619/2072-9146-2023-5-62-67.
2. Popova E. A., Pungin A. V. The effect of amino acids on the content of biologically active substances of the culture of the bearded roots of Hyssopus officinalis L. *ChemBioSis*. 2022. P. 33–33. (In Russ.). DOI: 10.21603/chembioseasons2022-31.
3. Trovato M., Funck D., Forlani G., Okumoto S., Ami R. Editorial: Amino Acids in Plants: Regulation and Functions in Development and Stress Defense. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12. DOI: 10.3389/fpls.2021.772810.
4. Gampe N., Ladocsi L., Fejős I., Boldizsár I., Darcsi A., Béni S. Enantioseparation and quantitative determination of two homologous beta amino acids found in Fabaceae plants. *Journal of Chromatography A*. 2022;1675:463089. DOI: 10.1016/j.chroma.2022.463089.
5. Yunuskhodzhaeva N. A., Abdullabekova V. N., Ibragimova K. S., Mezhlumyan L. G. Amino-acid composition of Urtica dioica leaves and Polygonum hydropiper and P. aviculare herbs. *Chemistry of Natural Compounds*. 2014;50:970–971. DOI: 10.1007/s10600-014-1137-z.
6. Serebryanskaya T. S., Nikolayeva G. G. The analysis of free amino acids of water extraction of herbal composition with neuroprotective action. *Acta Biomedica Scientifica*. 2010;2:213–215. (In Russ.)
7. Scriabina E. N., Galishevskaya E. E., Belonogova V. D., Amino acids of plants of the genus Melampyrum L. *Medical almanac*. 2012;5:206–208. (In Russ.)
8. Khasanova S. R., Kudashkina N. V., Trofimova S. V., Faizullina R. R., Bulgakov T. V., Gritsaenko D. I., Shakirova F. A. Study of amino acid composition of some wildplants flora of Bashkortostan. *Bashkir Chemical Journal*. 2013;20(1):108–110. (In Russ.)
9. Batista-Silva W., Heinemann B., Rugen N., Nunes-Nesi A., Araújo W. L., Braun H. P., Hildebrandt T. M., The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. *Plant, cell & environment*. 2019;42(5):1630–1644. DOI: 10.1111/pce.13518.
10. Baqir H. A., Zeboon N. H., Al-Behadili A. A. J. The role and importance of amino acids within plants: A review. *Plant Archives*. 2019;19(2):1402–1410.
11. Hildebrandt T. M., Nesi A. N., Araújo W. L., Braun H. P., Amino acid catabolism in plants. *Molecular plant*. 2015;8(11):1563–1579. DOI: 10.1016/j.molp.2015.09.005.
12. Trineeva O. V., Sinkevych A. V., Slivkin A. I., Safonova E. F. A study of the amino acid profile of extracts from herbal raw materials using a two-dimensional thin layer chromatography (TLC) method. *Sorption, and chromatographic processes*. 2014;14(3):530–536. (In Russ.)

13. Trineeva O. V., Safonova E. F., Sinkevich A. V., Slivkin A. I. TLC determination of amino acids in raw medicinal-plant materials (nettle leaves and sea buckthorn fruits). *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2015;49(5):37–41. (In Russ.)
14. Trineeva O. V., Rudaya M. A., Slivkin A. I., Dubovitsky M. A. Study of the profile of free amino acids of sea buckthorn fruits of various varieties by thin layer chromatography. *Sorption and chromatography processes*. 2020;20(2):277–283. (In Russ.) DOI: 10.17308/sorpchrom.2020.20/2783.
15. Imachueva D. R., Serebryanaya F. K. The results of the comparative amino acid analysis of species of hedysarum growing in the North Caucasus. *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*. 2020;(1):82–88. (In Russ.) DOI: 10.21626/vestnik/2020-1/10.
16. Nedil'ko O. V., Yanitskaya A. V. The study of amino acid content of glycyrrhiza glabra overground and underground parts. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2020;1:251–256. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2020014678.
17. Bakova E. Yu., Plugatar Yu. V., Bakova N. N., Konovalov D. A. Mineral and amino acid composition of the leaves of Myrthus Communis L. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya.* 2019;3:217–223. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019034917.
18. Tokhsyrova Z. M., Nikitina A. S., Popova O. I. Aminoacids of shoots of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), introduced in the botanical garden of Pyatigorsk medical-pharmaceutical institute. *Pharmaceutical sciences*. 2015;(2–15):3330–3332. (In Russ.)
19. Matvienko U. A., Durnova N. A., Karavaeva L. V., Romanteeva Yu. V. Amino acid profile of herbs of some species of the genus Astragalus L. *Pharmacy*. 2021;70(4):20–25. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-04-03.
20. Qureshi M. N., Stecher G., Bonn G. K. Quality control of herbs: determination of amino acids in Althaea officinalis, Matricaria chamomilla and Taraxacum officinale. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* . 2014;27(3):459–462.
21. Oleshko, G. I., Yarygina, T. I., Zorina, E. V., Reshetnikova. Development of a unified method for the free amino acids quantification in herbal raw materials and extraction drugs. *Pharmacy*. 2011;3:14–17. (In Russ.)
22. Turtueva T. A., Nikolaeva G. G., Gulyaev S. M., Zhalsanov Yu. V. Amino acid composition of Astragalus Membranaceus (fish.) bunge roots. *BSU bulletin. Medicine and pharmacy*. 2013;12:75–77. (In Russ.)
23. Dobrina Yu. V., Maltseva A. A., Sorokina A. A., Slivkin A. I. Amino acid composition of the leaves and fruits of chinese magnolia vine (schizandra chinensis) growing in the Voronezh region. *Pharmacy*. 2016;63(6):16–20. (In Russ.)
24. Zarubina N. V., Popov D. M. Amino acid composition of linden flowers and leaves. *Pharmacy*. 2012;5:21–23. (In Russ.)
25. Reut A. A., Mironova L. N. Investigation of the elemental and amino acid composition of plant raw materials of some representatives of the genus Paeonia L. *Subtropical and decorative gardening*. 2013;48:200-203. (In Russ.)
26. Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Malashenko E. A., Sergunova E. V., Bobkova N. V. Isolation, Identification and Quantitative Determination of Anthracene Derivatives by HPLC-UV Method in the Raw Materials of Some Representatives of the Genus Rumex of Three Vegetation Times. *Drug development & registration*. 2022;11(4):216–225. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-216-225.
27. Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Koynova A., Kulikova S. D., Malashenko E. A., Bobkova N. V. Identification and Quantitative Determination of Flavonoids by HPLC-UV Method in the Raw Materials of Some Representatives of the Genus Rumex of Three Vegetation Time. *Drug development & registration*. 2023;12(3):134–142. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-134-142.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1519
УДК 543.94, 543.6, 577.1, 616-097, 632.938

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Многократное использование биослоя QCM: подходы к регенерации в пьезокварцевых иммуносенсорах. Применение биосенсоров для обнаружения иммунохимических реакций (обзор)

С. С. Гогина✉, Е. А. Смирнова, Я. М. Станишевский, А. М. Стойнова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН). Институт биохимической технологии и нанотехнологии (ИБХТН). 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 10/2

✉ **Контактное лицо:** Гогина Софья Сергеевна. **E-mail:** fominasofya@yandex.ru

ORCID: С. С. Гогина – https://orcid.org/0009-0009-2889-9680; Е. А. Смирнова – https://orcid.org/0009-0002-9160-8259;
Я. М. Станишевский – https://orcid.og/0000-0002-4248-2453; А. М. Стойнова – https://orcid.org/0000-0002-2498-5313.

Статья поступила: 12.07.2023 **Статья принята в печать:** 26.01.2024 **Статья опубликована:** 26.01.2024

Резюме

Введение. Одним из наиболее перспективных типов иммунодатчиков являются пьезокварцевые иммуносенсоры. Единоразовое использование биосенсоров является финансово затратным, что делает регенерацию поверхности биосенсора пьезокварцевых иммуносенсоров актуальной задачей. Регенерация имеет решающее значение для поддержания работоспособности датчика и возможности повторного использования. В данной статье понятия «иммуносенсор» и «иммунобиосенсор» являются взаимозаменяемыми и используются для обозначения одного и того же типа биосенсоров, работающих на основе иммунохимических взаимодействий «антиген – антитело».

Текст. В обзоре обсуждаются особенности, принципы работы и применение пьезокварцевых иммуносенсоров QCM. Особое внимание уделяется проблеме регенерации поверхности биосенсоров как ключевому аспекту обеспечения их эффективной работы и возможности многократного использования. Рассматриваются различные методы регенерации и их преимущества. Повторная активация биослоя на электроде QCM обеспечивает его стабильность и работоспособность в течение продолжительного времени. Это особенно ценно в клинических и научных исследованиях. Возможность многократного использования биосенсора позволяет снизить затраты на материалы и сократить производство отходов, что актуально с экологической и экономической точек зрения. Также воспроизведение анализа различных аналитов на одной и той же поверхности обеспечивает гибкость в многопараметрических исследованиях. Важно подчеркнуть, что удаление остаточных анализируемых веществ и процесс регенерации биослоя способствуют надежности, селективности, повышенной чувствительности и возможности проведения воспроизводимых измерений.

Заключение. Авторами был проведен анализ научной литературы, в результате чего установлено, что регенерация биослоя имеет решающее значение для поддержания работоспособности датчика и возможности повторного использования, которую определяет сила взаимодействия «антиген – антитело», поэтому условия должны быть подобраны индивидуально для каждой пары «антиген – антитело». В обзоре подробно рассмотрены три основных подхода к регенерации пьезоэлектрических преобразователей: с использованием химического метода, кислородно-плазменного метода, при помощи раствора «пираньи».

Ключевые слова: пьезокварцевые иммуносенсоры (QCM), регенерация биослоя электрода, антиген, антитело, иммунохимические реакции

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

Вклад авторов. С. С. Гогина, Е. А. Смирнова придумали и разработали концепцию обзорной статьи, совместно произвели поиск, сбор и анализ научной литературы, участвовали в написании обзора. Я. М. Станишевский и А. М. Стойнова проверили статью. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Гогина С. С., Смирнова Е. А., Станишевский Я. М., Стойнова А. М. Многократное использование биослоя QCM: подходы к регенерации в пьезокварцевых иммуносенсорах. Применение биосенсоров для обнаружения иммунохимических реакций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):128–138. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1519

Detection of Immunochemical Reactions Using Piezoquartz Immunosensor. Regeneration of the Electrode Bio-layer (Review)

Sofia S. Gogina✉, Ekaterina A. Smirnova, Yaroslav M. Stanishevskii, Anastasia M. Stoinova

Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology. 10/2, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Sofia S. Gogina. **E-mail:** fominasofya@yandex.ru

ORCID: Sofia S. Gogina – https://orcid.org/0009-0009-2889-9680; Ekaterina A. Smirnova – https://orcid.org/0009-0002-9160-8259;
Yaroslav M. Stanishevskii – https://orcid.og/0000-0002-4248-2453; Anastasia M. Stoinova – https://orcid.org/0000-0002-2498-5313.

Received: 12.07.2023 **Revised:** 26.01.2024 **Published:** 26.01.2024

© Гогина С. С., Смирнова Е. А., Станишевский Я. М., Стойнова А. М., 2024
© Gogina S. S., Smirnova E. A., Stanishevskii Ya. M., Stoinov A. M., 2024

Abstract
Introduction. One of the most promising types of immunosensors is quartz crystal microbalance immunosensors (QCM immunosensors). Single-use biosensors are financially demanding, thus rendering the regeneration of the biosensor surface a pertinent issue for QCM immunosensors. Regeneration plays a pivotal role in sustaining the functionality of the sensor and enabling its reusability. In this article, "immunosensor" and "immunobiosensor" are interchangeable terms and are used to denote the same type of biosensors operating based on immunochemical interactions between antigens and antibodies.
Text. This review discusses the features, operational principles, and applications of QCM immunosensors. Particular attention is directed toward the challenge of regenerating the biosensor surface as a key aspect ensuring their effective operation and the potential for multiple uses. Various regeneration methods and their advantages are examined. The reactivation of the biosensing layer on the QCM electrode secures its stability and functionality over extended periods, which is especially valuable in clinical and scientific research. The possibility of reusing the biosensor reduces material costs and waste production, aligning with ecological and economic concerns. Furthermore, the ability to analyze different analytes on the same surface fosters versatility in multiparametric investigations. It is essential to emphasize that the removal of residual analytes and the biosensor's regeneration process enhance reliability, selectivity, heightened sensitivity, and the potential for reproducible measurements.
Conclusion. An analysis of scientific literature underscores the pivotal role of biosensor regeneration in maintaining functionality and reusability. The strength of the antigen-antibody interaction determines the conditions, which must be tailored individually for each antigen-antibody pair. The review thoroughly explores three primary approaches to the regeneration of piezoelectric transducers, including the use of a chemical method, oxygen plasma-based techniques, and the application of Piranha solution.

Keywords: piezo quartz immunosensors (QCM), regeneration of the electrode bio-layer, antigen, antibody, immunochemical reactions

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. Sofia S. Gogina, Ekaterina A. Smirnova came up with and developed the concept of a review article, jointly searched, collected and analyzed scientific literature, participated in writing the review. Yaroslav M. Stanishevskii and Anastasia M. Stoynova checked the article. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Gogina S. S., Smirnova E. A., Stanishevskii Ya. M., Stoinov A. M. Detection of immunochemical reactions using piezoquartz immunosensor. Regeneration of the electrode bio-layer. *Drug development & registration*. 2024;13(1):128–138. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1519

ВВЕДЕНИЕ

Развивающаяся область исследований с применением иммуносенсоров (иммунобиосенсоров) сочетает в себе высокую специфичность иммунологического распознавания с чувствительностью современных сенсорных технологий. Они, как правило, специфичны для биомолекул, которые имеют иммунологические характеристики, связанные с жизненными процессами. QCM обычно не предназначены для обнаружения объектов без биогенеза или неорганических соединений. Данные биосенсоры обладают способностью обнаруживать и количественно определять широкий спектр биомолекул, включая белки, вирусы, бактерии и их комплексы [1–3]. Специфичность иммунологического распознавания делает их мощными инструментами в области диагностики и медицинских исследований, обеспечивая быстрый, надежный и неинвазивный метод выявления целого ряда заболеваний.

В последние годы одним из наиболее перспективных типов иммунодатчиков являются пьезокварцевые иммуносенсоры, в которых в качестве чувствительного элемента используется пьезоэлектрический кристалл кварца [1, 4]. Эти датчики обладают высокой чувствительностью и способностью обнаруживать незначительные изменения массы или вязкости на поверхности кристалла, что делает их идеальными для использования в иммунологических анализах. Пьезокварцевые иммуносенсоры нашли широкое применение в ряде областей, включая медицинскую диагностику, безопасность пищевых продуктов и мониторинг окружающей среды. Кроме того, регенерация электродного слоя биосенсора является критически важным процессом, который необходим для обеспечения точности и чувствительности датчика при многократном использовании.

В данном обзоре обсуждаются особенности пьезокварцевых иммуносенсоров и их применение для обнаружения иммунохимических реакций, а также рассматривается важнейший процесс для поддержания точности и чувствительности датчика при многократном использовании – регенерация электродного слоя биосенсора.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Пьезокварцевые иммуносенсоры

Пьезокварцевые иммуносенсоры – это класс биосенсоров, в которых в качестве чувствительного элемента используется пьезоэлектрический кристалл

кварца. Принцип действия основан на обнаружении изменений резонансной частоты кристалла вследствие связывания анализируемых веществ с иммобилизованными антителами (АТ) или антигенами (АГ) на поверхности кристалла [5, 6]. Иммобилизованные АТ или АГ обычно используются в качестве элементов биоопределения благодаря их высокой специфичности, они позволяют избирательно захватывать и детектировать целевые анализируемые вещества [7]. В иммуносенсоре АТ иммобилизуются на поверхности кварцевого кристалла с помощью различных методов, таких как ковалентное связывание или физическая адсорбция [8–11]. Когда образец, содержащий целевой АГ, вводится в иммуносенсор, АГ связывается с иммобилизованным АТ, вызывая изменение резонансной частоты кристалла, которое можно измерить и определить количественно. С другой стороны, могут быть иммобилизованы АГ, которые будут использоваться для избирательного захвата АТ, присутствующих в образце. Этот процесс известен как обратный анализ, где анализируемым веществом-мишенью является АТ, а не АГ.

Пьезокварцевые иммуносенсоры включают в себя кварцевый кристалл, электрод и тонкий слой, на который иммобилизован биораспознающий элемент (рисунок 1). Кварцевый кристалл имеет размеры от 5 до 16 мм и способен генерировать электрический потенциал при механическом сжатии или деформации на его поверхности [12, 13]. Электрод, как правило, изготавливается из тонкой пленки, которая может быть выполнена из золота, серебра, а также в редких случаях из алюминия, никеля или хрома [14] в силу высокой электропроводности данных металлов и стабильности в различных условиях эксплуатации, особенно часто применяется золото благодаря своей химической инертности, биосовместимости и легкости функционализации биомолекулами. Однако стоит учитывать, что серебро более подвержено окислению и коррозии, чем золото, что может повлиять на стабильность и работоспособность иммуносенсора. Электрод размещается на одной стороне кристалла, чтобы можно было измерить резонансную частоту кристалла. Например, золотые электроды могут быть легко модифицированы самосборными монослоями (*англ*. self-assembled monolayers, SAMs) тиолированных молекул, которые могут обеспечить стабильную и селективную платформу для иммобилизации биомолекул [8, 15–18]. Тиолированные молекулы, как правило, имеют терминальные группы с тиольными (—SH) группами, которые способны образовывать ковалентные связи с поверхностью золотого электрода [19]. Тонкий слой иммобилизованного элемента биоопределения наносится на электрод и служит чувствительным элементом, который избирательно улавливает целевые анализируемые вещества.

Существуют различные типы пьезокварцевых иммуносенсоров, включая биосенсоры объемных акустических волн (*англ*. bulk acoustic wave, BAW) [20–22], поверхностных акустических волн (*англ*. surface acoustic wave, SAW) [23–25], иммуносенсоры с кварцевыми микровесами (*англ*. quartz crystal microbalance, QCM) [1, 9, 26] и иммуносенсоры с пленочным объемным акустическим резонатором (*англ*. film bulk acoustic resonator, FBAR) [20, 27, 28]. В датчиках BAW используется кварцевый кристалл, который намного толще, чем в датчиках SAW. Это приводит к

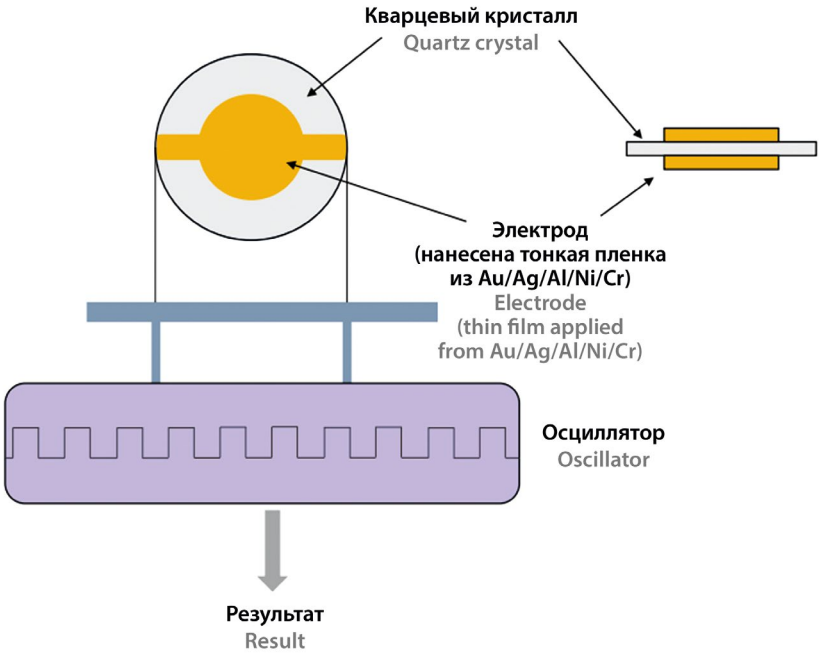


Рисунок 1. Пьезокварцевый иммуносенсор QCM

Figure 1. Piezoquartz QCM immunosensor

увеличенному времени отклика и к более низкой частоте резонанса, что делает иммуносенсоры BAW менее чувствительными в отличие от других типов. Датчики на базе BAW регистрируют изменения в резонансной частоте, которые возникают в результате взаимодействия между аналитическим агентом (АГ) и целевым аналитом (АТ). Их высокая чувствительность позволяет обнаруживать низкие концентрации целевых аналитов, что делает их ценными инструментами для обнаружения разнообразных молекул, включая белки, нуклеиновые кислоты, а также малые молекулы, такие как антибиотики, гормоны, пестициды, токсины и тяжелые металлы [29–31]. Датчики BAW находят применение в различных сферах, включая мониторинг окружающей среды, обеспечение безопасности продуктов питания, клиническую диагностику и биологическую защиту. В случае иммуносенсоров SAW, они используют тонкий слой материала с пьезоэлектрическими свойствами, который наносится на поверхность кварцевого кристалла. Этот слой помогает обнаруживать изменения в поверхностной волне. При контроле окружающей среды датчики на базе SAW используются для выявления разнообразных загрязняющих веществ в воде и воздухе, таких как тяжелые металлы, органические соединения и пестициды [32]; в области безопасности пищевых продуктов – для обнаружения патогенов пищевого происхождения, аллергенов и токсинов [33]; в клинической диагностике – для выявления биомаркеров заболеваний, таких как онкомаркеры, сердечно-сосудистые маркеры и маркеры инфекционных заболеваний [20]. Датчики QCM используют кварцевые микровесы для мониторинга изменений массы. Эти иммуносенсоры обладают высокой чувствительностью и могут использоваться для оценки биомолекулярных взаимодействий в режиме реального времени. В датчиках FBAR также используется тонкий слой материала и регистрируются изменения резонансной частоты. Эти иммуносенсоры обладают высокой чувствительностью и могут быть интегрированы в портативные устройства. Датчики QCM и FBAR также способны детектировать низкие концентрации аналитов. В целом для каждого из типов пьезокварцевых иммуносенсоров область применения одинакова.

Одной из недавних разработок в области пьезокварцевых иммуносенсоров является использование двумерных материалов (2D), таких как графен, для повышения чувствительности и селективности иммуносенсоров [9, 34]. Графен обладает уникальными электрическими и механическими свойствами, в силу чего является подходящим материалом для биосенсоров. Разработаны пьезокварцевые иммуносенсоры на основе графена, которые обладают высокой чувствительностью и селективностью для обнаружения широкого спектра биомолекул, включая белки, нуклеиновые кислоты и малые молекулы [9, 35].

Еще одним недавним достижением в области пьезокварцевых иммунодатчиков является интеграция микрофлюидных устройств и технология «лаборатория на чипе» (*англ*. lab-on-a-chip, LOC) [21, 36, 37]. Микрофлюидные устройства могут обеспечивать точный контроль за потоком жидкости и перемешиванием, обеспечивая быстрый и эффективный анализ биологических образцов. Разработаны интегрированные пьезокварцевые иммуносенсоры, которые могут быть использованы для высокопроизводительного скрининга биомолекул в микрофлюидных устройствах [37]. Устройства LOC объединяют множество лабораторных функций, таких как подготовка образцов, смешивание, реакция, разделение, детектирование и анализ на одном чипе или небольшой платформе, что позволяет проводить быстрый и портативный анализ биологических образцов [36]. Интеграция иммуносенсоров с устройствами LOC может привести к разработке недорогих, портативных и удобных в использовании диагностических инструментов. Эти устройства также находят применение в различных областях, включая медицинскую диагностику, мониторинг окружающей среды и тестирование безопасности пищевых продуктов.

В целом пьезокварцевые иммуносенсоры обладают многими преимуществами при обнаружении иммунохимических реакций: высокой чувствительностью, селективностью и точностью. Различные типы пьезокварцевых иммуносенсоров в сочетании с их способностью обнаруживать мельчайшие изменения резонансной частоты делают их мощным инструментом для обнаружения биомолекул в различных областях применения.

Обнаружение иммунохимических реакций с использованием пьезокарцевого иммуносенсора

Пьезокварцевые иммуносенсоры стали перспективным методом обнаружения иммунохимических реакций благодаря их высокой чувствительности, селективности и быстрому времени отклика. *Иммунохимические реакции* – это взаимодействие между АТ и АГ, приводящее к образованию комплекса. Это взаимодействие является высокоспецифичным, что позволяет обнаруживать целевые аналиты с высокой селективностью [38].

Датчики QCM работают по принципу микровесов кварцевого кристалла, где связывание целевых анализируемых веществ с иммобилизованными элементами биопознавания на поверхности электрода приводит к изменениям резонансной частоты пьезокварцевого кристалла [39]. Принципы, лежащие в основе работы QCM, заключаются в следующем:

1) иммобилизация: АТ или АГ иммобилизуются на поверхности пьезокварцевого электрода, создавая слой биоопределения, который обеспечивает избирательный захват целевых аналитов;

2) образование комплекса: целевой аналит, содержащийся в образце, связывается с иммобилизованным элементом биопознавания на поверхности кристалла, образуя комплекс АГ – АТ, что приводит к изменению массы или вязкоупругих свойств поверхности электрода [40];
3) детектирование сигнала: для измерения изменений свойств, которые вызывают сдвиг резонансной частоты пьезокварцевого кристалла, датчик QCM подключают к измерительной системе, которая включает в себя электронную схему для управления кристаллом и контроля резонансной частоты и рассеяния. Калибровочные кривые или эталонные образцы могут быть использованы для установления взаимосвязи между реакцией датчика и целевой концентрацией анализируемого вещества. Величина сдвига частоты прямо пропорциональна концентрации целевого анализируемого вещества, что позволяет проводить количественное определение. Датчик QCM может также измерить рассеяние, которое связано с вязкоупругими свойствами адсорбированного слоя на поверхности кристалла, что позволит определить природу связывания, включая силу взаимодействия, конформационные изменения в адсорбированном слое и динамику процесса связывания [9, 41]. Коэффициент рассеяния отражает потерю энергии при вибрации кристалла. Принципы детектирования, основанные на измерении резонансной частоты и рассеяния, позволяют проводить количественный анализ целевых аналитов.

Обнаружение иммунохимических реакций с использованием пьезокварцевых иммуносенсоров имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами, такими как иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, иммуногистохимические методы. Эти датчики обеспечивают обнаружение в режиме реального времени [42, 43] и без использования биологических меток [44], что позволяет проводить быстрый, точный и менее затратный анализ. QCM обладают высокой селективностью и чувствительностью, обеспечивая специфический захват и позволяя обнаруживать низкие концентрации целевых аналитов в сложных матрицах образцов. Диапазон концентраций может варьироваться в зависимости от многих факторов, включая размер и форму биораспознавательного слоя, взаимодействие аналита с элементом биопознавания, методы предварительной обработки образца и технические характеристики самого датчика. Кроме того, пьезокварцевые иммуносенсоры просты в использовании, экономичны и имеют широкий спектр применения в различных областях.

Технология использования датчиков QCM наряду с их отличительными особенностями и преимуществами является перспективной и обладает широким спектром применения в различных научных, клинических и других исследованиях.

Регенерация биослоя электрода пьезокарцевого иммуносенсора

В отличие от классических аналитических методов, которые требуют одноразового использования химических компонентов и зависят от иммунохимических взаимодействий, иммуносенсоры обладают возможностью многократного использования после регенерации биослоя на электроде [45].

Для повторного/многократного использования иммуносенсора требуется очистить его активную рабочую поверхность от анализированных веществ, которые были адсорбированы в процессе анализа [45], и восстановить функциональность биослоя. Очистка кварцевых микровесов играет решающую роль в регенерации биосенсоров для повторного использования. Неаккуратное удаление рецепторного слоя с поверхности может стать причиной получения некорректных результатов измерения [46].

Регенерация и повторное использование поверхности биосенсора имеет два преимущества. Во-первых, поверхности биосенсоров стоят дорого, и их однократное использование, а затем утилизация, делает эксперимент финансово затратным. Во-вторых, повторное использование поверхности биосенсора позволяет сохранить одинаковую плотность поверхностных лигандов для каждого образца, что, в свою очередь, обеспечивает большую воспроизводимость эксперимента [47].

Можно выделить три основных подхода к регенерации пьезоэлектрических преобразователей: с использованием химического и кислородно-плазменного метода, а также при помощи раствора «пираньи».

Для некоторых типов иммуносенсоров до сих пор не найдено оптимальных условий регенерации, не снижающих их чувствительность. В этих случаях используют сменные одноразовые мембранные элементы [48].

Химический метод

Главным образом, характер взаимодействия антигена и антитела существенно влияет на процесс регенерации и возможность повторного использования поверхности датчика в исследованиях иммунобиосенсоров. В связи с этим условия регенерации следует определять и оптимизировать индивидуально для каждой пары «антиген – антитело», чтобы обеспечить эффективное и точное функционирование системы [49]. Для этого обычно проводят сравнение качества очистки электродов, а в качестве параметра химической чистоты поверхности электрода используется разность потенциалов между анодным и катодным пиками [46].

Этот метод заключается в извлечении датчика и погружении его в регенерирующий буфер [50], что делает его наиболее используемым и простым подходом к регенерации биосенсоров. В качестве регенерирующего агента могут служить также детергенты

[Triton X-100, Tween 20, додецилсульфат натрия (*англ*. sodium dodecyl sulfate, SDS)], органические растворители (этанол, метанол, ацетон) или растворы ферментов (протеиназа K, липаза).

Электрохимический способ

Электрохимическая очистка состоит из нескольких циклов окисления/восстановления. Очистку и регенерацию микровесов проводят по методике, основанной на изменении потенциала. Электроды QCM подвергают очистке с использованием потенциостата-гальваностата в трехэлектродной системе, где Au выполняет функцию рабочего электрода, Pt – противоэлектрода и Ag/AgCl служит электродом сравнения. Этот процесс обеспечивает эффективную очистку и поддержание электродов в оптимальном состоянии для дальнейшей работы. Для этого существует несколько электрохимических обработок: циклическое изменение потенциала 50 мМ раствора HCl, 100 мМ раствора HNO_3, 50 мМ раствора H_2SO_4 и 50 мМ раствора KOH, 0,5 М раствора NaOH [46, 51–54].

Реже при проведении электрохимической регенерации применяют и другие растворы: 6 М гидрохлорида гуанидина, 50 % метанола, 100 мМ NaOH и 70 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 50 мМ NaOH и 35 мМ ЭДТА, 0,1 М NaOH и 0,5 М NaCl, 50 мМ NaOH, 0,1 М глицина при pH = 2,7, 50 мМ NaOH и 1 % SDS, 0,1 М HCl [49, 55]. Также сообщалось о проведении очистки с использованием одиночного импульса при –1,4 В и +1,4 В (импульс постоянного тока) продолжительностью 30 с в фосфатно-солевом буфере (*англ*. phosphate-buffered saline, PBS) [53].

Кислотно-щелочная регенерация

Во многих исследованиях регенерация была достигнута за счет использования в системе буферов с высоким или низким pH. Обычно необходимо поддерживать низкий pH буфера, не ниже значения pH = 2, чтобы избежать необратимого повреждения биосенсора; напротив, высокий pH буфера часто ограничивается значением pH = 11 по той же причине [50]. Начало формы

При переходе значений pH изменяется энтальпийное состояние системы путем перераспределения относительных зарядов между анализируемым веществом и биорецептором. По мере ионизации боковых групп изменяется и распределение зарядов, которые поддерживают третичную структуру биорецептора. Эта структурная денатурация способствует отделению анализируемого вещества от биорецептора. Также смена pH способствует изменению ионной силы окружающей среды и скринингу взаимодействий рецептор/аналит [50].

Основным преимуществом использования данной регенерации является низкая стоимость. Однако следует отметить, что ее можно использовать только в системах, где измененный pH не будет влиять на сигнал датчика. Еще одним ограничением применения кислотно-щелочного метода являются хрупкие белки-биорецепторы. Если они легко денатурируются, то следствием проведения регенерации будет безвозвратное повреждение биорецептора [50].

Другим способом изменения ионной силы является использование сильных электролитов, таких как Ca^{2+} и NaCl. Если система особенно чувствительна к изменению pH, то это может стать предпочтительной альтернативой для предотвращения необратимой денатурации компонентов датчика [50].

Детергенты

При регенерации биослоя QCM часто используют детергенты в низких концентрациях [50]. Структурно детергенты обычно представлены гетеробифункциональными молекулами, содержащими два различных участка: полярную головку, которая хорошо растворима благодаря своему заряду, и алифатический неполярный хвост [50].

Поскольку хвостовые области являются гидрофобными, они координируются с аналогичными областями биорецептора или анализируемого вещества. Затем полярная группа проникает в водную фазу, сводя к минимуму отталкивание и тем самым способствуя растворимости анализируемого вещества. В определенных системах биосенсоров гидрофобность может быть ключевой силой во взаимодействии биорецептора с анализируемым веществом, например, при обнаружении гидрофобных аналитов. Следовательно, детергенты могут быть ключевым компонентом буфера для регенерации. Как правило, для этого используются мягкие моющие средства, такие как Tween, также возможно применение и более жестких моющих средств, например SDS в присутствии 50 мМ NaOH [49, 50].

Глицин

Глицин является доступным недорогим восстановителем, широко используемым в качестве регенерирующего агента. Благодаря диапазону буферизации pH = 2 ÷ 7,54 он является хорошим компонентом для приготовления кислого буферного раствора 10 мМ раствор глицина – HCl (pH = 1,5), что, в свою очередь, позволяет избежать локальных экстремумов pH [48, 50, 56–58].

В растворе глицин является цвиттер-ионом и действует как мягкий экранирующий агент для зарядов на границе раздела фаз, что помогает снизить энтальпийное взаимодействие между биорецептором и анализируемым веществом. Глицин связывается и с поверхностью биорецептора, и с анализируемым веществом. Таким образом, во время воздействия регенерирующего буфера биорецептор частично защищен от повреждений, вызванных изменением pH среды. Несмотря на то, что глицин полезен для оптических и механических сенсорных систем, он может

иметь ограниченное применение в электрохимических сенсорных системах, поскольку использование низкого pH может необратимо повлиять на сигнал датчика [50].

Хаотропные агенты

Для регенерации биосенсоров применяют и хаотропные агенты: мочевину, которая часто используется для поддержания нейтрального pH в растворе, диметилсульфоксид (ДМСО), формидамид, Tris-ЭДТА, Tris-HCl [59–63].

Многократное использование одного и того же рецепторного слоя может быть достигнуто и путем разрушения иммунокомплекса, образовавшегося в ходе анализа, с помощью растворов тиоцианата калия различных концентраций (0,4 мМ, 0,04 М, 0,4 М). Нанесение 0,4 мМ раствора тиоцианата калия обеспечивает полное и быстрое разрушение иммунокомплекса без воздействия на иммобилизованный слой, сохраняя целостность биорецепторного слоя при достаточно быстром разрушении иммунного комплекса. Использование растворов других концентраций может либо повредить рецепторный слой, либо частично разрушить комплекс «антиген – антитело» [64–66].

Для проведения полной очистки металлической поверхности биосенсорного электрода часто используют более высококонцентрированные растворы щелочей и кислот, например 0,5–1,2 М NaOH (с pH = 11 ÷ 13) и 0,5–1,2 М HCl (с pH = 1 ÷ 2). После тщательной очистки и высушивания на устройстве QCM можно приступить к созданию нового биочувствительного слоя [67, 68]. Этот процесс обеспечивает эффективную регенерацию поверхности и поддержание ее в рабочем состоянии.

Кислородно-плазменная очистка

Кислородно-плазменная очистка микровесов кварцевого кристалла является простым, быстрым и безопасным методом. Кислородная плазма может быть использована для быстрого удаления загрязнений как с металлических, так и с неметаллических поверхностей. Так как реакции взаимодействия кислорода и диоксида кремния не происходит, свойства кристалла кварца не меняются при очистке микровесов. При кислородно-плазменной обработке на поверхности микровесов кварцевого кристалла образуются различные кислородные функциональные группы, такие как C—O, C=O, O—C=O и C—O—O. Травление полимера происходит в результате взаимодействия атомарного кислорода с атомами углерода на поверхности, что приводит к образованию летучего продукта (например, угарный газ CO). Принцип функционирования заключается в пропускании электрического тока через плазму, которая генерирует высокоэнергетические электроны. Эти электроны взаимодействуют с молекулами газа в реакторе, что приводит к разрыву химических связей. Кроме того, кислородная плазма вызывает окисление поверхности, образуя оксид золота (Au_2O_3). Этот процесс обеспечивает эффективное травление и подготовку поверхности для дальнейшей работы. Кислородно-плазменную очистку проводят с использованием генератора плазмы в течение 85 с при давлении 0,5 мБа и мощности 22 Вт. После очистки QCM помещают в химический стакан с деионизированной водой, затем переносят в метанол с последующей сушкой в эксикаторе [46].

Раствор «пираньи»

Использование электродов QCM требует точной очистки для получения воспроизводимых результатов. Одним из методов регенерации является применение раствора «пираньи». Его готовят путем смешивания концентрированной H_2SO_4 и 30%-го раствора H_2O_2 в соотношении 3:1. После обработки раствором «пираньи» QCM подвергают промывке деминерализованной водой и этанолом, а затем сушат в потоке воздуха. В некоторых источниках указывается на возможность дополнительного подогрева раствора (40–60 °C). Важно отметить, что раствор «пираньи» самопроизвольно нагревается до указанных температур, так как смешивание его компонентов вызывает экзотермическую реакцию. Этот процесс способствует эффективной очистке поверхности [46, 69–70].

Благодаря эффективной регенерации биослоя QCM можно использовать для многократных циклов обнаружения, что повышает его практичность и экономическую эффективность. Благодаря удалению остаточных анализируемых веществ повышается точность последующих измерений, кроме того, процесс регенерации обеспечивает надежность, селективность, чувствительность и воспроизводимость измерений иммуносенсором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пьезокварцевые иммуносенсоры нашли широкое применение в области лабораторной диагностики, проведения научных исследований, сертификации пищевых продуктов. Их способность обнаруживать низкие концентрации целевых аналитов является ключевой в клинической практике.

Единоразовое использование биосенсоров в связи с большой стоимостью является финансово затратным, что делает регенерацию поверхности биосенсора пьезокварцевых иммуносенсоров актуальной задачей. Регенерация имеет решающее значение для поддержания работоспособности датчика и возможности повторного использования.

В обзоре были изучены принципы работы иммуносенсоров и их способность обнаруживать иммунохимические реакции с высокой чувствительностью и селективностью, а также рассмотрены основные спо-

собы регенерации биослоя QCM: химический метод – с использованием детергентов, хаотропных агентов, глицина, кислотно-щелочной и электрохимической обработки; кислородно-плазменный метод и метод с использованием раствора «пираньи».

При выборе способа проведения регенерации необходимо помнить, что возможность повторного использования сенсорной поверхности определяет сила взаимодействия «антиген – антитело», поэтому условия должны быть подобраны индивидуально для каждой пары «антиген – антитело» [49]. Для этого проводят сравнение качества очистки электродов, а в качестве параметра химической чистоты поверхности электрода используется разность потенциалов между анодным и катодным пиками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lim H. J., Saha T., Tey B. T., Tan W. S., Ooi C. W. Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases. *Biosensors & bioelectronics*. 2020;168:112513. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112513.
2. Azam T., Bukhari S. H., Liaqat U., Miran W. Emerging Methods in Biosensing of Immunoglobin G-A Review. *Sensors (Basel)*. 2023;23(2):676. DOI: 10.3390/s23020676.
3. Zida S. I., Lin Y. D., Khung Y. L. Current trends on surface acoustic wave biosensors. *Advanced Materials Technologies*. 2021;6(6):2001018. DOI: 10.1002/admt.202001018.
4. Kuchmenko T. A., Lvova L. B. A perspective on recent advances in piezoelectric chemical sensors for environmental monitoring and foodstuffs analysis. *Chemosensors*. 2019;7(3):39. DOI: 10.3390/chemosensors7030039.
5. Alanazi N., Almutairi M., Alodhayb A. N. A Review of Quartz Crystal Microbalance for Chemical and Biological Sensing Applications. *Sensing and Imaging*. 2023;24(1):10. DOI: 10.1007/s11220-023-00413-w.
6. Na Songkhla S., Nakamoto T. Overview of quartz crystal microbalance behavior analysis and measurement. *Chemosensors*. 2021;9(12):350. DOI: 10.3390/chemosensors9120350.
7. Pohanka M. Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials (Basel)*. 2018;11(3):448. DOI: 10.3390/ma11030448.
8. Gao S., Guisán J. M., Rocha-Martin J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms – A critical review. *Analytica chimica acta*. 2022;1189: 338907. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338907.
9. Hampitak P., Jowitt T. A., Melendrez D., Fresquet M., Hamilton P., Iliut M., Nie K., Spencer B., Lennon R., Vijayaraghavan A. A Point-of-Care Immunosensor Based on a Quartz Crystal Microbalance with Graphene Biointerface for Antibody Assay. *ACS Sensors*. 2020;5(11):3520–3532. DOI: 10.1021/acssensors.0c01641.
10. Saffari Z., Ghavidel A., Ahangari-Cohan R., Hamidi-Fard M., Khoobi M., Aghasadeghi M., Norouzian D. Label-Free Real-Time Detection of HBsAg Using a QCM Immunosensor. *Clinical Laboratory*. 2022;68(4). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2021.210537.
11. Akgönüllü S., Özgür E., Denizli A. Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance Biosensors Based on the Molecular Imprinting Technique for Disease-Related Biomarkers. *Chemosensors*. 2022;10(3):106. DOI: 10.3390/chemosensors10030106.
12. Kwak J., Lee S. S. Highly sensitive piezoelectric immunosensors employing signal amplification with gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2019;30(44):445502. DOI: 10.1088/1361-6528/ab36c9.
13. Li W., Li J., Wu Y., Zhou T. A. A Novel Method in Identifying Pyroptosis and Apoptosis Based on the Double Resonator Piezoelectric Cytometry Technology. *Biosensors*. 2023;13(3):356. DOI: 10.3390/bios13030356.
14. Kırali K., Brimo N., Serdaroğlu D. Ç. Antibody Immobilization Techniques in Mass Sensitive Immunosensor: Enhanced Sensitivity through Limited Mass Load. *Current Analytical Chemistry*. 2022;18(5):529–545. DOI: 10.2174/1573411016999201120090551.
15. Singh M., Kaur N., Comini E. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. *Journal of Materials Chemistry C*. 2020;8(12):3938–3955. DOI: 10.1039/D0TC00388C.
16. Sharma P., Chauhan R., Pande V., Basu T., Kumar A. Rapid sensing of Tilletia indica–Teliospore in wheat extract by a piezoelectric label free immunosensor. *Bioelectrochemistry*. 2022;147:108175. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108175.
17. Xu Z., Luo Y. Immunoglobulin-Immobilized Quartz Crystal Microbalance for Staphylococcus Aureus Real-Time Detection. *IEEE Sensors Journal*. 2022;22(12):11594–11601. DOI: 10.1109/JSEN.2022.3174161.
18. Akgönüllü S., Özgür E., Denizli A. Quartz crystal microbalance-based aptasensors for medical diagnosis. *Micromachines*. 2022;13(9):1441. DOI: 10.3390/mi13091441.
19. Zhang L., Shalabny A., Su C., Cui X., Sweedan A., Zhang K., Harilal S., Sadhujan S., Bashouti M. Y. Dynamic molecular tunnel junctions based on self-assembled monolayers for high tunneling current triboelectricity generation. *Journal of Materials Chemistry A*. 2023;11(10):4946–4956. DOI: 10.1039/D2TA10048G.
20. Zhang J., Zhang X., Wei X., Xue Y., Wan H., Wang P. Recent advances in acoustic wave biosensors for the detection of disease-related biomarkers: A review. *Analytica chimica acta*. 2021;1164:338321. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338321.
21. Nair M. P., Teo A.J. T., Li K. H. H. Acoustic Biosensors and Microfluidic Devices in the Decennium: Principles and Applications. *Micromachines*. 2021;13(1):24. DOI: 10.3390/mi13010024.
22. Naresh V., Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel)*. 2021;21(4):1109. DOI: 10.3390/s21041109.
23. Zhao C., Li C., Li M., Qian L., Wang L., Li H. Surface acoustic wave immunosensor based on Au-nanoparticles-decorated graphene fluidic channel for CA125 detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2022;367:132063. DOI: 10.1016/j.snb.2022.132063.
24. Rauf S., Qazi H. I. A., Luo J., Fu C., Tao R., Rauf S., Yang L., Li H., Fu Y. Ultrasensitive Leaky Surface Acoustic Wave Immunosensor for Real-Time Detection of Alpha-Fetoprotein in Biological Fluids. *Chemosensors*. 2021;9(11):311. DOI: 10.3390/chemosensors9110311.
25. Toma K., Arakawa T., Mitsubayashi K. Reusable Surface Acoustic Wave Immunosensor for Enhanced Monitoring of Airborne House Dust Mite Allergens. New York: Jenny Stanford Publishing; 2021. P. 91–102.
26. Jandas P. J., Prabakaran K., Luo J., MG D. H. Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2021;331:113020. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113020.
27. Länge K. Bulk and Surface Acoustic Wave Biosensors for Milk Analysis. *Biosensors*. 2022;12(8):602. DOI: 10.3390/bios12080602.
28. Kırali K., Brimo N., Serdaroğlu D. Ç. Antibody Immobilization Techniques in Mass Sensitive Immunosensor: Enhanced Sensitivity through Limited Mass Load. *Current Analytical Chemistry*. 2022;18(5):529–545.
29. Xu H., Gao M., Tang X., Zhang W., Luo D., Chen M. Micro/Nano Technology for Next-Generation Diagnostics. *Small Methods*. 2020;4(4):1900506. DOI :10.1002/smtd.201900506.
30. Guliy O. I., Zaitsev B. D., Smirnov A. V., Karavaeva O. A., Borodina I. A. Prospects of acoustic sensor systems for antibiotic detection. *Biosensors and Bioelectronics: X*. 2022;12:100274. DOI: 10.1016/j.biosx.2022.100274.
31. Brimo N., Serdaroğlu D. Ç. Molecular Imprinted Polymers for Mass Sensitive Sensors: Comparation of Performance Toward Immuno-Sensing Strategies. *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications*. 2021;335–365. DOI: 10.1016/B978-0-12-822117-4.00013-7.
32. Rizzato S., Leo A., Monteduro A. G., Chiriacò M. S., Primiceri E., Sirsi F., Milone A., Maruccio G. Advances in the Development of Innovative Sensor Platforms for Field Analysis. *Micromachines*. 2020;11(5):491. DOI: 10.3390/mi11050491.
33. Liang S., Sutham P., Wu K., Mallikarjunan K., Wang J. P. Giant Magnetoresistance Biosensors for Food Safety Applications. *Sensors (Basel)*. 2022;22(15):5663. DOI: 10.3390/s22155663.

34. Li Z., Zhang J., Huang Y., Zhai J., Liao G., Wang Z., Ning C. Development of electroactive materials-based immunosensor towards early-stage cancer detection. *Coordination Chemistry Reviews*. 2022;471:214723. DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214723.
35. Srivastava A. K, Dwivedi N., Dhand C., Khan R., Sathish N., Gupta M. K., Kumar R., Kumar S. Potential of graphene-based materials to combat COVID-19: properties, perspectives, and prospects. *Materials today*. 2020;18:100385. DOI: 10.1016/j.mtchem.2020.100385.
36. Khan N. I., Song E. Lab-on-a-Chip Systems for Aptamer-Based Biosensing. *Micromachines*. 2020;11(2):220. DOI: 10.3390/mi11020220.
37. Farré M., Barceló D. Microfluidic devices: biosensors. *Chemical analysis of food*. 2020;287–351. DOI: 10.1016/B978-0-12-813266-1.00006-1.
38. Lakard B. Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. *Applied Sciences*. 2020;10(18):6614. DOI: 10.3390/app10186614.
39. Shaukat H., Ali A., Bibi S., Altabey W. A., Noori M., Kouritem S. A. A Review of the Recent Advances in Piezoelectric Materials, Energy Harvester Structures, and Their Applications in Analytical Chemistry. *Applied Sciences*. 2023;13(3):1300. DOI: 10.3390/app13031300.
40. Naal Z., Naal R. M. Z. G. Quartz Crystal Microbalance in Bioanalysis. In: Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry. New York: Springer; 2021. P. 313–330. DOI: 10.1007/978-3-030-82381-8_17.
41. Wei Z., Rolle M. W., Camesano T. A. LL37 and collagen-binding domain-mediated LL37 binding with type I collagen: Quantification via QCM-D. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022;220:112852. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112852.
42. Bonyadi F., Kavruk M., Ucak S., Cetin B., Bayramoglu G., Dursun A. D., Arica Y., Ozalp V. C. Real-Time Biosensing Bacteria and Virus with Quartz Crystal Microbalance: Recent Advances, Opportunities, and Challenges. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2023;1–12. DOI: 10.1080/10408347.2023.2211164.
43. Jandas P. J., Prabakaran K., Luo J., MG D. H. Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2021;331:113020. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113020.
44. Andryukov B. G., Besednova N. N., Romashko R. V., Zaporozhets T. S., Efimov T. A. Label-free biosensors for laboratory-based diagnostics of infections: Current achievements and new trends. *Biosensors*. 2020;10(2):11. DOI: 10.3390/bios10020011.
45. Ермолаева Т. Н., Калмыкова Е. Н., Шашканова О. Ю. Пьезокварцевые биосенсоры для анализа объектов окружающей среды, пищевых продуктов и для клинической диагностики. *Российский химический журнал*. 2008;LII(2):17–29.
46. Wasilewski T., Szulczyński B., Dobrzyniewski D., Jakubaszek W., Gębicki J., Kamysz W. Development and Assessment of Regeneration Methods for Peptide-Based QCM Biosensors in VOCs Analysis Applications. *Biosensors*. 2022;12(5):309. DOI: 10.3390/bios12050309.
47. Dubiel A E., Fülöp T., Vigier S., Vermette P. Quartz crystal microbalance as an assay to detect anti-drug antibodies for the immunogenicity assessment of therapeutic biologics. *Analytical and biological chemistry*. 2017;409(30):7153–7167. DOI: 10.1007/s00216-017-0674-2.
48. Гаврилов В. А., Тихонов И. В., Смирнова Е. А., Заболоцкая Т. В. Технология изготовления и применения современных методов иммунодиагностики. М.: МГАВМиБ им. К. И. Скрябина; 2013. 42 с.
49. Pirinçci S., Ertekin Ö., Laguna D., Özen F., Öztürk Z., Öztürk S. Label-Free QCM Immunosensor for the Detection of Ochratoxin A. *Sensors (Basel)*. 2018;18(4):1161. DOI: 10.3390/s18041161.
50. Goode J. A., Rushworth J. V. H., Millner P. A. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*. 2015;31(23):6267–6276. DOI: 10.1021/la503533g.
51. Jin Y., Huang Y., Liu G., Zhao R. Gold nanoparticle-sensitized quartz crystal microbalance sensor for rapid and highly selective determination of Cu(II) ions. *The Analyst*. 2013;138(18):5479–5485. DOI: 10.1039/c3an00948c.
52. Bereli N., Çimen D., Hüseynli S., Denizli A. Detection of amoxicillin residues in egg extract with a molecularly imprinted polymer on gold microchip using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance methods. *Journal of food science*. 2020;85(12):4152–4160. DOI: 10.1111/1750-3841.15529.
53. Pei Y., McEleney K., Payne S. J., She Z. Incorporating quartz crystal microbalance with chronoamperometry to enhance manganese detection stability in drinking water. *Electrochimica Acta*. 2023;447:142156. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142156.
54. Saffari Z., Sepahi M., Ahangari-Cohan R., Khoobi M., Hamidi-Fard M., Ghavidel A., Aghasadeghi M. R., Norouzian D. A quartz crystal microbalance biosensor based on polyethylenimine-modified gold electrode to detect hepatitis B biomarker. *Analytical Biochemistry*. 2023;661:114981. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114981.
55. Wang L., Wu C., Hu Z., Zhang Y., Li R., Wang P. Sensing Escherichia coli O157:H7 via frequency shift through a self-assembled monolayer based QCM immunosensor. *Journal of Zhejiang University – Science B*. 2008;9:121–131. DOI: 10.1631/jzus.B0710307.
56. Salmain M., Ghasemi M., Boujday S., Pradier C.-M. Elaboration of a reusable immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012;173:148–156. DOI: 10.1016/j.snb.2012.06.052.
57. Hong S., Jeong H., Hong S. QCM DNA biosensor for the diagnosis of a fish pathogenic virus VHSV. *Talanta*. 2010;82;899–903. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.04.065.
58. Park I.-S., Kim W.-Y., Kim N. Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting Salmonella spp. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000;15:167–172. DOI: 10.1016/s0956-5663(00)00053-1.
59. Li F., Dong Y., Zhang Z., Lv M., Wang Z., Ruan X., Yang D. A recyclable biointerface based on cross-linked branched DNA nanostructures for ultrasensitive nucleic acid detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;117:562–566. DOI: 10.1016/j.bios.2018.06.053.
60. Yao C., Qi Y., Zhao Y., Xiang Y., Chen Q., Fu W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(8):2499–2503. DOI: 10.1016/j.bios.2008.12.036.
61. Lino C., Barrias S., Chaves R., Adega F., Fernandes J., Martins-Lopes P. Development of a QCM-based biosensor for the detection of non-small cell lung cancer biomarkers in liquid biopsies. *Talanta*. 2023;260:124624. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124624.
62. Naberezhnykh G. A., Gorbach V. I., Kalmykova E. N., Solov'eva T. F. Determination of the parameters of binding between lipopolysaccharide and chitosan and its N-acetylated derivative using a gravimetric piezoquartz biosensor. *Biophysical Chemistry*. 2015;198:9–13. DOI: 10.1016/j.bpc.2015.01.003.
63. Wang D., Chen G., Wang H., Tang W., Pan W., Li N., Liu F. A reusable quartz crystal microbalance biosensor for highly specific detection of single-base DNA mutation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;48:276–280. DOI: 10.1016/j.bios.2013.04.035.
64. Karaseva N., Ermolaeva T. A regenerable piezoelectric immunosensor on the basisof electropolymerized polypyrrole for highly selective detectionof Staphylococcal Enterotoxin A in foodstuffs. *Microchimica Acta*. 2015;182:1329–1335. DOI: 10.1007/s00604-015-1456-1.
65. Васильев С. В., Попова М. В., Фарафонова О. В., Карасева Н. А., Ермолаева Т. Н. Формирование рецепторного слоя пьезокварцевого иммуносенсора для определения следовых концентраций рактопамина. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;1.
66. Ye J., Zhang Y., Meng J. Protein–Ligand interactions for hydrophobic charge-induction chromatography: A QCM-D study. *Applied Surface Science*. 2022;572:151420. DOI: 10.1016/j.apsusc.2021.151420.
67. Калмыкова Е. Н., Гарбузова А. В., Ермолаева Т. Н., Зубова Н. Ю. Применение сульфатированных полисахаридов для активации электродов пьезокварцевого иммуносенсора. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2007;1:43–48.
68. Cervera-Chiner L., Juan-Borrás M., March C., Arnau A., Escriche I., Montoya A., Jiménez Y. High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey. *Food Control*. 2018;92:1–6. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.04.026.
69. Bhalla V., Carrara S., Stagni C., Samorì B. Chip cleaning and regeneration for electrochemical sensor arrays. *Thin Solid Films*. 2010;518(12):3360–3366. DOI: 10.1016/j.tsf.2009.10.022.

70. Han J., Zhang J., Xia Y., Li S., Jiang L. An immunoassay in which magnetic beads act both as collectors and sensitive amplifiers for detecting antigens in a microfluidic chip (MFC)–quartz crystal microbalance (QCM) system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011;1–3:2–9. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.11.066.

REFERENCES

1. Lim H. J., Saha T., Tey B. T., Tan W. S., Ooi C. W. Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases. *Biosensors & bioelectronics*. 2020;168:112513. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112513.
2. Azam T., Bukhari S. H., Liaqat U., Miran W. Emerging Methods in Biosensing of Immunoglobin G-A Review. *Sensors (Basel)*. 2023;23(2):676. DOI: 10.3390/s23020676.
3. Zida S. I., Lin Y. D., Khung Y. L. Current trends on surface acoustic wave biosensors. *Advanced Materials Technologies*. 2021;6(6):2001018. DOI: 10.1002/admt.202001018.
4. Kuchmenko T. A., Lvova L. B. A perspective on recent advances in piezoelectric chemical sensors for environmental monitoring and foodstuffs analysis. *Chemosensors*. 2019;7(3):39. DOI: 10.3390/chemosensors7030039.
5. Alanazi N., Almutairi M., Alodhayb A. N. A Review of Quartz Crystal Microbalance for Chemical and Biological Sensing Applications. *Sensing and Imaging*. 2023;24(1):10. DOI: 10.1007/s11220-023-00413-w.
6. Na Songkhla S., Nakamoto T. Overview of quartz crystal microbalance behavior analysis and measurement. *Chemosensors*. 2021;9(12):350. DOI: 10.3390/chemosensors9120350.
7. Pohanka M. Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials (Basel)*. 2018;11(3):448. DOI: 10.3390/ma11030448.
8. Gao S., Guisán J. M., Rocha-Martin J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms – A critical review. *Analytica chimica acta*. 2022;1189: 338907. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338907.
9. Hampitak P., Jowitt T. A., Melendrez D., Fresquet M., Hamilton P., Iliut M., Nie K., Spencer B., Lennon R., Vijayaraghavan A. A Point-of-Care Immunosensor Based on a Quartz Crystal Microbalance with Graphene Biointerface for Antibody Assay. *ACS Sensors*. 2020;5(11):3520–3532. DOI: 10.1021/acssensors.0c01641.
10. Saffari Z., Ghavidel A., Ahangari-Cohan R., Hamidi-Fard M., Khoobi M., Aghasadeghi M., Norouzian D. Label-Free Real-Time Detection of HBsAg Using a QCM Immunosensor. *Clinical Laboratory*. 2022;68(4). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2021.210537.
11. Akgönüllü S., Özgür E., Denizli A. Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance Biosensors Based on the Molecular Imprinting Technique for Disease-Related Biomarkers. *Chemosensors*. 2022;10(3):106. DOI: 10.3390/chemosensors10030106.
12. Kwak J., Lee S. S. Highly sensitive piezoelectric immunosensors employing signal amplification with gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2019;30(44):445502. DOI: 10.1088/1361-6528/ab36c9.
13. Li W., Li J., Wu Y., Zhou T. A. A Novel Method in Identifying Pyroptosis and Apoptosis Based on the Double Resonator Piezoelectric Cytometry Technology. *Biosensors*. 2023;13(3):356. DOI: 10.3390/bios13030356.
14. Kırali K., Brimo N., Serdaroğlu D. Ç. Antibody Immobilization Techniques in Mass Sensitive Immunosensor: Enhanced Sensitivity through Limited Mass Load. *Current Analytical Chemistry*. 2022;18(5):529–545. DOI: 10.2174/1573411016999201120090551.
15. Singh M., Kaur N., Comini E. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. *Journal of Materials Chemistry C*. 2020;8(12):3938–3955. DOI: 10.1039/D0TC00388C.
16. Sharma P., Chauhan R., Pande V., Basu T., Kumar A. Rapid sensing of Tilletia indica–Teliospore in wheat extract by a piezoelectric label free immunosensor. *Bioelectrochemistry*. 2022;147:108175. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108175.
17. Xu Z., Luo Y. Immunoglobulin-Immobilized Quartz Crystal Microbalance for Staphylococcus Aureus Real-Time Detection. *IEEE Sensors Journal*. 2022;22(12):11594–11601. DOI: 10.1109/JSEN.2022.3174161.
18. Akgönüllü S., Özgür E., Denizli A. Quartz crystal microbalance-based aptasensors for medical diagnosis. *Micromachines*. 2022;13(9):1441. DOI: 10.3390/mi13091441.
19. Zhang L., Shalabny A., Su C., Cui X., Sweedan A., Zhang K., Harilal S., Sadhujan S., Bashouti M. Y. Dynamic molecular tunnel junctions based on self-assembled monolayers for high tunneling current triboelectricity generation. *Journal of Materials Chemistry A*. 2023;11(10):4946–4956. DOI: 10.1039/D2TA10048G.
20. Zhang J., Zhang X., Wei X., Xue Y., Wan H., Wang P. Recent advances in acoustic wave biosensors for the detection of disease-related biomarkers: A review. *Analytica chimica acta*. 2021;1164:338321. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338321.
21. Nair M. P., Teo A.J. T., Li K. H. H. Acoustic Biosensors and Microfluidic Devices in the Decennium: Principles and Applications. *Micromachines*. 2021;13(1):24. DOI: 10.3390/mi13010024.
22. Naresh V., Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel)*. 2021;21(4):1109. DOI: 10.3390/s21041109.
23. Zhao C., Li C., Li M., Qian L., Wang L., Li H. Surface acoustic wave immunosensor based on Au-nanoparticles-decorated graphene fluidic channel for CA125 detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2022;367:132063. DOI: 10.1016/j.snb.2022.132063.
24. Rauf S., Qazi H. I. A., Luo J., Fu C., Tao R., Rauf S., Yang L., Li H., Fu Y. Ultrasensitive Leaky Surface Acoustic Wave Immunosensor for Real-Time Detection of Alpha-Fetoprotein in Biological Fluids. *Chemosensors*. 2021;9(11):311. DOI: 10.3390/chemosensors9110311.
25. Toma K., Arakawa T., Mitsubayashi K. Reusable Surface Acoustic Wave Immunosensor for Enhanced Monitoring of Airborne House Dust Mite Allergens. New York: Jenny Stanford Publishing; 2021. P. 91–102.
26. Jandas P. J., Prabakaran K., Luo J., MG D. H. Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2021;331:113020. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113020.
27. Länge K. Bulk and Surface Acoustic Wave Biosensors for Milk Analysis. *Biosensors*. 2022;12(8):602. DOI: 10.3390/bios12080602.
28. Kırali K., Brimo N., Serdaroğlu D. Ç. Antibody Immobilization Techniques in Mass Sensitive Immunosensor: Enhanced Sensitivity through Limited Mass Load. *Current Analytical Chemistry*. 2022;18(5):529–545.
29. Xu H., Gao M., Tang X., Zhang W., Luo D., Chen M. Micro/Nano Technology for Next-Generation Diagnostics. *Small Methods*. 2020;4(4):1900506. DOI :10.1002/smtd.201900506.
30. Guliy O. I., Zaitsev B. D., Smirnov A. V., Karavaeva O. A., Borodina I. A. Prospects of acoustic sensor systems for antibiotic detection. *Biosensors and Bioelectronics: X*. 2022;12:100274. DOI: 10.1016/j.biosx.2022.100274.
31. Brimo N., Serdaroğlu D. Ç. Molecular Imprinted Polymers for Mass Sensitive Sensors: Comparation of Performance Toward Immuno-Sensing Strategies. *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications*. 2021;335–365. DOI: 10.1016/B978-0-12-822117-4.00013-7.
32. Rizzato S., Leo A., Monteduro A. G., Chiriacò M. S., Primiceri E., Sirsi F., Milone A., Maruccio G. Advances in the Development of Innovative Sensor Platforms for Field Analysis. *Micromachines*. 2020;11(5):491. DOI: 10.3390/mi11050491.
33. Liang S., Sutham P., Wu K., Mallikarjunan K., Wang J. P. Giant Magnetoresistance Biosensors for Food Safety Applications. *Sensors (Basel)*. 2022;22(15):5663. DOI: 10.3390/s22155663.
34. Li Z., Zhang J., Huang Y., Zhai J., Liao G., Wang Z., Ning C. Development of electroactive materials-based immunosensor towards early-stage cancer detection. *Coordination Chemistry Reviews*. 2022;471:214723. DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214723.
35. Srivastava A. K, Dwivedi N., Dhand C., Khan R., Sathish N., Gupta M. K., Kumar R., Kumar S. Potential of graphene-based materials to combat COVID-19: properties, perspectives, and prospects. *Materials today*. 2020;18:100385. DOI: 10.1016/j.mtchem.2020.100385.
36. Khan N. I., Song E. Lab-on-a-Chip Systems for Aptamer-Based Biosensing. *Micromachines*. 2020;11(2):220. DOI: 10.3390/mi11020220.
37. Farré M., Barceló D. Microfluidic devices: biosensors. *Chemical analysis of food*. 2020;287–351. DOI: 10.1016/B978-0-12-813266-1.00006-1.

38. Lakard B. Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. *Applied Sciences*. 2020;10(18):6614. DOI: 10.3390/app10186614.
39. Shaukat H., Ali A., Bibi S., Altabey W. A., Noori M., Kouritem S. A. A Review of the Recent Advances in Piezoelectric Materials, Energy Harvester Structures, and Their Applications in Analytical Chemistry. *Applied Sciences*. 2023;13(3):1300. DOI: 10.3390/app13031300.
40. Naal Z., Naal R. M. Z. G. Quartz Crystal Microbalance in Bioanalysis. In: Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry. New York: Springer; 2021. P. 313–330. DOI: 10.1007/978-3-030-82381-8_17.
41. Wei Z., Rolle M. W., Camesano T. A. LL37 and collagen-binding domain-mediated LL37 binding with type I collagen: Quantification via QCM-D. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2022;220:112852. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112852.
42. Bonyadi F., Kavruk M., Ucak S., Cetin B., Bayramoglu G., Dursun A. D., Arica Y., Ozalp V. C. Real-Time Biosensing Bacteria and Virus with Quartz Crystal Microbalance: Recent Advances, Opportunities, and Challenges. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2023;1–12. DOI: 10.1080/10408347.2023.2211164.
43. Jandas P. J., Prabakaran K., Luo J., MG D. H. Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2021;331:113020. DOI: 10.1016/j.sna.2021.113020.
44. Andryukov B. G., Besednova N. N., Romashko R. V., Zaporozhets T. S., Efimov T. A. Label-free biosensors for laboratory-based diagnostics of infections: Current achievements and new trends. *Biosensors*. 2020;10(2):11. DOI: 10.3390/bios10020011.
45. Ermolaeva T. N., Kalmykova E. N., Shashkanova O. Yu. Piezoquartz biosensors for the analysis of environmental objects, food products and for clinical diagnostics. *Rossijskij himicheskij zhurnal*. 2008;LII(2):17–29. (In Russ.)
46. Wasilewski T., Szulczyński B., Dobrzyniewski D., Jakubaszek W., Gębicki J., Kamysz W. Development and Assessment of Regeneration Methods for Peptide-Based QCM Biosensors in VOCs Analysis Applications. *Biosensors*. 2022;12(5):309. DOI: 10.3390/bios12050309.
47. Dubiel A E., Fülöp T., Vigier S., Vermette P. Quartz crystal microbalance as an assay to detect anti-drug antibodies for the immunogenicity assessment of therapeutic biologics. *Analytical and biological chemistry*. 2017;409(30):7153–7167. DOI: 10.1007/s00216-017-0674-2.
48. Gavrilov V. A., Tikhonov I. V., Smirnova E. A., Zabolotskaya T. V. Manufacturing technology and application of modern immunodiagnostic methods. Moscow: MGAVMiB im. K. I. Scriabin; 2013. 42 p. (In Russ.)
49. Pirinçci S., Ertekin Ö., Laguna D., Özen F., Öztürk Z., Öztürk S. Label-Free QCM Immunosensor for the Detection of Ochratoxin A. *Sensors (Basel)*. 2018;18(4):1161. DOI: 10.3390/s18041161.
50. Goode J. A., Rushworth J. V. H., Millner P. A. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*. 2015;31(23):6267–6276. DOI: 10.1021/la503533g.
51. Jin Y., Huang Y., Liu G., Zhao R. Gold nanoparticle-sensitized quartz crystal microbalance sensor for rapid and highly selective determination of Cu(II) ions. *The Analyst*. 2013;138(18):5479–5485. DOI: 10.1039/c3an00948c.
52. Bereli N., Çimen D., Hüseynli S., Denizli A. Detection of amoxicillin residues in egg extract with a molecularly imprinted polymer on gold microchip using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance methods. *Journal of food science*. 2020;85(12):4152–4160. DOI: 10.1111/1750-3841.15529.
53. Pei Y., McEleney K., Payne S. J., She Z. Incorporating quartz crystal microbalance with chronoamperometry to enhance manganese detection stability in drinking water. *Electrochimica Acta*. 2023;447:142156. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142156.
54. Saffari Z., Sepahi M., Ahangari-Cohan R., Khoobi M., Hamidi-Fard M., Ghavidel A., Aghasadeghi M. R., Norouzian D. A quartz crystal microbalance biosensor based on polyethylenimine-modified gold electrode to detect hepatitis B biomarker. *Analytical Biochemistry*. 2023;661:114981. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114981.
55. Wang L., Wu C., Hu Z., Zhang Y., Li R., Wang P. Sensing Escherichia coli O157:H7 via frequency shift through a self-assembled monolayer based QCM immunosensor. *Journal of Zhejiang University – Science B*. 2008;9:121–131. DOI: 10.1631/jzus.B0710307.
56. Salmain M., Ghasemi M., Boujday S., Pradier C.-M. Elaboration of a reusable immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin A (SEA) in milk with a quartz crystal microbalance. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012;173:148–156. DOI: 10.1016/j.snb.2012.06.052.
57. Hong S., Jeong H., Hong S. QCM DNA biosensor for the diagnosis of a fish pathogenic virus VHSV. *Talanta*. 2010;82;899–903. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.04.065.
58. Park I.-S., Kim W.-Y., Kim N. Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting Salmonella spp. *Biosensors and Bioelectronics*. 2000;15:167–172. DOI: 10.1016/s0956-5663(00)00053-1.
59. Li F., Dong Y., Zhang Z., Lv M., Wang Z., Ruan X., Yang D. A recyclable biointerface based on cross-linked branched DNA nanostructures for ultrasensitive nucleic acid detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;117:562–566. DOI: 10.1016/j.bios.2018.06.053.
60. Yao C., Qi Y., Zhao Y., Xiang Y., Chen Q., Fu W. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(8):2499–2503. DOI: 10.1016/j.bios.2008.12.036.
61. Lino C., Barrias S., Chaves R., Adega F., Fernandes J., Martins-Lopes P. Development of a QCM-based biosensor for the detection of non-small cell lung cancer biomarkers in liquid biopsies. *Talanta*. 2023;260:124624. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124624.
62. Naberezhnykh G. A., Gorbach V. I., Kalmykova E. N., Solov'eva T. F. Determination of the parameters of binding between lipopolysaccharide and chitosan and its N-acetylated derivative using a gravimetric piezoquartz biosensor. *Biophysical Chemistry*. 2015;198:9–13. DOI: 10.1016/j.bpc.2015.01.003.
63. Wang D., Chen G., Wang H., Tang W., Pan W., Li N., Liu F. A reusable quartz crystal microbalance biosensor for highly specific detection of single-base DNA mutation. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;48:276–280. DOI: 10.1016/j.bios.2013.04.035.
64. Karaseva N., Ermolaeva T. A regenerable piezoelectric immunosensor on the basisof electropolymerized polypyrrole for highly selective detectionof Staphylococcal Enterotoxin A in foodstuffs. *Microchimica Acta*. 2015;182:1329–1335. DOI: 10.1007/s00604-015-1456-1.
65. Vasilev S. V., Popova M. V., Farafonova O. V., Karaseva N. A., Ermolaeva T. N. The formation of the piezoelectric immunosensor's receptor layer for the detection of trace concentrations of ractopamine. *Modern problems of science and education*. 2014;1. (In Russ.)
66. Ye J., Zhang Y., Meng J. Protein–Ligand interactions for hydrophobic charge-induction chromatography: A QCM-D study. *Applied Surface Science*. 2022;572:151420. DOI: 10.1016/j.apsusc.2021.151420.
67. Kalmykova E. N., Garbuzova A. V., Ermolaeva T. N., Zubova N. Yu. Application of sulfated polysaccharides to activate electrodes of a piezoquartz immunosensor. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2007;1:43–48. (In Russ.)
68. Cervera-Chiner L., Juan-Borrás M., March C., Arnau A., Escriche I., Montoya A., Jiménez Y. High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey. *Food Control*. 2018;92:1–6. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.04.026.
69. Bhalla V., Carrara S., Stagni C., Samorì B. Chip cleaning and regeneration for electrochemical sensor arrays. *Thin Solid Films*. 2010;518(12):3360–3366. DOI: 10.1016/j.tsf.2009.10.022.
70. Han J., Zhang J., Xia Y., Li S., Jiang L. An immunoassay in which magnetic beads act both as collectors and sensitive amplifiers for detecting antigens in a microfluidic chip (MFC)–quartz crystal microbalance (QCM) system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011;1–3:2–9. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.11.066.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1623
УДК 615.074: 615.322

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

ВЭЖХ-УФ-анализ гликозидов флавоноидов в траве *Astragalus* (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*), произрастающих на территории Поволжья

У. А. Матвиенко[1]✉, Н. А. Дурнова[1, 2], А. М. Полуянов[2], Н. В. Бобкова[2], Г. В. Раменская[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ имени В. И. Разумовского» Минздрава России). 410012, Россия, Саратовская область, г. Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112
[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:** Матвиенко Ульяна Андреевна. **E-mail:** matvienko.ulia2104@gmail.com

ORCID: У. А. Матвиенко – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165; Н. А. Дурнова – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519;
А. М. Полуянов – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; Н. В. Бобкова – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019;
Г. В. Раменская – https://orcid.org/0000-0001-8779-3573.

Статья поступила: 25.10.2023 **Статья принята в печать:** 01.02.2024 **Статья опубликована:** 02.02.2024

Резюме

Введение. Поиск новых перспективных источников биологически активных веществ является одной из задач современной фармакогнозии. Среди огромного разнообразия видов рода *Astragalus* L. изучены лишь некоторые из них. Кроме этого, ни один из них не включен в актуальное издание Государственной фармакопеи РФ. На наш взгляд, интерес представляет исследование четырех видов этого рода (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*), произрастающих на территории Поволжья.

Цель. Исследование гликозидного состава флавоноидов травы астрагалов четырех видов (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*) методом ВЭЖХ-УФ с использованием внешних стандартов.

Материалы и методы. Материалом служили образцы травы астрагалов (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*), заготовленные на территории Саратовской области в соответствии с основными правилами сбора и заготовки и высушенные до воздушно-сухого состояния. Анализу подвергались водно-спиртовые извлечения (1 : 50). Качественный и количественный анализ гликозидов флавоноидов проводили на хроматографе Agilent 1260 (Agilent Technologies, США), снабженном диодно-матричным детектором, ручным вводом проб (ручной инжектор Agilent G1328C, Agilent Technologies США) и системой для сбора и обработки хроматографических данных Agilent Open Lab CDS. Градиент элюирования был подобран индивидуально с использованием в качестве растворителей 0,1%-го раствора ортофосфорной кислоты / ацетонитрила. Соединения идентифицировали по временам удерживания и УФ-спектрам стандартных образцов (СО). Количественное содержание каждого обнаруженного компонента выражали в мг/г сухого сырья. Все исследования были повторены пятикратно, результаты статистически обработаны с помощью MS Excel 2010.

Результаты и обсуждение. Исследованы хроматографические профили водно-спиртовых извлечений из травы четырех видов астрагалов. Обнаружены отличия как в качественном составе, так и в количественном содержании флавоноидных гликозидов в траве анализируемых видов. Наибольшее число соединений обнаружено в траве *A. varius* (6 соединений), в траве *A. dasyanthus* и *A. henningii* идентифицировано 4 соединения, а в траве *A. testiculatus* – 3 соединения. Доминирующими компонентами в траве *A. henningii* являются ориентин и рутин, в траве *A. testiculatus* и *A. varius* – цинарозид, а у *A. dasyanthus* – рутин.

Заключение. Была разработана методика ВЭЖХ-УФ-определения количественного содержания флавоноидных гликозидов в извлечениях из травы четырех видов астрагалов (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*) и изучены хроматографические профили анализируемых образцов.

Ключевые слова: трава, *A. henningii*, *A. testiculatus*, *A. varius*, *A. dasyanthus*, водно-спиртовые извлечения, ВЭЖХ-УФ, гликозиды флавоноидов

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

Вклад авторов. У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова, Н. В. Бобкова, Г. В. Раменская планирование эксперимента. У. А. Матвиенко, А. М. Полуянов осуществляли проведение экспериментальных исследований. У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова, А. М. Полуянов, Н. В. Бобкова, Г. В. Раменская участвовали в написании текста статьи, в том числе заключения и обсуждения результатов.

Для цитирования: Матвиенко У. А., Дурнова Н. А., Полуянов А. М., Бобкова Н. В., Раменская Г. В. ВЭЖХ-УФ-анализ гликозидов флавоноидов в траве *Astragalus* (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*), произрастающих на территории поволжья. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):139–148. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1623

HPLC-UV Analysis of Flavonoid Glycosides in the Herb of *Astragalus* (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*), Growing in the Volga Region

Uliana A. Matvienko[1]✉, Natalya A. Durnova[1, 2], Andrey M. Poluyanov[2], Natalya V. Bobkova[2], Galina V. Ramenskaya[2]

[1] Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky (Razumovsky University). 112, st. B. Kazachya, Saratov, Saratov region, 410012, Russia
[2] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Uliana A. Matvienko. **E-mail:** matvienko.ulia2104@gmail.com

© Матвиенко У. А., Дурнова Н. А., Полуянов А. М., Бобкова Н. В., Раменская Г. В., 2024
© Matvienko U. A., Durnova N. A., Poluyanov A. M., Bobkova N. V., Ramenskaya G. V., 2024

ORCID: Uliana A. Matvienko – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165; Natalya A. Durnova – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519; Andrey M. Poluyanov – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; Natalya V. Bobkova – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019; Galina V. Ramenskaya – https://orcid.org/0000-0001-8779-3573.

Received: 25.10.2023 **Revised:** 01.02.2024 **Published:** 02.02.2024

Abstract

Introduction. The search for new promising sources of biologically active substances is one of the tasks of modern pharmacognosy. Among the huge variety of species of the genus *Astragalus* L., only a few of them have been studied. In addition, none of them is included in the current edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. In our opinion, the study of four species of this genus of *Astragalus* L. (*A. dasyanthus*, *A. varius*, *A. testiculatus*, *A. henningii*) growing in the Volga region is of interest.

Aim. Study of the glycoside composition of flavonoids in the astragalus herb of four species (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*) by HPLC-UV using external standards.

Materials and methods. The material was samples of astragalus grass (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. henningii*), collected on the territory of the Saratov region in accordance with the basic rules of collection and preparation and dried to an air-dry state. Aqueous-alcoholic extracts (1 : 50) were analyzed. Qualitative and quantitative analysis of flavonoid glycosides was carried out on an Agilent 1260 chromatograph (Agilent Technologies, USA) equipped with a diode array detector, manual sample injection (Agilent G1328C manual injector, Agilent Technologies USA) and an Agilent Open Lab CDS system for collecting and processing chromatographic data. The elution gradient was selected individually using 0.1 % phosphoric acid/acetonitrile solution as solvents. Compounds were identified by retention times and UV spectra of reference standards (RS). The quantitative content of each detected component was expressed in mg/g of dry raw material. All studies were repeated five times, the results were statistically processed using MS Excel 2010.

Results and discussion. The chromatographic profiles of aqueous-alcoholic extracts from the herbs of four types of astragalus were studied. Differences were found in both the qualitative composition and quantitative content of flavonoid glycosides in the grass of the analyzed species. The largest number of compounds was found in the herb of *A. varius* (6 compounds), 4 compounds were identified in the herb of *A. dasyanthus* and *A. henningii*, and 3 compounds were identified in the herb of *A. testiculatus*. The dominant components in the herb of *A. henningii* are orientin and rutin, in the herb of *A. testiculatus* and *A. varius* it is cynaroside, and in *A. dasyanthus* it is rutin.

Conclusion. A HPLC-UV method was developed for determining the quantitative content of flavonoid glycosides in extracts from the herbs of four species of astragalus (*A. dasyanthus, A. varius, A. testiculatus, A. hen*ningii) and the chromatographic profiles of the analyzed samples were studied.

Keywords: herba, *A. henningii*, *A. testiculatus*, *A. varius*, *A. dasyanthus*, hydro-alcoholic extracts, HPLC/UV, flavonoid glycoside

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

Contribution of the authors. Uliana A. Matvienko, Natalya A. Durnova, Natalya V. Bobkova, Galina V. Ramenskaya planning of the experiment. Uliana A. Matvienko, Andrey M. Poluyanov carried out experimental studies. Uliana A. Matvienko, Natalya A. Durnova, Andrey M. Poluyanov, Natalya V. Bobkova, Galina V. Ramenskaya participated in writing the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

For citation: Matvienko U. A., Durnova N. A., Poluyanov A. M., Bobkova N. V., Ramenskaya G. V. HPLC-UV analysis of flavonoid glycosides in the herb of *Astragalus* (*A. dasyanthus*, *A. varius*, *A. testiculatus*, *A. henningii*), growing in the volga region. *Drug development & registration*. 2024;13(1):139–148. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1623

ВВЕДЕНИЕ

Растения рода *Astragalus* L. имеют значительный опыт применения в народной медицине многих стран мира. В настоящее время насчитывается около 3000 видов, большинство из которых встречается в центральных и юго-западных районах Азии [1], однако только один представитель – астрагал перепончатый входит в перечень официнального растительного сырья Китая и применяется как иммуномодулирующее и адаптогенное средство. В Российской Федерации (РФ) как биологически активная добавка к пище реализуется трава астрагала шерстистоцветкового. В перечень фармакопейного растительного сырья ни один из видов астрагала не включен. Многочисленные исследования растений рода *Astragalus* L. свидетельствуют о высоком интересе к его представителям как к источникам биологически активных веществ [2]. Установлено, что представители данного рода имеют богатый фитохимический профиль, который представлен полифенольными соединениями, тритерпеновыми соединениями, органическими кислотами, микро- и макроэлементами [2–4]. В экспериментах была показана антиоксидантная, противоопухолевая, антибактериальная, противовирусная, нейропротекторная, тонизирующая активность экстрактов или отдельно изолированных компонентов из различных частей растений *Astragalus* L. [5–11].

Большая часть представителей многочисленного рода остаются неизученными, что представляет интерес для исследований. На наш взгляд, перспективным является исследование других видов, например астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.), а. изменчивого (*A. varius* S.G.Gmel.), а. яйцеплодного (*A. testiculatus* Pall.), а. Хеннинга (*A. henningii* (Stev.) Klok.), массово произрастающих

на территории Поволжья. Фитохимические исследования подтвердили наличие в надземной части этих растений флавоноидов, аминокислот, танинов, сапонинов [12–13]. Настои и водно-этанольные экстракты, полученные из травы, показали антиоксидантную, антимикробную активность [14], а также низкую токсичность в экспериментах *in vivo* [15].

Одной из ведущих групп биологически активных соединений (БАС) *Astragalus* L. являются флавоноиды, обладающие плейотропной фармакологической активностью [6]. Методом ВЭЖХ-УФ были исследованы гидролизаты водно-этанольных извлечений: лютеолин, кверцетин и апигенин обнаружены в гидролизатах *A. henningii, A. testiculatus, A. varius*, изорамнетин и кемпферол обнаружены в *A. henningii* и *A. varius* [13]. В более ранних исследованиях сообщается о наличии кверцетина, кемпферола в траве *A. varius* и *A. dasyanthus* и изорамнетина в траве *A. dasyanthus* [2].

Данные по гликозидному составу также немногочисленные. Известно о содержании в траве *A. varius* астрагалина, нарциссина, популина, изорамнетин-3-O-b-D-глюкопиранозида, изокверцитрина [3], в траве *A. dasyanthus* – нарциссина, гиперозида [3], в траве *A. testiculatus* – астрагалина. Данные о гликозидах флавоноидов травы *A. henningii* не найдены.

Ввиду отсутствия актуальных данных о гликозидах флавоноидов в траве вышепредставленных видов актуальным является исследование флавоноидов современными физико-химическими методами с целью обоснования перспективности видов для дальнейших исследований.

В связи с этим цель данного исследования – идентификация и количественное определение флавоноидных гликозидов в водно-спиртовых извлечениях из травы астрагала (а. шерстистоцветкового, а. изменчивого, а. яйцеплодного и а. Хеннинга) с помощью жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-УФ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись образцы травы астрагала шерстистоцветкового, а. изменчивого, а. яйцеплодного, а. Хеннинга, заготовленные на территории Саратовской области в 2022 г. в период массового цветения и высушенные воздушно-теневым способом до остаточной влажности не более 13 %.

Пробоподготовку материала осуществляли путем экстрагирования травы четырех видов астрагала 70%-м этиловым спиртом в соотношении сырье : экстрагент (1 : 50) на водяной бане, снабженной обратным холодильником, в течение 1 часа. Полученные извлечения фильтровали (красная лента) и подвергали хроматографическому анализу.

Качественный и количественный анализ гликозидов флавоноидов проводили на хроматографе Agilent 1260 (Agilent Technologies, США), снабженном диодно-матричным детектором, ручным вводом проб (ручной инжектор Agilent G1328C, Agilent Technologies, США) и системой для сбора и обработки хроматографических данных Agilent Open Lab CDS.

Условия хроматографирования и детектирования. Хроматографическая колонка: Grace HPLC Column Platinum C8-EPS, 250 × 4.6 mm, 5 mm (Grace, США). Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges Widepore C18, 4 × 3,0 мм. Температура термостата: 27 °C. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор ортофосфорной кислоты в воде (по объему) (элюент А); ацетонитрил (по объему) (элюент В). Скорость потока подвижной фазы: 0,5 мл/мин. Градиент состава подвижной фазы представлен на рисунке 1. Объем вводимой пробы: 10 мкл. Время регистрации хроматограммы: 0,0–36,0 мин. Детектирование: УФ-детектор при 365 ± 2 нм.

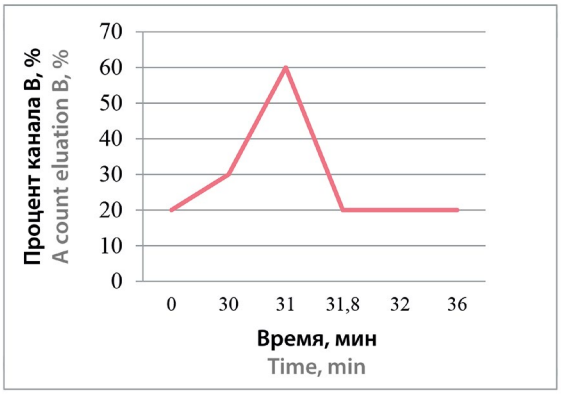


Рисунок 1. Градиентный режим элюирования

Figure 1. Gradient elution scheme

В качестве внешних стандартов использовали СО: **orientin** (99,63 %, HWI group, Германия, номер партии HWI01801-3, годен до 09.2023 г.); **luteolin 7-glucoside** (≥98,00 %, Sigma-Aldrich, США, номер партии BCBZ9156, CAS № 5373-11-5, годен до 06.2023 г.); **isoquercitrine** (98,94 %, HWI group, Германия, номер партии HWI02139-1, годен до 04.2023 г.); **rutin** (97,21 %, PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия, номер партии 66853802, годен до 09.2023 г.); **hyperoside** (98,90 %, HWI group, Германия, номер партии HWI02328, годен до 04.2023 г.); **isovitexin** (99,10 %, HWI group, Германия, номер партии HWI02131-1, годен до 06.2023 г.); **apigenin-7-glucoside** (95,50 %, Sigma-Aldrich, США, номер партии LRAC2234, CAS № 578-74-5, годен до 09.2023 г.); **izorhamnetin 3-rutinoside** (99,59 %, PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия, номер партии 95324886, годен до 12.2023 г.); **kaempferol 3-β-D-glucopyranoside** (98,60 %, Sigma-Aldrich, США, номер партии BCBZ1711, CAS № 480-10-4, годен до 08.2022 г.). Растворы СО готовили в этиловом спирте 96%-м в концентрации 0,01 мг/мл.

Хроматографирование каждого испытуемого раствора проводили 5 раз. Растворы СО также хроматографировали по 5 раз и вычисляли среднее значение площади пика для каждого СО.

Идентификацию пиков на хроматограмме анализируемого раствора проводили по времени удерживания в сравнении с хроматограммами растворов СО ориентина, изокверцитрина, рутина, изовитексина, гиперозида, цинарозида, нарциссина, космосиина и астрагалина соответственно.

Контролировали параметры пригодности хроматографической системы по хроматограммам растворов СО (таблица 1).

Таблица 1. Параметры пригодности хроматографической системы

Table 1. Chromatographic system suitability parameters

Соединение Compound	Время удерживания, мин Retention time, min	Разрешение Resolution	Количество теоретических тарелок Number theoretical plates	Коэффициент симметрии Symmetry factor
Ориентин Orientin	11.081	0,00	4650	1,10
Цинарозид Cynaroside	19.541	1,01	6321	1,10
Изокверцитрин Isoquercitrine	13.432	3,21	4890	1,08
Рутин Rutin	14.245	1,10	6875	1,12
Гиперозид Hyperoside	15.271	1,46	2845	0,91
Нарциссин Narcissin	19.110	2,99	4950	1,11
Астрагалин Astragalin	20.304	1,02	4585	1,01

Статистическую обработку результатов количественного определения выполняли в MS Excel 2010 ($n = 5$, $f = 4$, $P = 95$ %, $T(f, P) = 2{,}7764$). Количественное содержание каждого соединения выражали в мг/г воздушно-сухого сырья.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

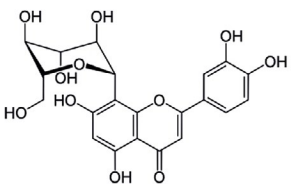
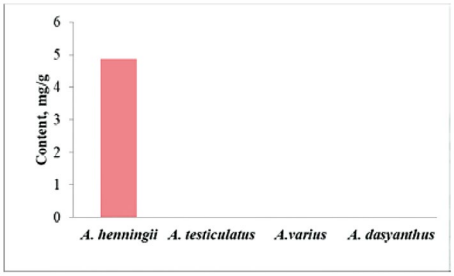
Условия хроматографического разделения некоторых гликозидов флавоноидов (таблица 2) были подобраны экспериментально ввиду особенностей физико-химических свойств флавоноидных гликозидов (близкие значения log P). Для идентификации использовали наиболее селективную длину волны для флавоноидов – 365 нм [16].

Хроматографические профили четырех анализируемых видов имеют различный вид. Наибольшее число соединений, найденное в рамках данного исследования, обнаружено в траве а. изменчивого (6 соединений), в траве а. шерстистоцветкового и а. Хеннинга идентифицировано 4 соединения, а в траве а. яйцеплодного – 3 соединения (рисунок 2).

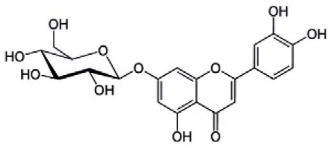
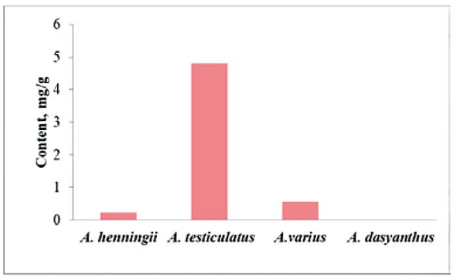
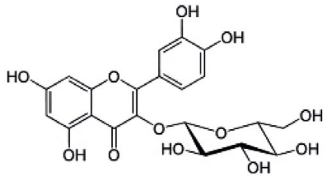
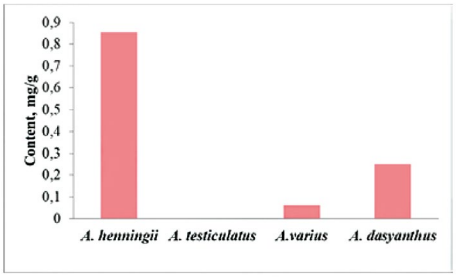
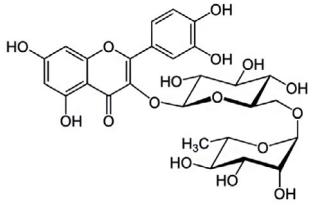
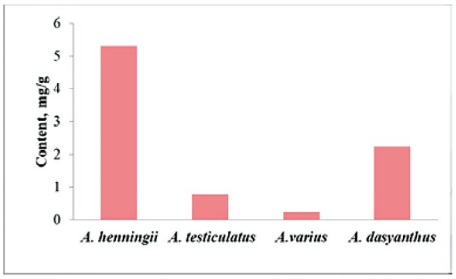
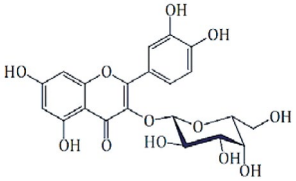
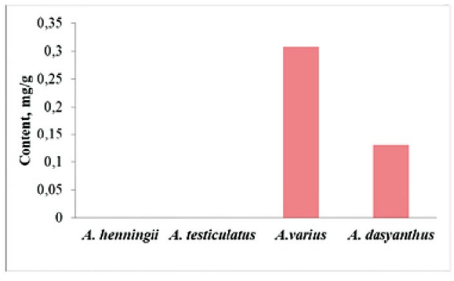
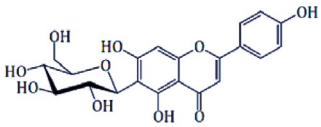
Ранее в гидролизатах извлечений из травы а. Хеннинга и а. изменчивого были найдены лютеолин, кверцетин, апигенин, кемпферол и изорамнетин [13]. В водно-спиртовом извлечении из травы а. Хеннинга впервые обнаружены гликозиды лютеолина (ориентин и цинарозид) и кверцетина (изокверцитрин и рутин). В водно-спиртовом извлечении из травы а. изменчивого обнаружены гликозиды лютеолина (цинарозид), кверцетина (изокверцитрин, рутин, гиперозид), кемпферола (астрагалин), изорамнетина (нарциссин). Причем обнаруженные изокверцитрин, нарциссин и астрагалин согласуются с данными, полученными ранее [3].

Таблица 2. Физико-химические свойства анализируемых веществ

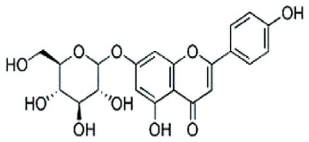
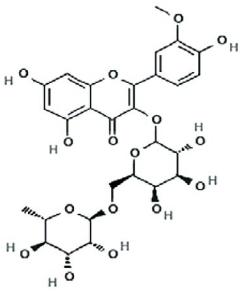
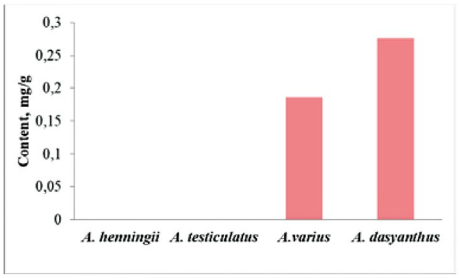
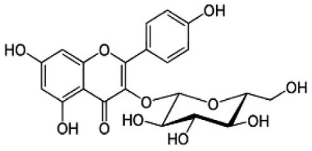
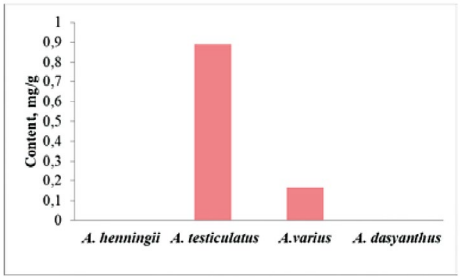
Table 2. Physical and chemical properties of the analyzed substances

Соединение Compound	Время удерживания, мин Retention time, min	Структурная формула Structural formula	Содержание, мг/г The content, mg/g
Ориентин (лютеолин-8-глюкозид) Orientin (luteolin-8-glucoside)	11.081		

Продолжение таблицы 2

Соединение Compound	**Время удерживания, мин** Retention time, min	**Структурная формула** Structural formula	**Содержание, мг/г** The content, mg/g
Цинарозид (лютеолин-7-глюкозид) Cynaroside (luteolin 7-glucoside)	19.541		
Изокверцитрин (кверцетин 3-О-бета-D-глюкофуранозид) Isoquercitrine (quercetin 3-O-beta-D-glucofuranoside)	13.432		
Рутин (кверцетин 3-рутинозид) Rutin (quercetin 3-rutinoside)	14.245		
Гиперозид (кверцетин-3-О-галактозид) Hyperoside (quercetin-3-O-galactoside)	15.271		
Изовитексин (апигенин-6-С-глюкозид) Isovitexin (apigenin-6-C-glucoside)	15.189		Не найден Not found

Окончание таблицы 2

Соединение Compound	**Время удерживания, мин** Retention time, min	**Структурная формула** Structural formula	**Содержание, мг/г** The content, mg/g
Космосиин (апгенин-7-G-глюкозид) Cosmosiin (apgenin-7-G-glucoside)	20.013		Не найден Not found
Нарциссин (изорамнетин 3-рутинозид) Narcissin (izorhamnetin 3-rutinoside)	19.110		
Астрагалин (кемпферол 3-β-D-глюкопиранозид) Astragalin (kaempferol 3-β-D-glucopyranoside)	20.304		

В гидролизате извлечения из травы а. яйцеплодного ранее найдены лютеолин, кверцетин, апигенин [13]. Из гликозидов лютеолина обнаружен цинарозид, из гликозидов кверцетина найден рутин, а также найден астрагалин. Гликозидов апигенина найти не удалось, возможно, он содержится только в виде агликона. Найденный астрагалин согласуется с данными, полученными ранее [3].

Анализ гидролизата водно-спиртового извлечения из травы а. шерстистоцветкового не дал репрезентативных результатов [13]. Однако найдены гликозиды кверцетина (изокверцитрин, рутин, гиперозид) и изорамнетина (нарциссин). Обнаруженные гиперозид и нарциссин согласуются с данными, представленными ранее [3].

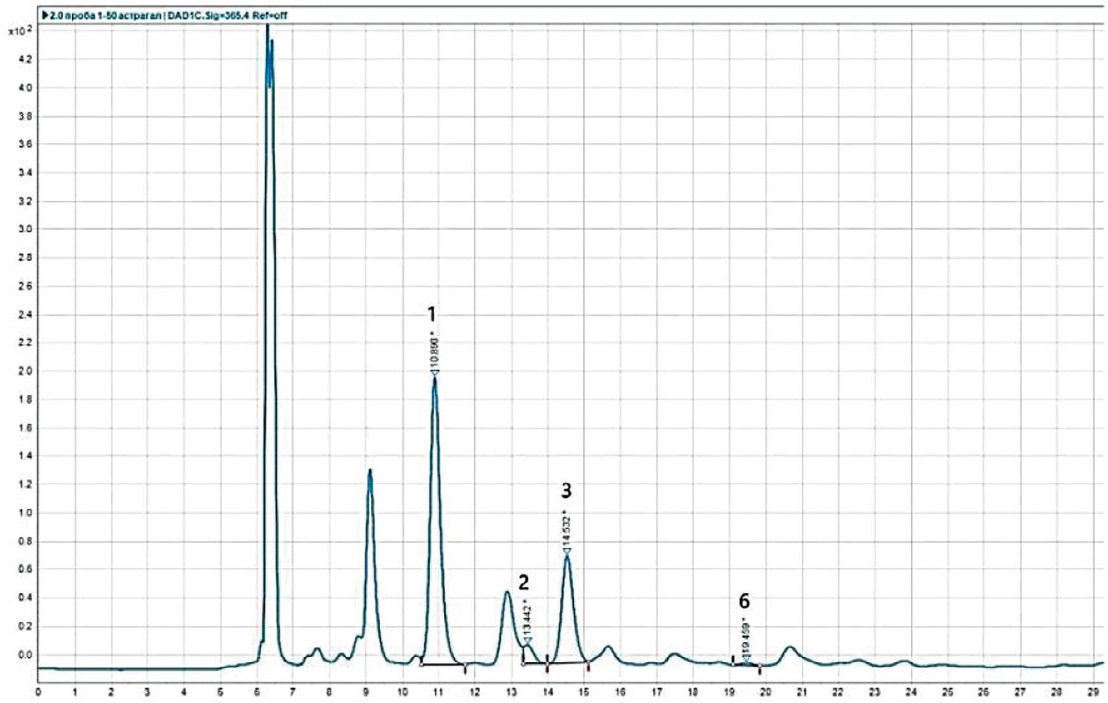
Результаты статистической обработки проведенных измерений показывают, что относительная ошибка единичного определения при доверительной вероятности 0,95 не превышает ±2,97 % (таблица 3).

Для всех исследуемых объектов рассчитаны значения количественного содержания идентифицированных гликозидов флавоноидов в мг/г сырья, которые представлены в таблице 3.

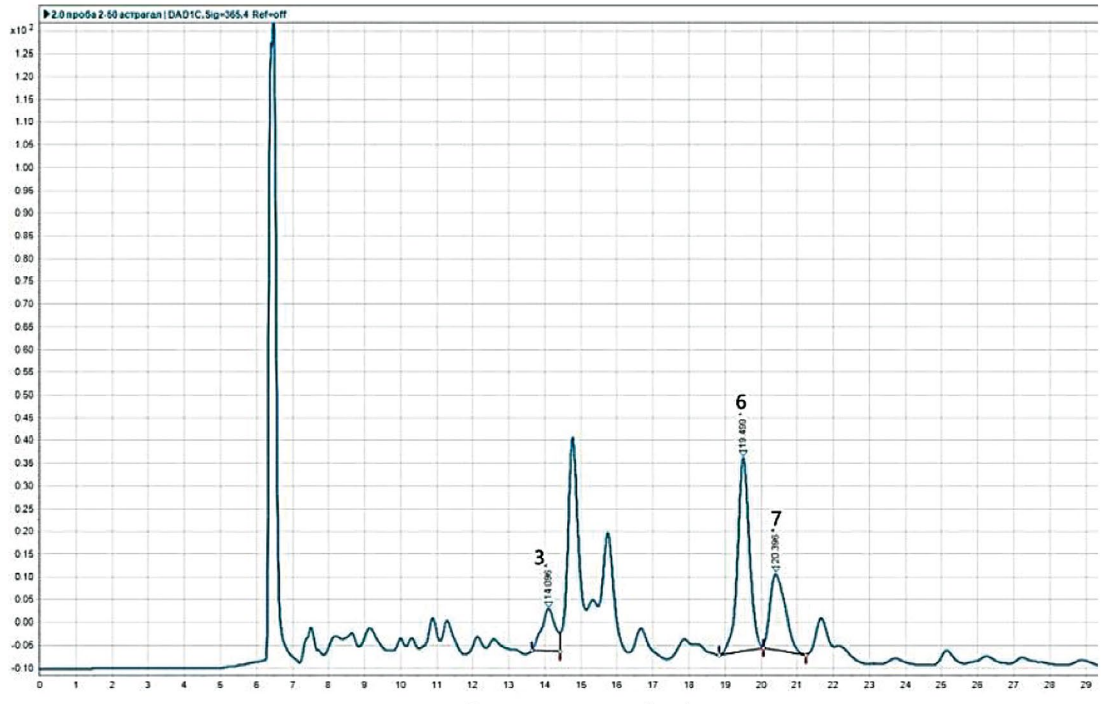
Как видно из представленных данных, в траве а. Хеннинга мажорными обнаруженными соединениями являются ориентин и рутин, в траве а. яйцеплодного и а. изменчивого – цинарозид, в траве а. шерстистоцветкового – рутин. А. Хеннинга превосходит всех по содержанию рутина и изокверцитрина. Содержание цинарозида у а. яйцеплодного практически в 8 раз выше, чем у а. изменчивого и в 21 раз выше чем у а. Хеннинга. Содержание астрагалина у а. яйцеплодного выше в 5 раз, чем у а. изменчивого.

По суммарному содержанию найденных гликозидов наибольшее содержание наблюдается в траве а. Хеннинга (1,13 %), а наименьшее – в траве а. изменчивого (0,15 %) (рисунок 3).

Анализ хроматографических профилей выявил различия как в качественном составе гликозидов флавоноидов, так и в количественном содержании идентифицированных компонентов в траве четырех видов рода *Astragalus* L., что обуславливает различные фармакологические эффекты извлечений из анализируемых объектов. Кроме того, подобранные условия хроматографического анализа могут использоваться для стандартизации данных видов растительного сырья.



А
A



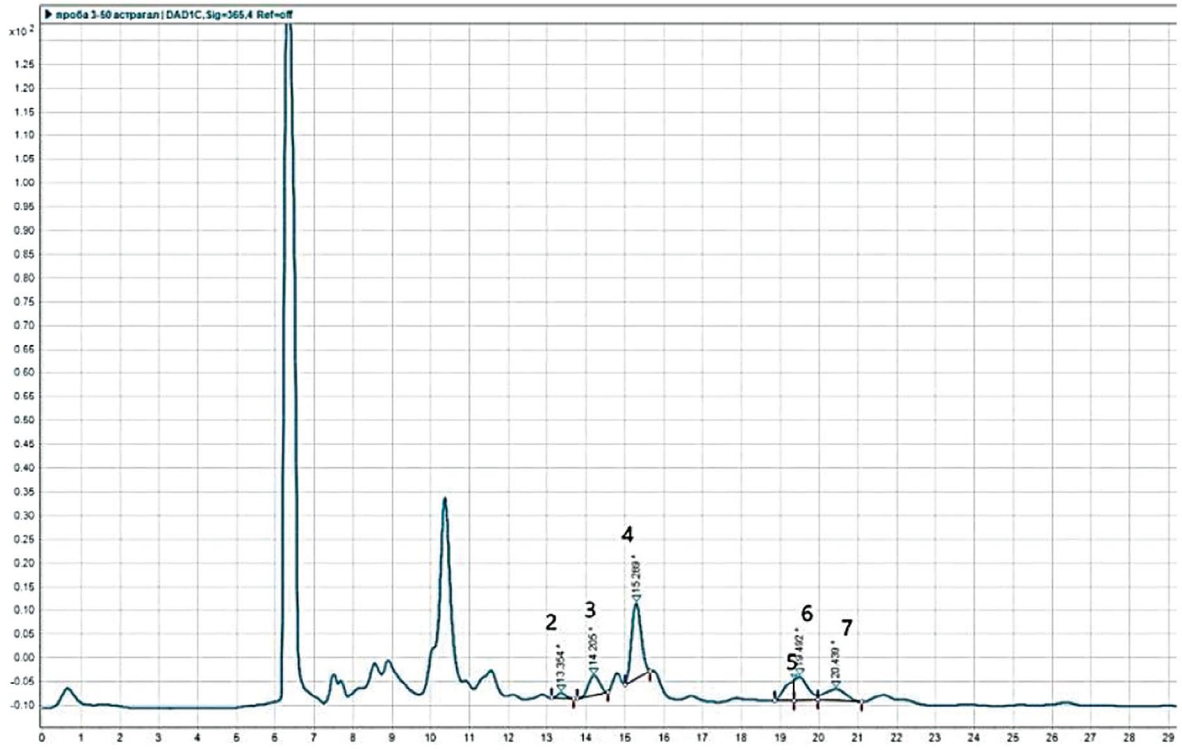
Б
B

Рисунок 2. **Хроматограммы водно-спиртовых извлечений из травы:**

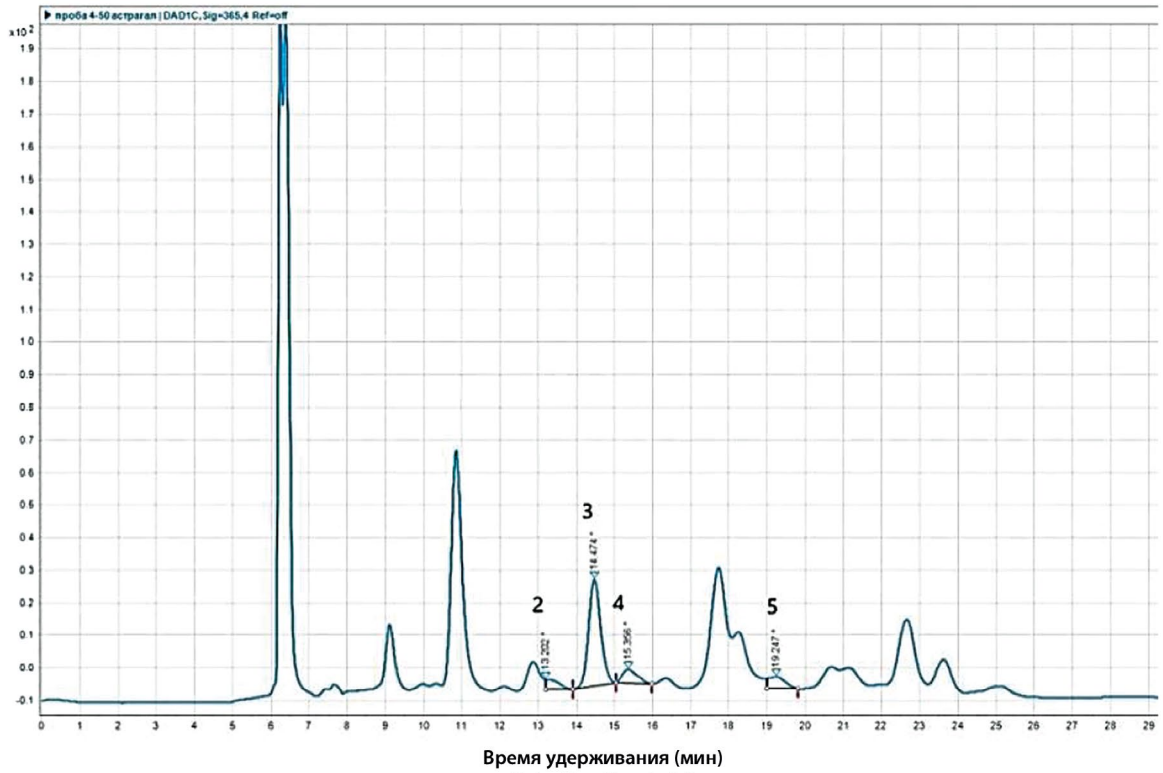
А – *A. henningii*; Б – *A. testiculatus*; В – *A. varius*; Г – *A. dasyanthus*. 1 – ориентин; 2 – изокверцитрин; 3 – рутин; 4 – гиперозид; 5 – нарциссин; 6 – цинарозид; 7 – астрагалин

Figure 2. **Chromatograms of water-alcohol extracts from of herb:**

A – *A. henningii*; B – *A. testiculatus*; C – *A. varius*; D – *A. dasyanthus*. 1 – orientin; 2 – isoquercitrin; 3 – rutin; 4 – hyperoside; 5 – narcissin; 6 – cynaroside; 7 – astragalin



В
C



Г
D

Продолжение рисунка 2

Continuation of Figure 2

Таблица 3. Метрологические характеристики методики количественного определения гликозидов флавоноидов в водно-спиртовых извлечениях из травы четырех видов астрагала, мг/г сырья (n = 5, f = 4, P = 95 %, $T(f, P)$ = 2,7764)

Table 3. Metrological characteristics of the method for the quantitative determination of flavonoid glycosides in aqueous-alcoholic extracts from the herb of four types of astragalus, mg/g of raw material (n = 5, f = 4, P = 95 %, $T(f, P)$ = 2.7764)

Вид Specie	Соединение Compound	$\bar{X}$, мг/г $\bar{X}$, mg/g	S_x^2	S_x	$S_{\bar{x}}$	ΔX	ε, %
А. Хеннинга A. henningii	Ориентин Orientin	4,874	0,0000063	0,0025	0,0015	0,006	0,13
	Изокверцитрин Isoquercitrine	0,855	0,0000140	0,0037	0,0022	0,009	1,09
	Рутин Rutin	5,312	0,0000060	0,0024	0,0014	0,006	0,11
	Цинарозид Cynaroside	0,222	0,0000025	0,0016	0,0009	0,004	1,78
А. яйцеплодный A. testiculatus	Рутин Rutin	0,771	0,0000051	0,0023	0,0013	0,006	0,72
	Цинарозид Cynaroside	4,793	0,0000031	0,0018	0,0010	0,004	0,11
	Астрагалин Astragalin	0,888	0,0000107	0,0033	0,0019	0,008	0,91
А. изменчивый A. varius	Изокверцитрин Isoquercitrine	0,062	0,0000004	0,0006	0,0004	0,002	2,53
	Рутин Rutin	0,247	0,0000044	0,0021	0,0012	0,005	2,12
	Гиперозид Hyperoside	0,308	0,0000001	0,0004	0,0002	0,001	0,29
	Нарциссин Narcissin	0,187	0,0000019	0,0014	0,0008	0,003	1,85
	Цинарозид Cynaroside	0,573	0,0000063	0,0025	0,0015	0,006	1,09
	Астрагалин Astragalin	0,167	0,0000040	0,0020	0,0012	0,005	2,97
А. шерстистоцветковый A. dasyanthus	Изокверцитрин Isoquercitrine	0,250	0,0000004	0,0006	0,0004	0,002	0,64
	Рутин Rutin	2,248	0,0000015	0,0012	0,0007	0,003	0,13
	Гиперозид Hyperoside	0,131	0,0000003	0,0005	0,0003	0,001	0,96
	Нарциссин Narcissin	0,276	0,0000024	0,0015	0,0009	0,004	1,39

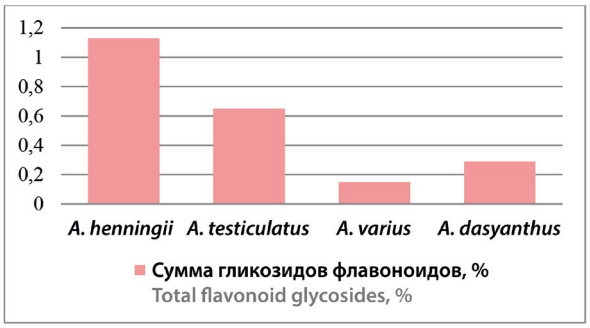


Рисунок 3. Суммарное содержание найденных гликозидов флавоноидов, %

Figure 3. Total content of detected flavonoid glycosides, %

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были подобраны оптимальные условия хроматографического анализа гликозидов флавоноидов в водно-спиртовых извлечениях из травы четырех видов астрагала. Установлено, что в траве всех четырех видов содержится рутин, в траве *A. testiculatus* и *A. varius* – астрагалин, в траве *A. henningii, A. testiculatus*, *A. varius* – цинарозид. Гиперозид и нарциссин найдены в траве *A. varius* и *A. dasyanthus*, изокверцитрин – в траве *A. henningii*, *A.varius* и *A. dasyanthus*, ориентин – в траве *A. henningii*. Суммарное содержание найденных гликозидов флавоноидов варьирует от 0,15 до 1,13 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Babich O., Prosekov A., Zaushintsena A., Sukhikh A., Dyshlyuk L., Ivanova S. Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia Astragalus danicus in different regions. *Heliyon*. 2019;5(8):e02245. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02245.
2. Bratkov V. M., Shkondrov A. M., Zdraveva P. K., Krasteva I. N. Flavonoids from the genus *Astragalus*: phytochemistry and biological activity. *Pharmacognosy Reviews*. 2016;10(19):11–32. DOI: 10.4103/0973-7847.176550.
3. Ionkova I., Shkondrov A., Krasteva I., Ionkov T. Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of Astragalus saponins. *Phytochemistry reviews*. 2014;13(2):343–374. DOI: 10.1007/s11101-014-9347-3.
4. Gorai D., Jash S. K., Roy R. Flavonoids from Astragalus genus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2016;7(7):2732–2747. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(7).2732-47.
5. Li X., Qu L., Dong Y., Han L., Liu E., Fang S., Zhang Y. A review of recent research progress on the astragalus genus. *Molecules*. 2014;19(11):18850–18880. DOI: 10.3390/molecules191118850.
6. Lysiuk R., Darmohray R. Pharmacology and ethnomedicine of the genus Astragalus. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*. 2016;3:46–53. DOI: 10.18052/www.scipress.com/IJPPE.3.46.
7. Li C.-X., Liu Y., Zhang Y.-Z., Li J.-C., Lai J. Astragalus polysaccharide: a review of its immunomodulatory effect. *Archives of Pharmacal Research*. 2022; 45(6):367–389. DOI: 10.1007/s12272-022-01393-3.
8. Abd Elkader H.-T. A. E., Essawy A. E., Al-Shami A. S. Astragalus species: Phytochemistry, biological actions and molecular mechanisms underlying their potential neuroprotective effects on neurological diseases. *Phytochemistry*. 2022;202:113293. DOI: 10.1016/j.phytochem.2022.113293.
9. Березуцкий М. А., Дурнова Н. А., Матвиенко У. А. Нейробиологические эффекты химических соединений видов рода *Astragalus* L. и перспективы их применения в медицине (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):199–206. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-206.
10. Березуцкий М. А., Якубова Л. Р., Дурнова Н. А., Романтеева Ю. В., Белоногова Ю. В., Комарова Е. Э., Шереметьева А. С. Фармакологические свойства препаратов, созданных на основе экстракта астрагала (обзор). Химико-*фармацевтический журнал*. 2020;54(4):20–25. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-4-20-25.
11. Berezutsky M. A., Matvienko U. A., Karetnikova A. Yu., Durnova N. A. Anti-cancer activity of *Astragalus membranaceus* – a review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;13(3):206–215. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.03.003.
12. Матвиенко У. А., Дурнова Н. А., Караваева Л. В., Романтеева Ю. В. Аминокислотный состав травы некоторых видов рода *Astragalus* L. *Фармация*. 2021;70(4):20–25. DOI: 10.29296/25419218-2021-04-03.
13. Матвиенко У. А., Дурнова Н. А., Полуянов А. М., Бобкова Н. В., Туренко В. Н., Смирнов В. В., Раменская Г. В. Выделение и идентификация агликонов флавоноидов некоторых видов рода *Astragalus* L. флоры Поволжья. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):106–113. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-106-113.
14. Матвиенко У. А., Ходакова Н. Г., Дурнова Н. А. Скрининг антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений из травы четырех видов *Astragalus* L. *Традиционная медицина*. 2022;67(1):51–55. DOI: 10.54296/18186173_2022_1_51.
15. Матвиенко У. А., Исаев Д. С., Чернышева Ю. Г., Дурнова Н. А. Токсикологическая характеристика экстрактов травы астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) и астрагала изменчивого (*Astragalus varius* S.G.Gmel.). *Альманах молодой науки*. 2021;41(2):7–9.
16. Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Koynova A.-D., Kulikova S. D., Malashenko E. A., Bobkova N. V. Identification and quantitative determination of flavonoids by HPLC-UV method in the raw materials of some representatives of the genus Rumex of three vegetation time. *Drug development & registration*. 2023;12(3):134–142. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-134-142.

REFERENS

1. Babich O., Prosekov A., Zaushintsena A., Sukhikh A., Dyshlyuk L., Ivanova S. Identification and quantification of phenolic compounds of Western Siberia Astragalus danicus in different regions. *Heliyon*. 2019;5(8):e02245. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02245.
2. Bratkov V. M., Shkondrov A. M., Zdraveva P. K., Krasteva I. N. Flavonoids from the genus *Astragalus*: phytochemistry and biological activity. *Pharmacognosy Reviews*. 2016;10(19):11–32. DOI: 10.4103/0973-7847.176550.
3. Ionkova I., Shkondrov A., Krasteva I., Ionkov T. Recent progress in phytochemistry, pharmacology and biotechnology of Astragalus saponins. *Phytochemistry reviews*. 2014;13(2):343–374. DOI: 10.1007/s11101-014-9347-3.
4. Gorai D., Jash S. K., Roy R. Flavonoids from Astragalus genus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2016;7(7):2732–2747. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.7(7).2732-47.
5. Li X., Qu L., Dong Y., Han L., Liu E., Fang S., Zhang Y. A review of recent research progress on the astragalus genus. *Molecules*. 2014;19(11):18850–18880. DOI: 10.3390/molecules191118850.
6. Lysiuk R., Darmohray R. Pharmacology and ethnomedicine of the genus Astragalus. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*. 2016;3:46–53. DOI: 10.18052/www.scipress.com/IJPPE.3.46.
7. Li C.-X., Liu Y., Zhang Y.-Z., Li J.-C., Lai J. Astragalus polysaccharide: a review of its immunomodulatory effect. *Archives of Pharmacal Research*. 2022; 45(6):367–389. DOI: 10.1007/s12272-022-01393-3.
8. Abd Elkader H.-T. A. E., Essawy A. E., Al-Shami A. S. Astragalus species: Phytochemistry, biological actions and molecular mechanisms underlying their potential neuroprotective effects on neurological diseases. *Phytochemistry*. 2022;202:113293. DOI: 10.1016/j.phytochem.2022.113293.
9. Berezutsky M. A., Durnova N. A., Matvienko U. A. Neurobiological effects of chemical compounds of species of the genus *Astragalus* L. and prospects for their use in medicine. *Drug development & registration*. 2023;12(1):199–206. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-206.
10. Berezutskii M. A., Yakubova L. R., Durnova N. A., Romanteyeva Yu. V., Belonogova Yu. V., Komarova E. E., Sheremet'eva A. S. Drugs based on astragalus extract and their pharmacological properties (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(4):20–25. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-4-20-25.
11. Berezutsky M. A., Matvienko U. A., Karetnikova A. Yu., Durnova N. A. Anti-cancer activity of *Astragalus membranaceus* – a review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;13(3):206–215. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.03.003.
12. Matvienko U. A., Durnova N. A., Karavaeva L. V., Romanteeva Yu. V. Amino acid composition of the herb of some species of the genus *Astragalus* L. *Farmatsiya*. 2021;70(4):20–25. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-04-03.
13. Matvienko U. A., Durnova N. A., Poluyanov A. M., Bobkova N. V., Turenko V. N., Smirnov V. V., Ramenskaya G. V. Isolation and Identification of Aglicones of Flavonoids of Some Species of the Genus Astragalus L. of the Volga Region Flora. *Drug development & registration*. 2023;12(1):106–113. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-106-113.
14. Matvienko U. A., Khodakova N. G., Durnova N. A. Screening of the antimicrobial activity of aqueous and aqueous-alcoholic extracts from the herb of four species of *Astragalus* L. *Traditional medicine*. 2022;67(1):51–55. (In Russ.) DOI 10.54296/18186173_2022_1_51.
15. Matvienko U. A., Isaev D. S., Chernysheva Yu. G., Durnova N. A. Toxicological characteristics of extracts of the herb *Astragalus dasyanthus* Pall. and *Astragalus varius* S.G.Gmel. *Al'manah molodoj nauki*. 2021;41(2):7-9. (In Russ.).
16. Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Koynova A.-D., Kulikova S. D., Malashenko E. A., Bobkova N. V. Identification and quantitative determination of flavonoids by HPLC-UV method in the raw materials of some representatives of the genus Rumex of three vegetation time. *Drug development & registration*. 2023;12(3):134–142. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-134-142.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1566
УДК 54.061:615.038

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Влияние выделенных из *Rubus chamaemorus* метаболитов на систему гемостаза в условиях *in vitro*

В. Г. Лужанин[1]✉, А. В. Самородов[2], А. К. Уэйли[3], А. О. Уэйли[3, 4], Г. П. Яковлев[3], И. А. Самылина[5]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России). 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России). 450008, Россия, Приволжский федеральный округ, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3
[3] 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, 14, лит. А
[4] Лаборатория «Клеточные механизмы гомеостаза крови». Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН). 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44
[5] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119435, Россия, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4

✉ **Контактное лицо:** Лужанин Владимир Геннадьевич. **E-mail:** vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

ORCID: В. Г. Лужанин – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027; А. В. Самородов – https://orcid.org/0000-0001-9302-499X;
А. К. Уэйли – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924; А. О. Уэйли – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336;
Г. П. Яковлев – https://orcid.org/0009-0009-4570-2739; И. А. Самылина – https://orcid.org/0000-0002-4895-0203.

Статья поступила: 04.09.2023 **Статья принята в печать:** 05.02.2024 **Статья опубликована:** 09.02.2024

Резюме

Введение. Одной из ключевых задач современной фармации является поиск новых перспективных соединений – потенциальных лекарственных кандидатов. Природные объекты, в особенности растительные, издавна являются богатыми источниками новых молекул и находят широкое применение в мировой пищевой и фармацевтической промышленности. Морошка обыкновенная (*Rubus chamaemorus* L.) представляет собой многолетнее травянистое растение из семейства розоцветных (*Rosaceae*). В плодах и листьях *R. chamaemorus* содержится большое разнообразие полифенольных вторичных метаболитов: гидролизуемые/конденсированные таннины и флавоноиды. Экстракты, в которых доминируют полифенолы, показывают значительную антипролиферативную активность и ингибирование клеточного роста, а также вызывают апоптоз клеток. Ранее в результате фитохимических исследований листьев *R. chamaemorus* нами были выделены и охарактеризованы пять полифенольных вторичных метаболитов, относящихся к классам таннинов и флавоноидов.

Цель. Скрининг ранее выделенных из *R. chamaemorus* индивидуальных компонентов в отношении системы гемостаза *in vitro* и установление наиболее перспективных соединений для последующей фармацевтической разработки.

Материалы и методы. Эксперименты в условиях *in vitro* выполнены на крови здоровых доноров-мужчин. Исследование влияния на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born на агрегометре «АТ-02» (ООО «НПФ «Медтех», Россия). Определение антикоагуляционной активности проводили общепризнанными клоттинговыми тестами на турбидиметрическом гемокоагулометре Solar CGL 2110 (ЗАО «СОЛАР», Россия). Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе NovoCyte (Agilent Technologies, США).

Результаты и обсуждение. Исследовано влияния выделенных соединений **1–5** на показатели активации, агрегации тромбоцитов и коагуляционный компонент гемостаза. В концентрации 1,0 мг/мл соединения **1–5** не влияли на показатель концентрации фибриногена и протромбиновое время. Соединения **1**, **3** и **5** полностью подавляли активацию тромбоцитов в изученных концентрациях. Соединения **1** и **3** проявили антиагрегационную активность, не уступающую активности ацетилсалициловой кислоты, они содержатся во всех водных и спиртовых экстрактах листьев *R. chamaemorus*, их количественное содержание варьируется в зависимости от условий экстракции.

Заключение. В результате скрининга выделенных из листьев *R. chamaemorus* индивидуальных соединений **1–5** были установлены их антиагрегационные и антикоагуляционные свойства. Соединения **1** (4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота) и **3** (кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид) проявили антиагрегационную активность, не уступающую активности ацетилсалициловой кислоты, и являются наиболее перспективными из изученного ряда соединений для последующей фармацевтической разработки новых антиагрегантов.

Ключевые слова: *Rubus chamaemorus*, морошка обыкновенная, полифенолы, система гомеостаза

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 выделению индивидуальных соединений. А. В. Самородов выполнял экспериментальную часть по изучению влияния выделенных соединений на систему гомеостаза. В. Г. Лужанин и Г. П. Яковлев – концептуальная проработка и руководство экспериментом. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Лужанин В. Г., Самородов А. В., Уэйли А. К., Уэйли А. О., Яковлев Г. П., Самылина И. А. Влияние выделенных из *Rubus chamaemorus* метаболитов на систему гемостаза в условиях *in vitro*. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(1):149–158. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1566

© Лужанин В. Г., Самородов А. В., Уэйли А. К., Уэйли А. О., Яковлев Г. П., Самылина И. А., 2024
© Luzhanin V. G., Samorodov A. V., Whaley A. K., Whaley A. O., Yakovlev G. P., Samylina I. A., 2024

The Effect of Individual Compounds from *Rubus chamaemorus* on Hemostasis *in vitro*

Vladimir G. Luzhanin[1]✉, Aleksandr V. Samorodov[2], Andrei K. Whaley[3], Anastasiia O. Whaley[3, 4], Gennadi P. Yakovlev[3], Irina A. Samylina[5]

[1] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSBEI HE PSPA MOH Russia). 2, Polevaya str., Perm, Perm region, 614990, Russia
[2] Bashkir State Medical University (BSMU). 3, Lenina str., Ufa, Republic of Bashkortostan, Volga Federal District, 450008, Russia
[3] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[4] Laboratory "Cellular mechanisms of blood homeostasis". Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences (IEPhB RAS). 44, Thorez Avenue, Saint-Petersburg, 194223, Russia
[5] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 2/4, Bolshaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir G. Luzhanin. **E-mail:** vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

ORCID: Vladimir G. Luzhanin – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027; Aleksandr V. Samorodov – https://orcid.org/0000-0001-9302-499X; Andrei K. Whaley – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924; Anastasiia O. Whaley – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; Gennadi P. Yakovlev – https://orcid.org/0009-0009-4570-2739; Irina A. Samylina – https://orcid.org/0000-0002-4895-0203.

Received: 04.09.2023 **Revised:** 05.02.2024 **Published:** 09.02.2024

Abstract

Introduction. One of the key tasks of the pharmaceutical industry is the search for new promising compounds – potential drug candidates. Natural objects, especially plants, have long been rich sources of new molecules and are widely used in the global food and pharmaceutical industries. Cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) is a perennial herb from the *Rosaceae* family. The fruits and leaves of *R. chamaemorus* contain a wide variety of polyphenolic secondary metabolites – hydrolysable/condensed tannins and flavonoids. Extracts enriched by polyphenols showed significant antiproliferative activity and inhibition of cell growth, and also induce cell apoptosis. As a result of our previous phytochemical research of *R. chamaemorus* leaves, five polyphenolic secondary metabolites belonging to the classes of tannins and flavonoids were isolated and characterized.

Aim. Screening of previously isolated from *R. chamaemorus* individual compounds for the hemostasis system *in vitro* and identification of the most promising compounds for subsequent pharmaceutical development.

Materials and methods. Experiments under *in vitro* conditions were performed on the blood of healthy male donors. The research of the effect on platelet aggregation was carried out according to the Born method on an AT-02 aggregometer (LLC "SPF "Medtech", Russia). Determination of anticoagulant activity was carried out by conventional clotting tests on a Solar CGL 2110 turbidimetric hemocoagulometer (CJSC "SOLAR", Russia). Cytofluorimetric analysis was performed on a NovoCyte instrument (Agilent Technologies, USA).

Result and discussion. The influence of the isolated compounds **1**–**5** on the parameters of activation, platelet aggregation and the coagulation component of hemostasis was studied. At a concentration of 1.0 mg/ml, compounds **1**–**5** did not affect the fibrinogen concentration and prothrombin time. Compounds **1**, **3** and **5** completely suppressed platelet activation at the studied concentrations. Compounds **1** and **3** showed antiaggregation activity comparible to the values of acetylsalicylic acid and are contained in all aqueous and alcoholic extracts of *R. chamaemorus* leaves; their quantitative content varies depending on the extraction conditions.

Conclusion. Thus, as a result of the screening of individual compounds **1**–**5** isolated from the leaves of *R. chamaemorus* their antiaggregating and anticoagulation properties were established. Compounds **1** (4-O-α-L-arabinofuranosylellagic acid) and **3** (quercetin-3-O-β-D-glucuronide) showed antiaggregation activity comparible to that of acetylsalicylic acid, and are the most promising of the studied series of compounds for the subsequent pharmaceutical development of new antiplatelet agents.

Keywords: *Rubus chamaemorus*, cloudberry, polyphenols, homeostasis system

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. Waley, performed the experimental part on the isolation of individual compounds. Aleksandr V. Samorodov studied the effect of isolated compounds on the homeostasis system; Vladimir G. Luzhanin and Genadi P. Yakovlev – concept and supervision of the experiments. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Luzhanin V. G., Samorodov A. V., Whaley A. K., Whaley A. O., Yakovlev G. P., Samylina I. A. The effect of individual compounds from *Rubus chamaemorus* on hemostasis *in vitro*. *Drug development & registration*. 2024;13(1):149–158. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1566

ВВЕДЕНИЕ

Одной из ключевых задач современной фармации является поиск новых перспективных соединений – потенциальных лекарственных кандидатов. Природные объекты, в особенности растительные, издавна являются богатыми источниками новых молекул и находят широкое применение в мировой пищевой и фармацевтической промышленности [1]. Химический состав некоторых растений, имеющих полезные свойства согласно данным этнофармакологии, исследован незначительно или вовсе не изучен [2]. Таким образом, выделение, установление структуры и исследование природных соединений, которые проявляют высокую степень структурного разнообразия, является неотъемлемой частью современного поиска и разработки новых лекарственных препаратов [3].

Морошка обыкновенная (*Rubus chamaemorus* L.) представляет собой многолетнее травянистое растение из семейства розоцветных (*Rosaceae*). *R. chamaemorus* произрастает исключительно в северном полушарии и имеет циркумполярный ареал. Ареал *R. chamaemorus* расположен на двух континентах – в Северной Америке и Евразии. *R. chamaemorus* населяет в основном торфяные и верховые болота. Эти места обитания, как правило, с кислыми почвами, бедными питательными веществами. *R. chamaemorus* также произрастает в тундре, часто обильно растет на участках, покрытых сфагновым мхом. *R. chamaemorus* в первую очередь известна своими съедобными плодами, а также листьями, применяемыми в народной медицине [4].

В плодах и листьях *R. chamaemorus* содержится большое разнообразие полифенольных вторичных метаболитов – гидролизуемых/конденсированных таннинов и флавоноидов. Плоды *R. chamaemorus* содержат эллаготаннины, проантоцианидины, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды и антоцианы [5]. Одной из отличительных особенностей *R. chamaemorus* и ряда других представителей рода *Rubus* является содержание в растении одновременно конденсированных и гидролизуемых таннинов. Причем содержание гидролизуемых таннинов в *R. chamaemorus* на порядок выше, чем конденсированных [6]. В плодах *R. chamaemorus* были обнаружены следующие мономерные единицы конденсированных таннинов: (+)-эпикатехин и (–)-эпикатехин, а также процианидин B2, представляющий собой димер (–)-эпикатехина [7]. Количественное содержание гидролизуемых таннинов в плодах *R. chamaemorus* крайне велико и преимущественно представлено эллаготаннинами. Методом ВЭЖХ-МС в экстракте плодов было обнаружено большое разнообразие гидролизуемых таннинов, к которым относятся мономерные эллаготаннины (филлантузиин G, педункулагин/касуариин, касуарактин/потентиллин, сангуйин H-2), димерные эллаготаннины (сангуйин H-6, сангуйин H-10) и тримерные эллаготаннины (ламбертианин C) [8, 9].

В листьях и плодах *R. chamaemorus* преимущественно содержатся две группы флавоноидов – флавонолов и антоцианидинов, а также их гликозидов – флавонол-3-O-гликозидов и антоцианов соответственно [10, 11]. В экстрактах плодов *R. chamaemorus* были обнаружены четыре антоциана, среди которых один монозид (цианидин-3-O-глюкозид), два биозида (цианидин-3-O-софорозид, цианидин-3-O-рутинозид) и один триозид (цианидин-3-O-(2''-O-глюкозил)рутинозид). Все обнаруженные в плодах *R. chamaemorus* антоцианы в качестве агликона содержали цианидин [6]. В плодах *R. chamaemorus* также были обнаружены три флавоноловых агликона – кверцетин, кемпферол и мирицетин. Среди гликозидов в данном сырье были обнаружены только производные кверцетина – кверцетин-3-O-глюкозид и кверцетин-3-O-глюкуронид [10].

В северных странах Европы, Азии и Америки плоды *R. chamaemorus* нашли широкое применение как противоцинготное, мочегонное, потогонное и противовоспалительное средство, листья используются как вяжущее, кровоостанавливающее, мочегонное, противовоспалительное и ранозаживляющее средство [12–14]. Следует также отметить, что в питании человека диеты, богатые ягодами, оказывают противоопухолевую активность в отношении нескольких типов рака, включая рак толстой кишки. Плоды *R. chamaemorus* используют в данных целях как источник эллаготаннинов с высоким уровнем эллаговой кислоты, обладающей сильной антиканцерогенной, антимутагенной и антиоксидантной активностью [15, 16]. Экстракты, в которых доминируют полифенолы, показали значительную антипролиферативную активность и ингибирование клеточного роста, а также вызывают апоптоз клеток. Введение лиофилизированной *R. chamaemorus* в питание значительно уменьшало количество опухолей и размер кишечных аденом у мышей [15]. Следует отметить, что на сегодняшний день имеются убедительные представления об эпидемиологии, группах риска и основных звеньях патогенеза в реализации онкологической патологии. Принимая во внимание факт, что злокачественные новообразования с разной частотой статистически значимо способствуют развитию тромбоза [17], а обзор данных литературы о влиянии *R. chamaemorus* на систему гемостаза продемонстрировал отсутствие систематизированных исследований, то **целью данного исследования** являлся скрининг ранее выделенных из *R. chamaemorus* индивидуальных компонентов в отношении системы гемостаза *in vitro* и установление наиболее перспективных соединений для последующей фармацевтической разработки.

Ранее в результате фитохимических исследований листьев *R. chamaemorus* нами были выделены и охарактеризованы 5 полифенольных вторичных метаболитов, относящихся к таннинам – 4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота (**1**), представляющая собой O-гликозид эллаговой кислоты, – и флавоноидам – (–)-эпикатехин (**2**), кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид (**3**), кверцетин-3-O-β-D-2''-галлоилглюкуронид (**4**) и кемпферол-3-O-β-D-глюкуронид (**5**) [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Индивидуальные вещества были выделены на базе кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России из листьев *R. chamaemorus*, собранных в питомнике лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (поселок Стеклянный, Ленинградская область) в июне 2017 года, вся экспериментальная работа по оценке влияния

выделенных индивидуальных соединений на систему гемостаза выполнена на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России в соответствии с рекомендациями «Руководства по доклиническому изучению новых фармакологических веществ» [19].

Перед экстракцией листья *R. chamaemorus* высушивались при 50 °С в инфракрасной сушилке, затем сырье измельчали на мельнице и просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм. При экстракции методом мацерации в емкость добавлялись измельченное сырье и экстрагент, которые настаивались при комнатной температуре в течение 24 часов с периодическим перемешиванием, после чего полученный экстракт фильтровался (соотношение сырье : экстрагент составляло 1 : 8). При экстракции с кипячением в круглодонную колбу с обратным холодильником добавлялись измельченное сырье и экстрагент, которые затем нагревались на кипящей водяной бане в течение 1 часа (соотношение сырье:экстрагент составляло 1 : 8), полученный экстракт поле охлаждения фильтровался.

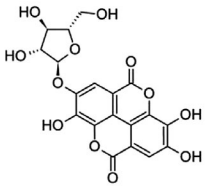
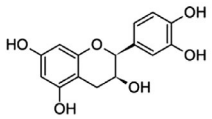
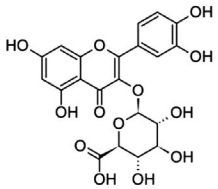
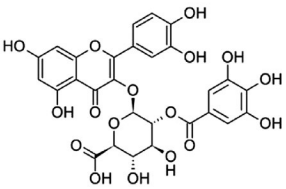
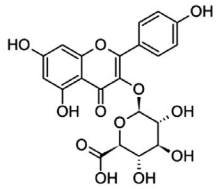
ВЭЖХ-УФ-хроматограммы регистрировали на жидкостном хроматографе Prominence LC-20AD (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном автосамплером Prominence SIL-20A (Shimadzu Corporation, Япония), термостатом колонок CTO-20AC, колонкой Supelcosil LC-18 25 см × 4,6 мм, 5 мкм (США), и диодно-матричным детектором Prominence SPD-M20A (Shimadzu Corporation, Япония). Система подвижной фазы состояла 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.

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 нм.

Эксперименты в условиях *in vitro* проводились на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18–24 лет (34 человека). Исследования проводились в строгом соответствии с решением этического комитета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (№ 3 от 18.03.2021 г.). Информация об индивидуальных соединениях, используемых для исследования, приведена в таблице 1. Оценка влияния на систему гемостаза выделенных соединений и препаратов сравнения проводилась в стандартной концентрации 1,0 мг/мл.

Таблица 1. Индивидуальные соединения, выделенные из листьев *R. chamaemorus*

Table 1. Individual compounds isolated from leaves of *R. chamaemorus*

№	Название соединений Name of the compounds	Структура Structure
1	4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота 4-O-α-L-arabinofuranosylellagic acid	
2	(–)-Эпикатехин (–)-Epicatechin	
3	Кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид Quercetin-3-O-β-D-glucuronide	
4	Кверцетин-3-O-β-D-2′′-галлоилглюкуронид Quercetin-3-O-β-D-2′′-galloyl glucuronide	
5	Кемпферол-3-O-β-D-глюкуронид Kaempferol-3-O-β-D-glucuronide	

Исследования по функциональной активности тромбоцитов в присутствии исследуемых веществ проводились на агрегометре «АТ-02» (ООО «НПФ «Медтех», Россия) [20]. С помощью турбидиметрического гемокоагулометра Solar CGL 2110 (ЗАО «СОЛАР», Россия) проводилось изучение антикогуляционной активности общепринятыми клоттинговыми тестами. В качестве маркера активации тромбоцитов измеряли экспрессию P-селектина (CD62) на поверхности тромбоцитов на приборе NovoCyte (Agilent Technologies, США), используя оригинальное программное обеспечение. В качестве позитивного контроля применялась ацетилсалициловая кислота (Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd., Китай), пентоксифиллин (ОАО «Дальхимфарм», Россия) в концентрациях 10^{-3} М/л и гепарин натрия (ОАО «Синтез», Россия) в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ г/мл.

Данные, полученные в результате исследований, анализировались с помощью программного обеспечения SATISTICA 10,0 (StatSoft Inc., США). Критерий Шапиро – Уилка использовался для оценки статистических данных на предмет нормального распределения. Было установлено, что полученные данные не соответствуют нормальному распределению, из-за чего методы непараметрической природы были применены для дальнейшей работы. Полученные значения представлены в виде срединного значения набора чисел, 25 и 75 процентилей. Критерий Краскела – Уоллиса применялся для проведения дисперсионного анализа. Для статистических критериев критический уровень значимости *p* принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования влияния выделенных со-единений **1–5** на показатели активации, агрегации тромбоцитов и коагуляционный компонент гемостаза представлены в таблице 3. Установлено, что изучен-ные вещества показали различной степени выраженности влияние на плазменный компонент системы гемостаза, проявляющееся изменением показателя внутреннего пути свертывания крови – активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ). В указанной концентрации вещества не влияли на показатель концентрации фибриногена и протромбиновое время.

Соединения **1**, **3** и **5** полностью подавляли активацию тромбоцитов и влияли на уровень экспрессии кластера дифференциации 62 (CD62). Следует отметить, что соединения **1** и **3**, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, удлиняли значения lag-периода, который характеризует «реакцию высвобождения тромбоцитов», что может свидетельствовать о потенциально широком антиагрегационном эффекте исследуемых веществ (см. таблица 3).

Соединение **3** (кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид) (меквилианин) проявило антиагрегационную активность на уровне ацетилсалициловой кислоты в условиях *in vitro*. Кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид является преобладающим в сравнении с остальными выделенными нами вторичными метаболитами листьев *R. chamaemorus* и встречается в значительной по сравнению с другими обсуждаемыми компонентами концентрации во всех видах водных и спиртовых вытяжек из листьев *R. chamaemorus*, что подтверждается хроматограммами извлечений, полученных путем экстракции листьев *R. chamaemorus* методом мацерации при комнатной температуре 96%-м этанолом (рисунок 1) и водой (рисунок 2).

Хроматографический анализ экстрактов листьев *R. chamaemorus*, полученных при нагревании на водяной бане с обратным холодильником с 50%-м этанолом (рисунок 3), 96%-м этанолом (рисунок 4) и водой (рисунок 5), также подтвердил, что кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид является преобладающим в сравнении с остальными выделенными нами вторичными метаболитами, содержащимися в листьях *R. chamaemorus*, за исключением экстракта, полученного при нагревании с 96%-м этанолом (рисунок 4), где площадь пика кверцетин-3-O-β-D-глюкуронида сопоставима с площадью пика эллаговой кислоты.

В отличие от кверцетина и большинства его гликозидов кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид растворим в воде и является одним из основных метаболитов кверцетина в организме человека [21]. Настоящее исследование показало, что кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид является одним из основных компонентов водных и спиртовых экстрактов листьев *R. chamaemorus* и, вероятно, вносит значительный вклад в фармакологическую активность суммарных экстрактов *R. chamaemorus*.

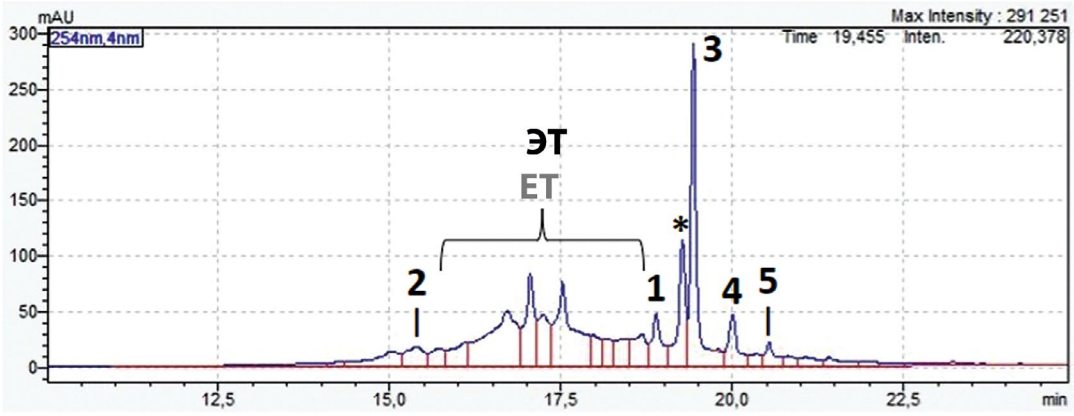


Рисунок 1. Зум ВЭЖХ-хроматограммы 96%-го спиртового экстракта листьев *R. chamaemorus*, полученного путем мацерации.
*** – пик эллаговой кислоты; ЭТ – пики эллаготаннинов**

Figure 1. Zoomed HPLC chromatogram of a 96 % ethanolic extract of *R. chamaemorus* leaves obtained through maceration.
*** – ellagic acid peak; ET – ellagitannin peaks**

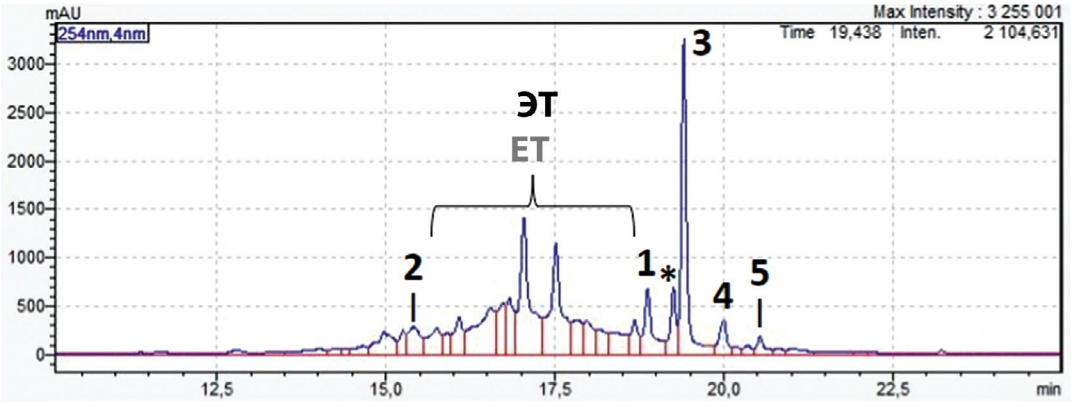


Рисунок 2. **Зум ВЭЖХ-хроматограммы водного экстракта листьев *R. chamaemorus*, полученного путем мацерации.**
*** – пик эллаговой кислоты; ЭТ – пики эллаготаннинов**

Figure 2. **Zoomed HPLC chromatogram of an aqueous extract of R. chamaemorus leaves obtained through maceration.**
*** – ellagic acid peak; ET – ellagitannin peaks**

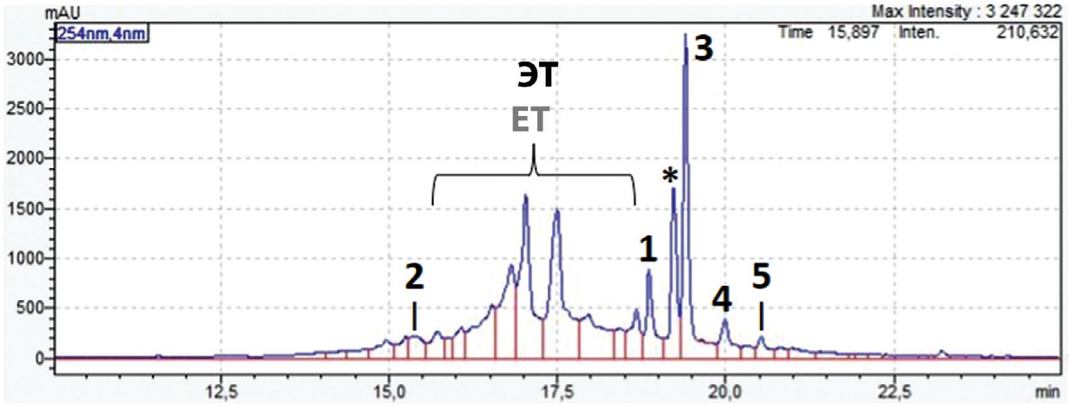


Рисунок 3. **Зум ВЭЖХ-хроматограммы 50%-го спиртового экстракта листьев *R. chamaemorus*, полученного с помощью нагревания.**
*** – пик эллаговой кислоты; ЭТ – пики эллаготаннинов**

Figure 3. **Zoomed HPLC chromatogram of a 50 % ethanolic extract of *R. chamaemorus* leaves obtained with the help of heating.**
*** – ellagic acid peak; ET – ellagitannin peaks**

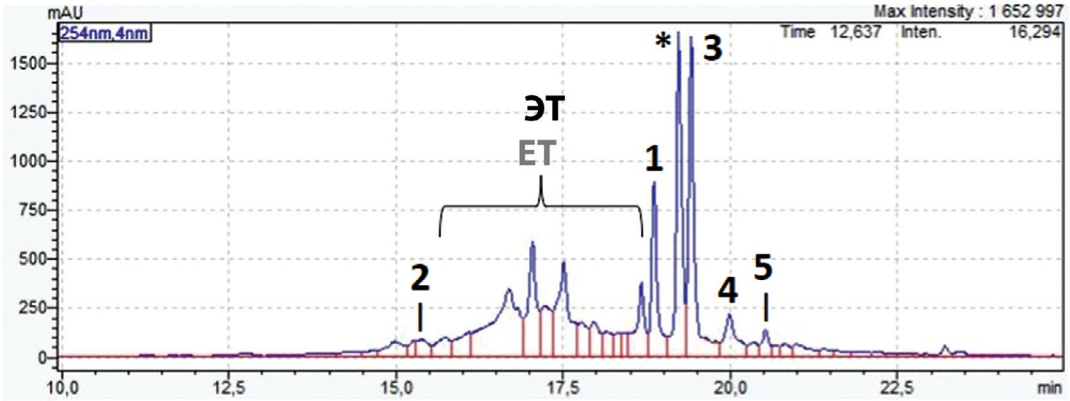


Рисунок 4. **Зум ВЭЖХ-хроматограммы 96%-го спиртового экстракта листьев *R. chamaemorus*, полученного с помощью нагревания.**
*** – пик эллаговой кислоты; ЭТ – пики эллаготаннинов**

Figure 4. **Zoomed HPLC chromatogram of a 96 % ethanolic extract of *R. chamaemorus* leaves obtained with the help of heating.**
*** – ellagic acid peak; ET – ellagitannin peaks**

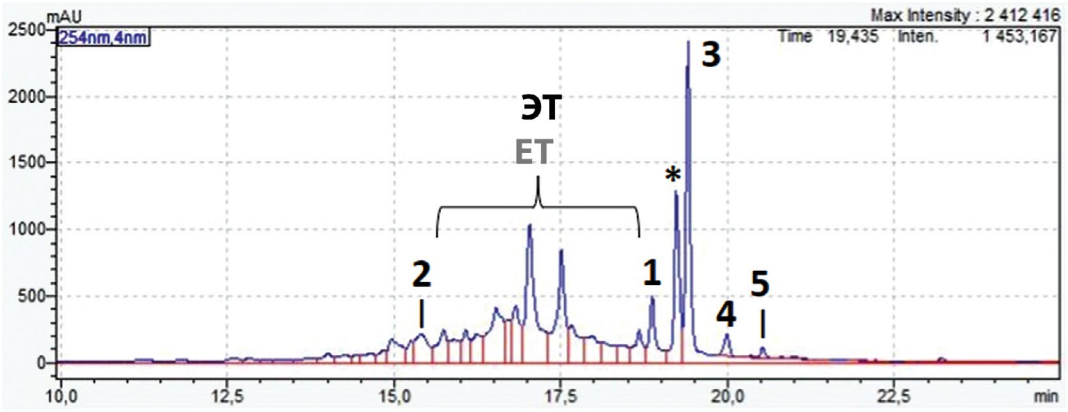


Рисунок 5. Зум ВЭЖХ-хроматограммы водного экстракта листьев *R. chamaemorus*, полученного с помощью нагревания.
*** – пик эллаговой кислоты; ЭТ – пики эллаготаннинов**

Figure 5. Zoomed HPLC chromatogram of an aqueous extract of *R. chamaemorus* leaves obtained with the help of heating.
*** – ellagic acid peak; ET – ellagitannin peaks**

Соединение **1** (4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота) проявило антиагрегационную активность, превосходящую соответствующие значения для ацетилсалициловой кислоты. Эллаговая кислота, которая содержится в экстрактах *R. chamaemorus* (рисунки 1–5), является одновременно биосинтетическим предшественником и продуктом гидролиза 4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговой кислоты, соответственно, оба этих соединения в различных соотношениях присутствуют во всех экстрактах листьев *R. chamaemorus*. Благодаря наличию остатка арабинозы в своей структуре 4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота обладает более полярными свойствами по сравнению с эллаговой кислотой, что свидетельствует о различных потенциальных уровнях биодоступности этих компонентов листьев *R. chamaemorus*. 4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота была обнаружена во всех водных и спиртовых экстрактах листьев *R. chamaemorus* (рисунки 1–5) и по относительной доле содержания в экстракте занимает второе место после кверцетин-3-O-β-D-глюкуронида (таблица 2).

Стоит отметить, что соотношение вещества **1** к веществу **3** в экстрактах листьев *R. chamaemorus* варьирует в зависимости от условий экстракции (таблица 2). При применении воды в качестве экстрагента в условиях мацерации или кипячения относительное содержание кверцетин-3-O-β-D-глюкуронида будет выше, но при экстракции с помощью 95%-го спирта относительное содержание 4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговой кислоты будет увеличиваться.

Соединение **5** (кемпферол-3-O-β-D-глюкуронид) является близким структурным аналогом кверцетин-3-O-β-D-глюкуронида и отличается от него отсутствием второго гидроксила в положении 3 кольца B, что во многом объясняет их схожие параметры активности. Из всех анализируемых соединений кемпферол-3-O-β-D-глюкуронид содержится в листьях *R. chamaemorus* в наименьшем количестве и одновременно является самым неполярным соединением из исследуемой группы, что видно из его расположения на хроматограммах.

Таблица 2. Относительное содержание соединений 1 и 3 в % по отношению к площади всей ВЭЖХ-хроматограммы

Table 2. Relative content in % relative to the area of the entire HPLC chromatogram of compounds 1 and 3

Соединение Compound	Условия экстракции				
	Вода, мацерация Water, maceration	96%-й спирт, мацерация 96 % ethanol, maceration	Вода, кипячение Water, reflux	50%-й спирт, кипячение 50 % ethanol, reflux	96%-й спирт, кипячение 96 % ethanol, reflux
1	4,0	3,5	3,4	3,9	6,3
2	2,5	2,5	2,9	1,7	1,3
3	13,5	13,9	17,0	12,0	11,6
4	2,0	3,4	0,9	2,5	3,1
5	1,1	1,6	0,4	1,3	1,2
*	2,8	6,5	7,3	6,3	11,6
Отношение 1/3 · 100% Ratio 1/3 · 100%	29,6	25,2	20,0	32,5	54,3

Таблица 3. **Показатели активации, агрегации тромбоцитов и коагулограммы в присутствии индивидуальных соединений 1–5, Me (0,25–0,75)**

Table 3. **Indicators of activation, platelet aggregation and coagulogram in the presence of individuals compounds 1–5, Me (0.25–0.75)**

Соединение Compound	**Латентный период, % к контролю** Latent period, % of control	**Максимальная амплитуда (МА), % к контролю** Maximum amplitude, % to control	**Скорость агрегации, % к контролю** Aggregation rate, % to control	**Время достижения МА, % к контролю** Time to reach MA, % of control	**Удлинение АПТВ, % к контролю** Elongation of APTT, % to control	**Экспрессия CD62, %** Expression of CD62, %	
						Аденозиндифосфат– (АДФ–) Adenosine diphosphate– (ADP–)	**Аденозиндифосфат+ (АДФ+)** Adenosine diphosphate+ (ADP+)
1	+14,9 (14,1–17,8)*, ##	–19,1 (16,8–20,7)**, #	–13,9 (12,8–17,1)*, #	–23,0 (21,6–27,9)**, ##	7,6 (6,5–9,3)*	1,1 (0,8–1,3)*	1,1 (0,9–1,2)**, ‡
2	+14,8 (13,2–16,5)*, ##	–0,5 (0,2–0,9)##	+17,2 (15,6–19,4)*, ##	–21,1 (18,7–22,3)**, ##	9,4 (7,2–11,7)*	1,4 (1,2–1,5)*	11,3 (10,7–13,5)*, ‡‡
3	+23,1 (22,2–24,5)**, ##	–12,5 (11,9–14,1)**	–19,1 (18,3–20,6)*, #	–20,7 (18,5–21,9)**, ##	9,3 (8,2–10,7)*	1,3 (1,2–1,4)*	1,2 (1,1–1,4)**, ‡
4	–17,9 (14,8–19,4)*, ##	–9,1 (7,6–10,7)*, #	+4,4 (3,8–5,0)#	–10,7 (6,8–13,7)*, ##	6,4 (5,5–8,9)*	1,4 (1,1–1,5)*	15,3 (13,7–17,2)*, ‡‡
5	–17,1 (15,6–18,7)*, #	–6,7 (4,7–9,1)*, #	–7,9 (6,7–8,5)*	–9,1 (6,7–11,4)*, ##	10,6 (9,2–12,5)*	1,1 (1,0–1,3)*	1,5 (1,2–1,6)**, ‡
Ацетилсалициловая кислота Acetylsalicylic acid	–2,1 (1,1–2,6)	–13,7 (10,8–16,4)*	–10,5 (7,6–12,3)*	+10,5 (8,7–13,4)*, ††	н.д.	1,3 (1,1–1,4)*	16,4 (14,5–17,3)*, ‡‡
Гепарин натрия Heparin sodium	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	20,3 (19,7–21,4)*	н.д.	н.д.
Пентоксифиллин Pentoxifylline	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	1,2 (1,1–1,4)*	3,5 (2,7–4,1)*, ‡‡

Примечание. * $p \le 0.05$.
** $p \le 0.001$ – в сравнении с контролем.
# $p \le 0.05$.
$p \le 0.001$ – в сравнении с ацетилсалициловой кислотой; соединения vs гепарин натрия при $p \le 0.05$.

Уровень статистической значимости различий признаков групп после активации АДФ:
‡ – $p > 0,05$; ‡‡ – $p \le 0,05$; CD62АДФ– – экспрессия CD62 до воздействия АДФ; CD62АДФ+ – экспрессия CD62 после воздействия АДФ. $n = 6$.

Note. * $p \le 0.05$.
** $p \le 0.001$ – compared with control.
# $p \le 0.05$.
$p \le 0.001$ – in comparison with acetylsalicylic acid; compounds vs sodium heparin at $p \le 0.05$.

Level of statistical significance of differences in group characteristics after ADP activation:
‡ – $p > 0.05$; ‡‡ – $p \le 0.05$; CD62ADP– – expression of CD62 before exposure to ADP; CD62ADP+ – expression of CD62 after exposure to ADP. $n = 6$.

Соединение **2** ((–)-эпикатехин) не влияло на уровень экспрессии CD62. (–)-эпикатехин в сравнении с остальными изученными соединениями занимает четвертое место по своему относительному количественному содержанию в экстрактах листьев *R. chamaemorus*. Относительное количество данного вещества увеличивалось, когда в качестве растворителя применялась вода, поскольку (–)-эпикатехин является самым полярным соединением из представленных на ВЭЖХ-хроматограммах (рисунки 1–5).

Соединение **4** (кверцетин-3-O-β-D-2''-галлоилглюкуронид) также не влияло на уровень экспрессии CD62. Кверцетин-3-O-β-D-2''-галлоилглюкуронид занимает третье место по своему относительному количественному содержанию среди изученных соединений в экстрактах листьев *R. chamaemorus*. Кверцетин-3-O-β-D-2''-галлоилглюкуронид является галлоил-производным кверцетин-3-O-β-D-глюкуронида и благодаря наличию остатка галловой кислоты в своей структуре отличается своим влиянием на компоненты системы гемостаза. В процессе метаболизма в организме человека соединение **4** может трансформироваться в соединение **3** в результате гидролиза остатка галловой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате скрининга выделенных из листьев *R. chamaemorus* индивидуальных соединений **1**–**5** были установлены их антиагрегационные и антикоагуляционные свойства. Соединения **1** (4-O-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота) и **3** (кверцетин-3-O-β-D-глюкуронид) проявили антиагрегационную активность, не уступающую активности ацетилсалициловой кислоты, и являются наиболее перспективными из изученного ряда соединений для последующей фармацевтической разработки новых антиагрегантов. Соединения **1**, **3** и **5** полностью подавляли активацию тромбоцитов в изученных концентрациях и влияли на уровень экспрессии CD62, в то время как соединения **2** ((–)-эпикатехин) и **4** (кверцетин-3-O-β-D-2''-галлоилглюкуронид), а также ацетилсалициловая кислота не влияли на уровень экспрессии CD62. Соединения **1**–**5** содержатся во всех водных и спиртовых экстрактах листьев *R. chamaemorus*, их количественное содержание варьируется в зависимости от условий экстракции, но убывает в ряду **3**, **1**, **4**, **2**, **5** от большего к меньшему.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bernardini S., Tiezzi A., Laghezza Masci V., Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*. 2018;32(16):1926–1950. DOI: 10.1080/14786419.2017.1356838.
2. Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S., Bollinger W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 1985;228(4704):1154–1160. DOI: 10.1126/science.3890182.
3. Lahlou M. Screening of natural products for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2007;2(5):697–705. DOI: 10.1517/17460441.2.5.697.
4. Уэйли А. К., Понкратова А. О., Теслов Л. С., Лужанин В. Г. Обзор вторичных метаболитов морошки и их биологической активности. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2020;22(7):50–59.
5. Kähkönen M., Kylli P., Ollilainen V., Salminen J.-P., Heinonen M. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(5):1167–1174. DOI: 10.1021/jf203431g.
6. Jaakkola M., Korpelainen V., Hoppula K., Virtanen V. Chemical composition of ripe fruits of *Rubus chamaemorus* L. grown in different habitats. *Journal of the science of food and agriculture*. 2012;92(6):1324–1330. DOI: 10.1002/jsfa.4705.
7. Faleva A. V., Ul'yanovskii N. V., Onuchina A. A., Falev D. I., Kosyakov D. S. Comprehensive characterization of secondary metabolites in fruits and leaves of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Metabolites*. 2023;13(5):598. DOI: 10.3390/metabo13050598.
8. Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Suvanto J., Salminen J.-P., Seppänen-Laakso T., Tähtiharju J., Honkapää K., Oksman-Caldentey K.-M. Natural antimicrobials from cloudberry (*Rubus chamaemorus)* seeds by sanding and hydrothermal extraction. *ACS Food Science & Technology*. 2021;1(5):917–927. DOI: 10.1021/acsfoodscitech.0c00109.
9. Määttä-Riihinen K. R., Kamal-Eldin A., Törrönen A. R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of Fragaria and Rubus species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(20):6178–6187. DOI: 10.1021/jf049450r.
10. Thiem B. *Rubus chamaemorus* L. – a boreal plant rich in biologically active metabolites: A review. *Biological Letters*. 2003;40(1):3–13.
11. Mcdougall G. J., Martinussen I., Junttila O., Verrall S., Stewart D. Assessing the influence of genotype and temperature on polyphenol composition in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) using a novel mass spectrometric method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(20):10860–10868. DOI: 10.1021/jf202083b.
12. Rocabado G. O., Bedoya L. M., Abad M. J., Bermejo P. *Rubus* – A review of its phytochemical and pharmacological profile. *Natural Product Communications*. 2008;3(3):423–436. DOI: 10.1177/1934578x0800300319.
13. Махлаюк В. П. Лекарственные растения в народной медицине. Саратов: Приволжское книжное издательство; 1991. 544 с.
14. De Luca Luigi M., Norum Kaare R. Scurvy and Cloudberries: A chapter in the history of nutritional sciences. *The journal of Nutrition*. 2011;141(12):2101–2105.
15. Afrin S., Giampieri F., Gasparrini M., Forbes-Hernandez T., Varela-Lopez A., Quiles J., Mezzetti B., Battino M. Chemopreventive and therapeutic effects of edible berries: A focus on colon cancer prevention and treatment. *Molecules*. 2016;21(2):169. DOI: 10.3390/molecules21020169.
16. McDougall G. J., Ross H. A., Ikeji M., Stewart D. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(9):3016–3023. DOI: 10.1021/jf073469n.
17. Barbui T., De Stefano V., Falanga A., Finazzi G., Martinelli I., Rodeghiero F., Vannucchi A. M., Barosi G. Addressing and proposing solutions for unmet clinical needs in the management of myeloproliferative neoplasm-associated thrombosis: A consensus-based position paper. *Blood Cancer Journal*. 2019;9(8):61. DOI: 10.1038/s41408-019-0225-5.
18. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Smirnov S. N., Proksh P., Ionov N. S., Poroikov V. V., Luzhanin V. G. Phytochemical analysis of polyphenol secondary metabolites in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) Leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55:253–258.

19. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
20. Born G. G. V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927–929. DOI: 10.1038/194927b0.
21. Hai Y., Zhang Y., Liang Y., Ma X., Qi X., Xiao J., Xue W., Luo Y., Yue T. Advance on the absorption, metabolism, and efficacy exertion of quercetin and its important derivatives. *Food Frontiers*. 2020;1:420–434. DOI: 10.1002/fft2.50.

REFERENCES

1. Bernardini S., Tiezzi A., Laghezza Masci V., Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*. 2018;32(16):1926–1950. DOI: 10.1080/14786419.2017.1356838.
2. Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S., Bollinger W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 1985;228(4704):1154–1160. DOI: 10.1126/science.3890182.
3. Lahlou M. Screening of natural products for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2007;2(5):697–705. DOI: 10.1517/17460441.2.5.697.
4. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Teslov L. S., Luzhanin V. G. Review of cloudberry secondary metabolites and their biological activity. *Medical & pharmaceutical journal «Pulse»*. 2020;22(7):50–59. (In Russ.)
5. Kähkönen M., Kylli P., Ollilainen V., Salminen J.-P., Heinonen M. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(5):1167–1174. DOI: 10.1021/jf203431g.
6. Jaakkola M., Korpelainen V., Hoppula K., Virtanen V. Chemical composition of ripe fruits of *Rubus chamaemorus* L. grown in different habitats. *Journal of the science of food and agriculture*. 2012;92(6):1324–1330. DOI: 10.1002/jsfa.4705.
7. Faleva A. V., Ul'yanovskii N. V., Onuchina A. A., Falev D. I., Kosyakov D. S. Comprehensive characterization of secondary metabolites in fruits and leaves of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Metabolites*. 2023;13(5):598. DOI: 10.3390/metabo13050598.
8. Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Suvanto J., Salminen J.-P., Seppänen-Laakso T., Tähtiharju J., Honkapää K., Oksman-Caldentey K.-M. Natural antimicrobials from cloudberry (*Rubus chamaemorus)* seeds by sanding and hydrothermal extraction. *ACS Food Science & Technology*. 2021;1(5):917–927. DOI: 10.1021/acsfoodscitech.0c00109.
9. Määttä-Riihinen K. R., Kamal-Eldin A., Törrönen A. R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of Fragaria and Rubus species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(20):6178–6187. DOI: 10.1021/jf049450r.
10. Thiem B. *Rubus chamaemorus* L. – a boreal plant rich in biologically active metabolites: A review. *Biological Letters*. 2003;40(1):3–13.
11. Mcdougall G. J., Martinussen I., Junttila O., Verrall S., Stewart D. Assessing the influence of genotype and temperature on polyphenol composition in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) using a novel mass spectrometric method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(20):10860–10868. DOI: 10.1021/jf202083b.
12. Rocabado G. O., Bedoya L. M., Abad M. J., Bermejo P. *Rubus* – A review of its phytochemical and pharmacological profile. *Natural Product Communications*. 2008;3(3):423–436. DOI: 10.1177/1934578x0800300319.
13. Mahlayuk V. P. Medicinal plants in folk medicine. Saratov: Privolzhskoe book publishing house; 1991. 544 p. (In Russ.)
14. De Luca Luigi M., Norum Kaare R. Scurvy and Cloudberries: A chapter in the history of nutritional sciences. *The journal of Nutrition*. 2011;141(12):2101–2105.
15. Afrin S., Giampieri F., Gasparrini M., Forbes-Hernandez T., Varela-Lopez A., Quiles J., Mezzetti B., Battino M. Chemopreventive and therapeutic effects of edible berries: A focus on colon cancer prevention and treatment. *Molecules*. 2016;21(2):169. DOI: 10.3390/molecules21020169.
16. McDougall G. J., Ross H. A., Ikeji M., Stewart D. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(9):3016–3023. DOI: 10.1021/jf073469n.
17. Barbui T., De Stefano V., Falanga A., Finazzi G., Martinelli I., Rodeghiero F., Vannucchi A. M., Barosi G. Addressing and proposing solutions for unmet clinical needs in the management of myeloproliferative neoplasm-associated thrombosis: A consensus-based position paper. *Blood Cancer Journal*. 2019;9(8):61. DOI: 10.1038/s41408-019-0225-5.
18. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Smirnov S. N., Proksh P., Ionov N. S., Poroikov V. V., Luzhanin V. G. Phytochemical analysis of polyphenol secondary metabolites in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) Leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55:253–258.
19. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
20. Born G. G. V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927–929. DOI: 10.1038/194927b0.
21. Hai Y., Zhang Y., Liang Y., Ma X., Qi X., Xiao J., Xue W., Luo Y., Yue T. Advance on the absorption, metabolism, and efficacy exertion of quercetin and its important derivatives. *Food Frontiers*. 2020;1:420–434. DOI: 10.1002/fft2.50.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1433
УДК 543.544.943.3.068.7

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Предварительный качественный анализ растительных образцов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии на присутствие стероидных сапогенинов некоторых представителей семейств диоскорейные, бобовые, лютиковые, мелантьевые и норичниковые

А. Е. Суханов[1]✉, И. А. Крылов[1], В. В. Сепп[2], К. С. Бакулин[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава России). 163001, Россия, Архангельская область, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России). 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Суханов Антон Евгеньевич. **E-mail:** docpharmanton@hotmail.com

ORCID: А. Е. Суханов – https://orcid.org/0000-0002-6214-307X; И. А. Крылов – https://orcid.org/0000-0003-3042-4229;
В. В. Сепп – https://orcid.org/0009-0009-7055-6761; К. С. Бакулин – https://orcid.org/0009-0007-8138-7583.

Статья поступила: 27.02.2023 **Статья принята в печать:** 22.02.2024 **Статья опубликована:** 22.02.2024

Резюме

Введение. В статье представлены результаты оригинального исследования, проведенного с использованием метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), различных растительных образцов (воздушно-сухого сырья) представителей семейств диоскорейные, бобовые, лютиковые, мелантьевые, норичниковые.

Цель. Провести предварительный качественный анализ методом ВЭТСХ состава стероидных сапогенинов в гидролизованных экстрактах, полученных из растительных образцов надземных и подземных органов некоторых представителей семейств диоскорейные, бобовые, лютиковые, мелантьевые и норичниковые.

Материалы и методы. Извлечение из предварительно обезжиренного сырья проводили 50%-м водным изопропанолом (х.ч.) в ванне ультразвуковой с последующим проведением кислотного гидролиза О-гликозидных связей, упариванием и перерастворением сухого остатка в 99%-м метаноле (х.ч.); очищали от взвешенных частиц фильтрованием через фильтры с диаметром перфораций 20 мкм. ВЭТСХ проводили на аппаратном комплексе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин HPTLC Aluminium sheets Silica gel 60 F254, 20 × 20 см, которые разрезали до размера 20 × 10 см.

Результаты и обсуждение. После проведения сканирующей денситометрии при 254 нм было обнаружено, что разделение изопропанольных извлечений с последующем перерастворением в крепком метаноле в данной системе растворителей позволяет достаточно приемлемо провести разделение и идентификацию исследуемых соединений. Сравнение треков растительных экстрактов проводили со стандартными образцами стероидных сапогенинов, метанольные растворы которых наносили на одно пятно-штрих трека № 1 при условии, что они имеют различные индексы Rf и окраску после дериватизации.

Заключение. Был предварительно идентифицирован диосгенин в растительных экстрактах корневищ с корнями диоскореи ниппонской и кавказской и в семенах пажитника сенного. Сарсасапогенин верифицирован в экстрактах плодов софоры японской, тигогенин – в экстрактах семян пажитника сенного, траве прострела раскрытого и траве вероники лекарственной. Ямогенин обнаружен в экстрактах семян пажитника сенного и траве вероники лекарственной. Данная работа носит поисковый характер с оценкой присутствия тех или иных сапонинов по их сапогенинам в выбранных экстрактах. Будет оптимизирована процедура разделения в рамках ВЭТСХ и выбраны другие способы детектирования для однозначной оценки совместного присутствия изучаемых сапогенинов с примерно одинаковыми оттенками окрашивания после дериватизации и совпадающими индексами удерживания: есть пары стероидных сапогенинов, которые имеют одинаковое удерживание, мы решили сгруппировать их в смеси так, чтобы было разделение внутри группы и последующее сравнение с оригинальными экстрактами давало бы возможность идентифицировать те или иные сапогенины в таких экстрактах.

Ключевые слова: диосгенин, гитогенин, гекогенин, неорускогенин, рускогенин, сарсасапогенин, тигогенин, ямогенин, ВЭТСХ

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

Вклад авторов. А. Е. Суханов, И. А. Крылов, В. В. Сепп, К. С. Бакулин выполняли экспериментальную часть и интерпретировали результаты. Подготовили текст рукописи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке государственного задания № 056-00017-21-00 от 17.12.2021.

Для цитирования: Суханов А. Е., Крылов И. А., Сепп В. В., Бакулин К. С. Предварительный качественный анализ растительных образцов методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии на присутствие стероидных сапогенинов некоторых представителей семейств диоскорейные, бобовые, лютиковые, мелантьевые и норичниковые. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):159–174. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1433

© Суханов А. Е., Крылов И. А., Сепп В. В., Бакулин К. С., 2024
© Sukhanov A. E., Krylov I. A., Sepp V. V., Bakulin K. S., 2024

Preliminary Qualitative Analysis of Plant Samples by High-performance Thin-layer Chromatography for the Presence of Steroid Sapogenins of Some Representatives of the Dioscoreacae, Fabaceae, Ranunculaceae, Melanthiaceae, Scrophulariaceae

Anton E. Sukhanov[1]✉, Ilia A. Krylov[1], Vladislav V. Sepp[2], Konstantin S. Bakulin[2]

[1] Northern State Medical University. 51, Troitsky ave., Arkhangelsk, Arkhangelsk region, 163001, Russia
[2] N. I. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov RNRMU). 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

✉ **Corresponding author:** Anton E. Sukhanov. **E-mail:** docpharmanton@hotmail.com

ORCID: Anton E. Sukhanov – https://orcid.org/0000-0002-6214-307X; Ilia A. Krylov – https://orcid.org/0000-0003-3042-4229;
Vladislav V. Sepp – https://orcid.org/0009-0009-7055-6761; Konstantin S. Bakulin– https://orcid.org/0009-0007-8138-7583.

Received: 27.02.2023 **Revised:** 22.02.2024 **Published:** 22.02.2024

Abstract

Introduction. Results of original research carried out by means of high performance thin layer chromatography (HPTLC) of various plant samples (air-dry raw material) of Dioscoreaceae, Ranunculaceae, Fabaceae, Melanthiaceae, Scrophulariaceae families are presented in this article.

Aim. To carry out preliminary qualitative analysis by HPTLC method of steroidal sapogenins composition in hydrolyzed extracts, obtained from vegetative samples of above-ground and underground organs of some Dioscoreaceae, Ranunculaceae, Fabaceae, Melanthiaceae, Scrophulariaceae families.

Materials and methods. Extraction from pre-dehydrated raw materials was carried out with 50 % aqueous isopropanol (c.p.) in an ultrasonic bath, followed by acidic hydrolysis of O-glycoside bonds, evaporation and redissolution of dry residue in 99 % methanol (c.p.); purification from suspended solids by filtering through filters with 20 μm perforation diameter. HPTLC was performed on apparatus complex CAMAG (Switzerland) using HPTLC Aluminium sheets Silica gel 60 F254 plates 20 × 20 cm, which were cut to the size 20 × 10 cm.

Results and discussion. After scanning densitometry at 254 nm, we found that the separation of isopropanol extracts, followed by redissolution in strong methanol in this solvent system allows a fairly acceptable separation and identification of the compounds studied. Comparison of the tracks of plant extracts was performed with standard samples of steroid sapogenins, whose methanol solutions were applied to one stain-strobe of track 1, provided that they had different Rf indices and coloration after derivatization.

Conclusion. Diosgenin was identified in plant extracts of rhizomes and roots of Dioscorea nipponica and Dioscorea caucasica and in seeds of Trigonella foenum-graecum preliminarily. Sarsasapogenin was verified in extracts of fruits of Sophora japonica, tigogenin in extracts of seeds of Trigonella foenum-graecum, herb of Pulsatilla patens and herb of Veronica officinalis. Yamogenin was detected in extracts of seeds of Trigonella foenum-graecum and herb of Veronica officinalis. This work is exploratory in nature, assessing the presence of certain saponins by their sapogenins in selected extracts. We will optimize the HPLC separation procedure and choose other detection methods to unambiguously assess the co-presence of the studied sapogenins with approximately the same staining shades after derivatization and matching retention indices: there are pairs of steroidal sapogenins that have the same retention, we decided to group them in mixtures so that there would be separation within the group and subsequent comparison with the original extracts would make it possible to identify those or other sapogenins in such extracts.

Keywords: diosgenin, gitogenin, hecogenin, neoruscogenin, ruscogenin, sarsasapogenin, tigogenin, yamogenin, HPTLC

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. Anton E. Sukhanov, Ilia A. Krylov, Vladislav V. Sepp, Konstantin S. Bakulin performed the experimental part and interpreted the results. They prepared the text of the manuscript. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The work was carried out with the financial support of the state task № 056-00017-21-00 from 17.12.2021.

For citation: Sukhanov A. E., Krylov I. A., Sepp V. V., Bakulin K. S. Preliminary qualitative analysis of plant samples by high-performance thin-layer chromatography for the presence of steroid sapogenins of some representatives of the dioscoreacae, fabaceae, ranunculaceae, melanthiaceae, scrophulariaceae. *Drug development & registration*. 2024;13(1):159–174. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1433

ВВЕДЕНИЕ

Стероидные сапогенины – это агликоны (стероидные компоненты) стероидных сапонинов. По структуре стероидные сапонины и, соответственно, их сапогенины делятся на шесть групп: спиростаноловые, изоспиростаноловые, фуростаноловые, прегнановые, холестановые и эргостановые [1, 2]. Спиростаноловые сапонины и их сапогенины являются внутримолекулярными кетальными производными 16,26-дигидрокси-22-кетостероида, состоящего из 27 атомов углерода, которые формируют углеродный скелет спиростана, в котором фурановое кольцо (кольцо E) и пирановое кольцо (кольцо F) соединены в спирокетальную форму у C-22. Общая формула спиростаноловых стероидных сапонинов представлена на рисунке 1.

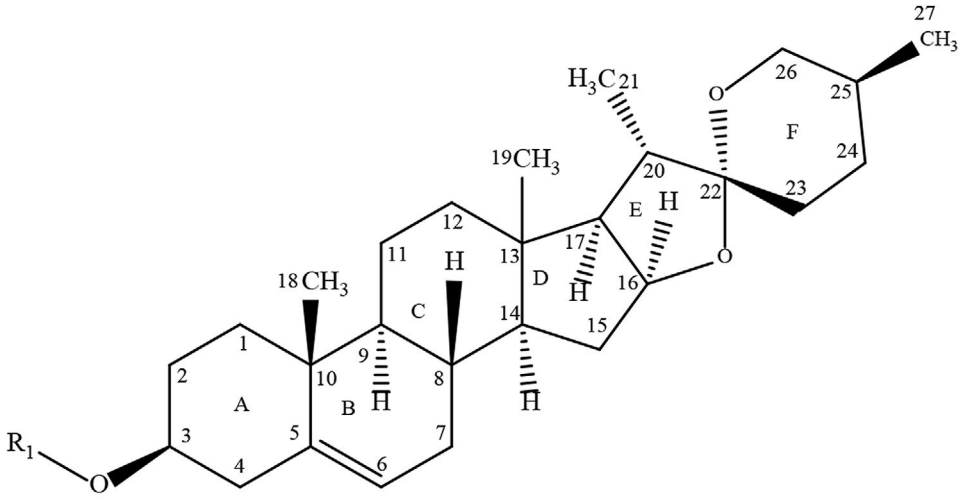


Рисунок 1. **Общая формула спиростаноловых стероидных сапонинов**

Figure 1. **General formula for spirostanol steroid saponins**

Стероидный каркас спиростаноловых агликонов находится в транс-положениях в стыках B/C и C/D, но также они могут существовать еще в трех конфигурациях A/B: 5α-H, цис-(5β-H) и Δ^5. Конфигурация при C-22 может быть двух типов: R и S. В природе обнаруживаются как 22R-, так и 22S-конфигурации у 22 атома углерода спиростаноловой системы. Что же касается стереоконфигурации молекулы при C-25, то существуют три основные конфигурации: β-ориентированная метильная группа (25S, 25L или neo), α-ориентированная метильная группа (25R, 25D или iso) и $\Delta^{25(27)}$. Соединения 25R и 25S существуют примерно в соотношении 3:1. Производные фуростанола находятся преимущественно в свежих растениях и являются предшественниками производных спиростанола. Гликозидная OH-группа при C-26 способна вступать во внутримолекулярное взаимодействие (циклизация) под воздействием β-гликозидазы [3–6].

Изоспиростаноловые сапонины и их сапогенины также являются внутримолекулярными кетальными производными 16,26-дигидрокси-22-кетостероида, состоящего из 27 атомов углерода, которые формируют углеродный скелет спиростана, в котором фурановое кольцо (кольцо E) и пирановое кольцо (кольцо F) соединены в спирокетальную форму у C-22. При этом метильная группа у C-25 расположена под плоскостью молекулы. Являются монодесмозидными гликозидами, характеризующимися наличием экваториально ориентированного метила или гидроксиметила (C-27) на F-кольце. Сапонины изоспиростанового типа по структуре сапогенинов можно разделить на четыре подтипа: диосгенин, лаксогенин, тигогенин и смилагенин. Вариации этих сапогенинов в основном включают дегидрирование между C-5 и C-6, карбонилирование при C-6, гидроксилирование при C-17 или C-27 и цис-/транс-слияние между кольцами A и B [2]. Общая формула изоспиростаноловых стероидных сапонинов представлена на рисунке 2.

Сапонины фуростанолового типа в форме гликозидов могут быть дважды гликозилированы. Нативное гликозилирование происходит по OH-гликозидным группам у C-3 и у C-26. Сапонины спиростанолового типа в форме гликозидов гликозилированы по OH-группе только лишь у C-3. Циклизация фуростанолов в спиростанолы происходит при дегидрировании OH-группы у C-22. Стероидные гликозиды лишь спиростанолового типа обладают повышенным пенообразованием, токсичностью для жабродышащих земноводных и гемолитической активностью [7]. Общая формула фуростаноловых стероидных сапонинов представлена на рисунке 3.

Стероидные сапонины и их сапогенины прегнанового типа – это C-21-стероидные сапонины с сахарным хвостом, связанным со спиртовой гидроксильной группой сапогенина, чаще всего у C-3. Общая формула прегнановых стероидных сапонинов представлена на рисунке 4.

Стероидные сапонины и их сапогенины холестанового типа. Общая формула холестановых стероидных сапонинов представлена на рисунке 5.

Стероидные сапонины и их сапогенины эргостанового типа. Общая формула эргостановых стероидных сапонинов представлена на рисунке 6.

Агликоны стероидных сапонинов – стероидные сапогенины – в свободном состоянии в растительных тканях встречаются редко. В растительных экстрактах стероидные сапогенины получают путем кислотного гидролиза O-гликозидных связей у C-3.

Как показал ряд научных исследований, стероидные гликозиды и их сапогенины, в частности диосгенин, обладают противораковым действием, оказывая цитотоксический эффект на клетки разных типов злокачественных опухолей, иммунотропным

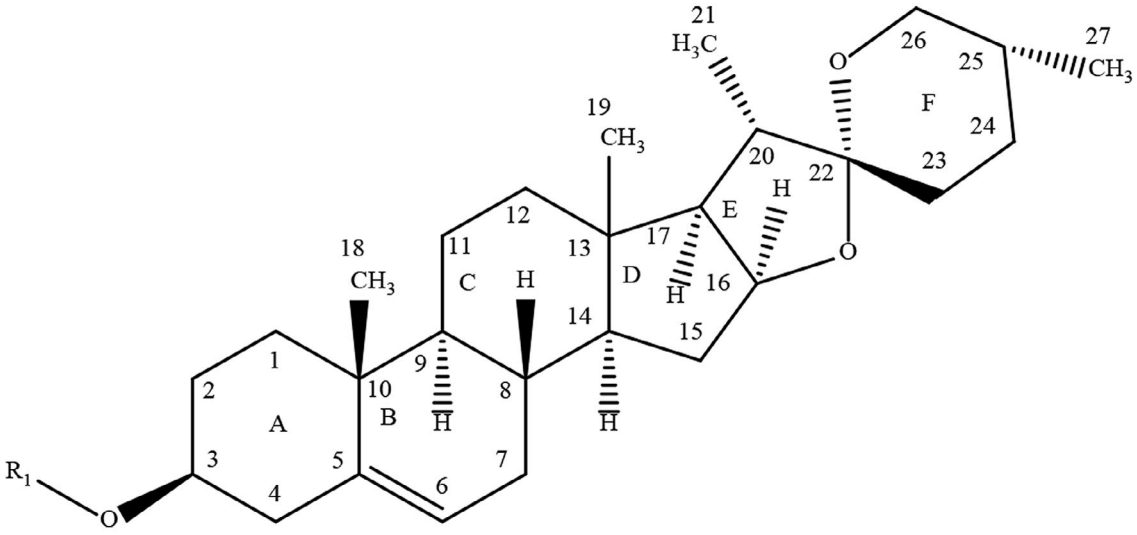


Рисунок 2. **Общая формула изоспиростаноловых стероидных сапонинов**

Figure 2. **General formula for isospirostanol steroid saponins**

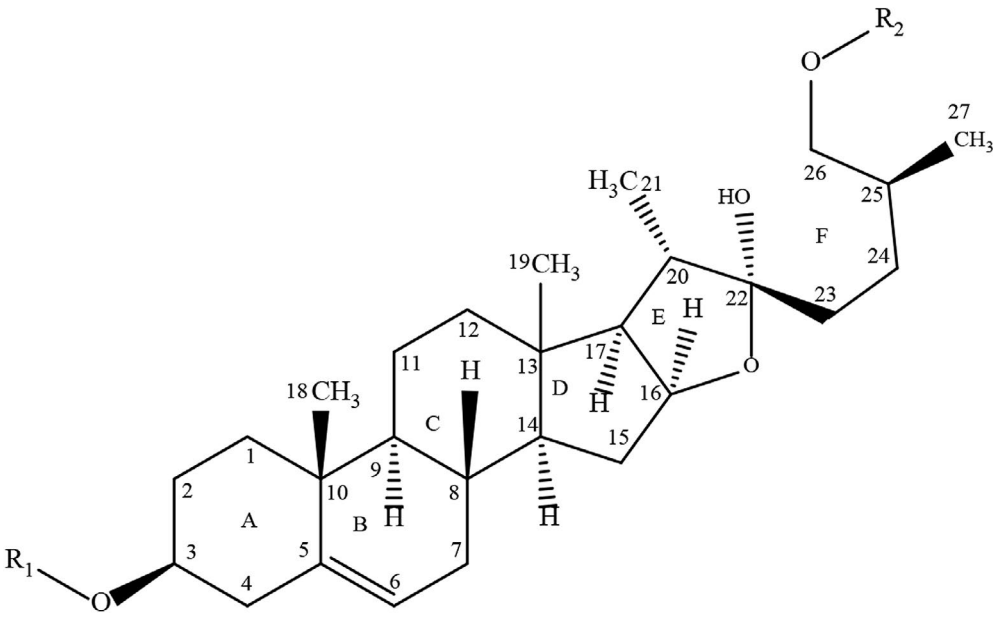


Рисунок 3. **Общая формула фуростаноловых стероидных сапонинов**

Figure 3. **General formula for furostanol steroid saponins**

действием [8–10]. Таким образом, изучение природных источников получения сапонинов и способов их выделения и очистки из нативного сырья представляется довольно актуальным.

Цель исследования – провести предварительный качественный анализ методом ВЭТСХ состава стероидных сапогенинов в гидролизованных экстрактах, полученных из растительных образцов надземных и подземных органов некоторых представителей семейств диоскорейные, бобовые, лютиковые, мелантьевые и норичниковые.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами проанализирована база данных по биомедицинским исследованиям PubMed через личный кабинет на портале EndNote (NLM)[1] с применением фильтров «any field» с использованием ключевых словосочетаний «HPTLH» и «high performance thin layer

[1] Sign in to continue with EndNote. Available at: https://www.myendnoteweb.com/EndNoteWeb.html. Accessed: 27.02.2023.

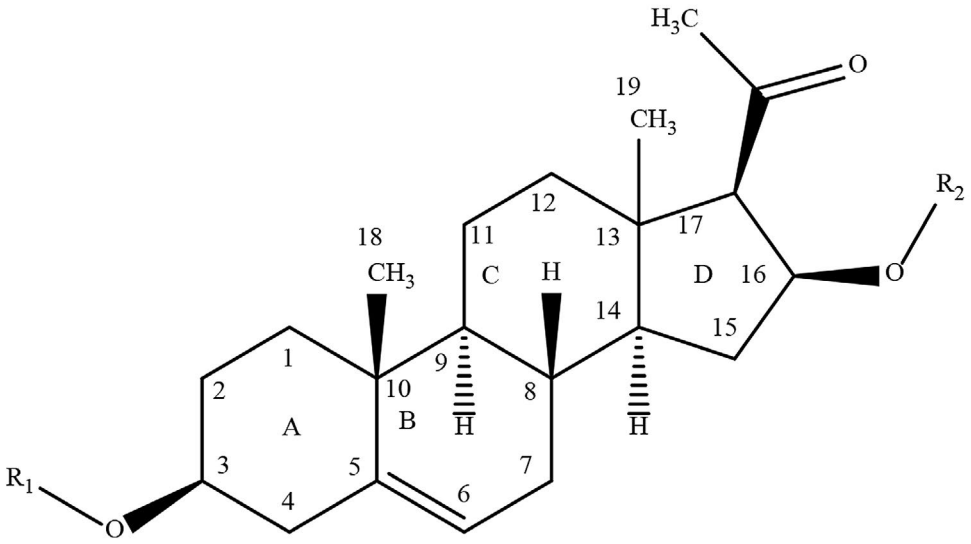


Рисунок 4. **Общая формула прегнановых стероидных сапонинов**

Figure 4. **General formula for pregnane steroid saponins**

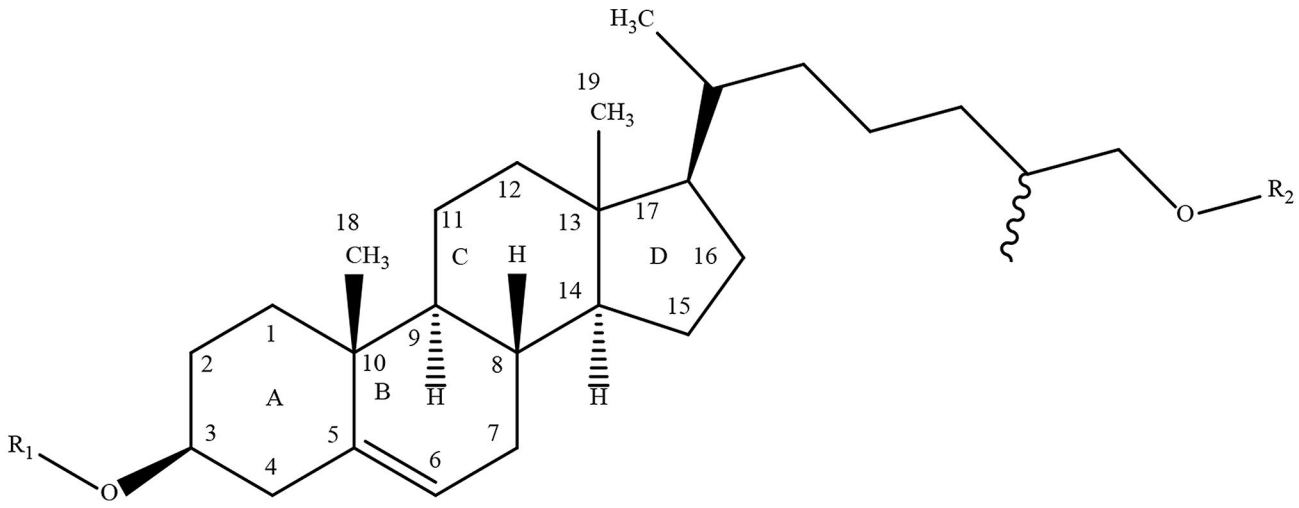


Рисунок 5. **Общая формула холестановых стероидных сапонинов**

Figure 5. **General formula for cholestane steroid saponins**

chromatography» через оператор «and» за период с 1961 по 2023 календарные годы по использованию метода ВЭТСХ при анализе растительных экстрактов на изучаемые стероидные сапогенины.

В ходе наукометрического анализа было обнаружено всего 5 научных статей по использованию ВЭТСХ при анализе экстрактов за отчетный период (таблица 1). Из них 3 статьи были посвящены изучению содержания флавоноидов и изофлавоноидов как «отпечатков пальцев» представителей данных семейств.

В качестве исходного материала исследования использовалось воздушно-сухое сырье коммерчески доступных растительных образцов: представителей семейства диоскорейные [корневища с корнями диоскореи ниппонской (серия 010417, ООО «Мариславна», Россия), кавказской (без серии, ООО «Шалфей», Россия), корни диоскореи (тамуса) обыкновенной (без серии, ООО «Шалфей», Россия)]; семейства бобовые [трава астрагала перепончатого (без серии, ООО «Беловодье», Россия), донника лекарственного (без серии, ИП Теплова К. А., Россия), козлятника лекарственного (без серии, ООО «Шалфей», Россия), корни копеечника корончатого (без серии, ООО «Беловодье», Россия), семена пажитника сенного (серия

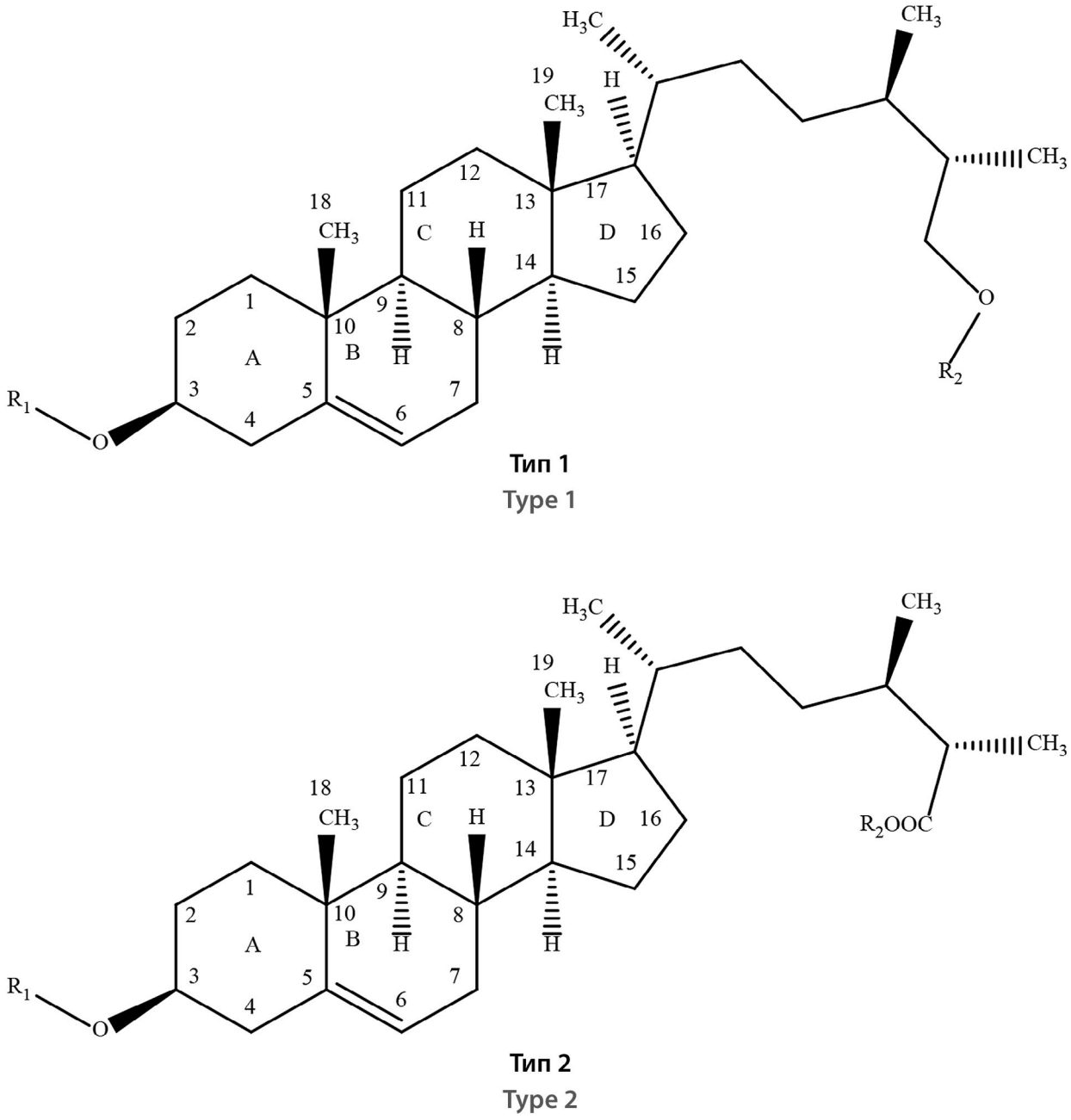


Рисунок 6. Общая формула эргостановых стероидных сапонинов

Figure 6. General formula for ergostane steroid saponins

010922, ООО «Шалфей», Россия), плоды софоры японской (без серии, ООО «Беловодье», Россия)]; семейства лютиковые [трава клопогона кистевидного (без серии, ООО «Центр-Огородник», Россия), ломоноса шестилепесткового (без серии, ООО «Старослав», Россия), прострела раскрытого (партия 0922, ООО «Компания Хорст», Россия), корневища с корнями морозника кавказского (партия 0922, ООО «Компания Хорст», Россия), пиона уклоняющегося (партия 0922 без серии, ИП Теплова К. А., Россия)]; семейства мелантьевые [корневища с корнями чемерицы Лобеля (серия 08, ООО «Старослав», Россия)]; семейства норичниковые [трава вероники лекарственной (без серии, ООО «Центр-Огородник», Россия)]. Выбор представителей данных семейств был основан на ранее проведенном наукометрическом анализе публикационной активности авторов по анализу растительных стероидных соединений базы Scopus за период с 1952 по 2015 гг. [12].

Таблица 1. Наукометрический анализ оригинальных статей по использованию ВЭТСХ на стероидные сапогенины

Table 1. Scientometric analysis of original articles on the use of HPTLC on steroidal sapogenins

Изучаемый вид растений и его сырье / The plant species under study and its raw materials	Идентифицированный стероидный сапогенин / Identified steroidal sapogenin	Индексы удерживания Rf / Retention indices Rf	Источник / References
Семейство бобовые / Family Fabaceae			
Семена пажитника сенного / Fenugreek seeds	Диосгенин / Diosgenin	0,69	[11]
	Тригонеллин / Trigonellin	0,40	

Для приготовления стандартных образцов (растворитель – метанол) использовали коммерчески доступные стандартизованные образцы стероидных сапогенинов с установленной степенью чистоты (таблица 2).

Экстракцию и первичную очистку проводили согласно описанной в научной литературе методике выделения стероидных сапонинов из растительного сырья, интенсификация процесса извлечения целевых компонентов осуществлялась за счет использования ультразвука [13]. Методика проведения экстракции: в полипропиленовую коническую пробирку с винтовой крышкой и делениями размером 17 мм на 107 мм (ООО «МиниМед», Россия) номинальным объемом 10 мл вносили навеску измельченного растительного материала массой около 0,1 г (точная навеска). С целью обезжиривания растительного материала добавляли 8 мл дихлорметана 99%-го х.ч., пробирку закрывали навинчивающейся крышкой и помещали в ультразвуковую ванну ВУ-09-Я-ФП-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия), заполненную до рекомендуемого уровня водой. Параметры озвучивания при обезжиривании: температура воды +35 °С (температура кипения 99%-го дихлорметана х.ч. – 40 °С), время озвучивания – 60 мин, резонансная частота ультразвуковых колебаний – 40 кГц. После озвучивания образцы центрифугировали на центрифуге ОПл-8-УХЛ 4.2 (ООО «ТНК Дастан», Киргизия) в течение 10 минут при 4000 об/мин. После окончания центрифугирования дихлорметановый экстракт отбрасывали, остатки в сырье удаляли путем упаривания в сухожаровом шкафу при температуре 40 °С.

В эту же пробирку помещали 2 мл 50%-го водного раствора изопропанола х.ч. на воде деионизированной. Помещали пробирку в ячейку корзины ультразвуковой ванны, заполненной водой до рекомендуемого уровня. Экстракцию стероидных сапонинов проводили тремя порциями объемом 2 мл 50%-го водного раствора изопропанола х.ч., которые после каждого озвучивания объединяли. Параметры озвучивания при экстракции: температура воды +60 °С (температура кипения 50%-го водного раствора изопропанола х.ч. – 82 °С), время озвучивания для каждой порции изопропанола – 30 мин, резонансная частота ультразвуковых колебаний – 40 кГц [14, 15].

После каждой экстракции 2 мл 50%-го раствора изопропанола х.ч. в среде ультразвука получали мутную изопропаноловую взвесь растительных тканей. Для удаления взвешенных частиц использовали центрифугирование в течение 5 минут при 4000 об/мин. Полученный изопропаноловый супернатант (надосадочную жидкость) декантировали во вторую полипропиленовую коническую пробирку с винтовой крышкой и делениями, куда декантировали последующие изопропаноловые супернатанты общим объемом 6 мл экстракта.

Для проведения кислотного гидролиза О-гликозидных связей стероидных сапонинов к 6 мл объединенного изопронаполового супернатанта приливали 6 мл смеси 3 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и 3 мл 50%-го водного раствора этанола х.ч. и выдерживали при температуре 80 °С в сухожаровом шкафу в течение 3 часов [14, 15].

ВЭТСХ выполняли на автоматизированном комплексе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин на алюминиевой фольге HPTLC Aluminium sheets Silica gel 60 F254, 20 × 20 см (Merck KGaA, Германия), которые разрезали до размера 20 × 10 см. Нанесение метанольных растворов стандартов стероидных сапогенинов, а также изопропанол-метанольных экстрактов на пластины осуществляли при помощи устройства CAMAG® Automatic TLC Sampler 4 спреевым штрихом объемом 2 мкл, длина штриха – 6 мм, распылением с шириной трека 7 мм, с отступом слева 10 мм и отступом от нижнего края пластины 8 мм. Количество треков – 18, расстояние между треками – 10 мм. Расстояние от левого края пластины: 1 трек – 15 мм, 2 трек – 25 мм, 3 трек – 35 мм, 4 трек – 45 мм, 5 трек – 55 мм, 6 трек – 65 мм, 7 трек – 75 мм, 8 трек – 85 мм, 9 трек – 95 мм, 10 трек – 105 мм, 11 трек – 115 мм, 12 трек – 125 мм, 13 трек – 135 мм, 14 трек – 145 мм, 15 трек – 155 мм, 16 трек – 165 мм, 17 трек – 175 мм, 18 трек – 185 мм. Техника разделения – восходящая.

Элюирование проводили в устройстве CAMAG® Automatic Developing Chamber 2 с блоком контроля влажности при 31,5 % (насыщенный раствор натрия хлорида), насыщение (saturation) камеры 20 мин (с фильтровальной бумагой) – 25 мл, элюирование (development) – 10 мл, сушка – 5 мин. Относительная влажность в камере – до 31,5 %. Температура в камере – 24 °С. Элюент: комплексный реагент – толуол 99,5%-й х.ч. : хлороформ 99,5%-й х.ч. : ацетон 99,5%-й х.ч. (2 : 8 : 2 по объему соответственно, или 17 мл – 66 мл – 17 мл) с насыщением камеры 20 мин. Суммарный объем – 100 мл. Дистанция фронта комплексного реагента – 70 мм от линии старта или 80 мм от нижнего края пластины.

Таблица 2. **Стандартные образцы стероидных сапогенинов**

Table 2. **Reference samples of steroid sapogenins**

Название субстанции стандартного образца стероидного сапогенина Substance name of the steroidal standard sample of sapogenin	CAS-номер CAS number	Чистота субстанции стандартного образца стероидного сапогенина по данным сертификата анализа (не менее, %) Purity of the substance of the standard sample of steroidal sapogenin according to the certificate of analysis (at least, %)	Серия (артикль, партия) стандартного образца стероидного сапогенина Series (article, batch) of steroidal sapogenin standard sample	Срок годности до Shelf life till	Производитель стандартного образца стероидного сапогенина Manufacturer of a standardized sample of the steroid sapogenin
Диосгенин Diosgenin	512-04-9	98,5	011118	Июнь 2023 June 2023	ООО «Фитопанацея» (Россия) LLC "Phytopanacea" (Russia)
		98,0	SLCG2768 / 1002901251 / D1634	Октябрь 2025 October 2025	Sigma-Aldrich (Германия) Sigma-Aldrich (Germany)
Гитогенин (Дигин) Gitogenin (Digin)	511-96-6	98,57	83855 / 103121582	Март 2025 March 2025	PhytoLab GmbH & Co. KG (Германия) PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)
Гекогенин Hecogenin	467-55-0	97,09	83508 / 81786755	Июнь 2024 June 2024	PhytoLab GmbH & Co. KG (Германия) PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)
Неорускогенин Neoruscogenin	17676-33-4	99,5	89253 / 64800353	Октябрь 2023 October 2023	PhytoLab GmbH & Co. KG (Германия) PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)
Рускогенин Ruscogenin	472-11-7	98,5	89268 / 62592745	Октябрь 2023 October 2023	PhytoLab GmbH & Co. KG (Германия) PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)
Сарсасапогенин Sarsasapogenin	126-19-2	100,0	SLCB1667 / 1002901261 / S8534	Октябрь 2025 October 2025	Sigma-Aldrich (Мексика) Sigma-Aldrich (Mexico)
Тигогенин Tigogenin	77-60-1	93,94	83916 / 112161031	Сентябрь 2025 September 2025	PhytoLab GmbH & Co. KG (Германия) PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)
Ямогенин (Неодиосгенин) Yamogenin (Neodiosgenin)	512-06-1	96,53	80634 / 115123645	Февраль 2026 February 2026	PhytoLab GmbH & Co. KG (Германия) PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany)

Дериватизацию проводили в устройстве для иммерсии CAMAG® Chromatogram Immersion Device III. Параметры: время – 1 с, скорость – 2,5 см/с. Метод – иммерсия (погружение). Комплексный реагент: кислота серная концентрированная х.ч. : вода очищенная : метанол 99,9%-й х.ч. в соотношении 20 мл : 170 мл : 10 мл соответственно. Приготовление реактива осуществляли на льду. Нагревание пластин в течение 10 мин при температуре 110 °С [16].

Оценку (детекцию) проводили в устройстве CAMAG® TLC Visualizer в двух режимах: 1) до дериватизации (developed plate) – при 254 нм и 366 нм; 2) после дериватизации (derivatized plate) – при 366 нм [17–19].

Денситометрию проводили с помощью устройства CAMAG® TLC Scanner 4 с программным обеспечением winCATS в режиме поглощения при 366 нм с дейтериевой лампой, при 254 нм с ртутной лампой. Длины волн и режим: 1) 254 нм – поглощение/отражение; 2) 366 нм – люминесценция/отражение. Размер щели – 6 × 0,45 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для экономии места расположения пятен-штрихов и увеличения количества одновременно разделенных компонентов растительных экстрактов на одной пластине 20 × 10 см на линию старта трека

№ 1 последовательно наносили растворы стандартных образцов на один трек.

Предварительно все метанольные растворы стандартных образцов разделяли на пластине с целью определения индексов Rf и цвета окраски пятен-штрихов до и после дериватизации. Хроматограмма стандартных образцов стероидных сапогенинов и двух растительных экстрактов диоскореи ниппонской и кавказской приведены на рисунке 7.

Как видно из представленного рисунка 7, схожие индексы Rf в диапазоне 0.42–0.43 и окраску после дериватизации демонстрировали следующие стандартные образцы стероидных сапогенинов: диосгенин, тигогенин, ямогенин. Схожие индексы Rf также в диапазоне 0.08–0.11, но разную окраску после дериватизации получали для следующих стандартных образцов стероидных сапогенинов: неорускогенина, рускогенина, гитогенина. Гекогенин имел значение Rf = 0.29, сарсасапогенин – значение Rf = 0.48. Индексы удерживания характерны для данной системы растворителей для элюирования: толуол 99,5%-й х.ч.: хлороформ 99,5%-й х.ч.: ацетон 99,5%-й х.ч. (2:8:2 по объему соответственно) [16] (таблица 3).

Денситограмма метанольных растворов стандартных образцов стероидных сапогенинов и изопропанол-метанольных экстрактов диоскореи ниппонской и кавказской при длине волны 366 нм представлена на рисунке 8.

Следовательно, разделение сразу всех восьми стандартов из одного пятна-штриха в данной системе растворителей не представляется возможным из-за наложения пятен и слияния окрасок. Было предложено разделять из одного пятна следующие группы метанольных растворов стандартов стероидных сапогенинов: группа № 1 – диосгенин, рускогенин, сарсасапогенин; группа № 2 – гекогенин, неорускогенин, тигогенин; группа № 3 – гитогенин и ямогенин – в данной системе растворителей для элюирования.

Таблица 3. Хроматографические параметры некоторых стандартных образцов стероидных сапогенинов

Table 3. Chromatographic parameters of some standard samples of steroidal sapogenins

Стандартный образец стероидного сапогенина Standard sample of the steroidal sapogenin	**Rf**	**Окраска после дериватизации при длине волны 366 нм** Coloration after derivatization at a wavelength of 366 nm
Диосгенин Diosgenin	0.43	Светло-синяя Light blue
Гитогенин Gitogenin	0.11	Темно-синяя Dark blue
Гекогенин Hecogenin	0.29	Синяя Blue
Неорускогенин Neoruscogenin	0.08	Грязно-фиолетовая Dirty purple
Рускогенин Ruscogenin	0.09	Грязно-желтая Dirty yellow
Сарсасапогенин Sarsasapogenin	0.48	Грязно-синяя Dark blue
Тигогенин Tigogenin	0.42	Грязно-синяя Dark blue
Ямогенин Yamogenin	0.43	Темно-синяя Dark blue

Трек № 1 принадлежит группам метанольных растворов стандартных образцов стероидных сапогенинов, наносимых по группам на разные пластины.

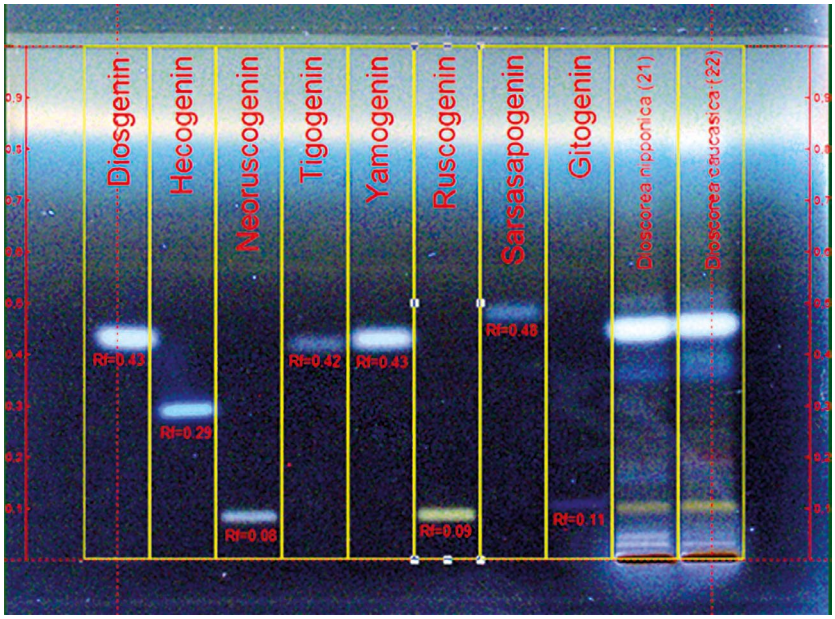


Рисунок 7. Хроматограмма метанольных растворов стандартных образцов стероидных сапогенинов и изопропанол-метанольных экстрактов диоскореи ниппонской и кавказской при длине волны 366 нм после дериватизации

Figure 7. Chromatogram of methanol solutions of standard samples of steroid sapogenins and isopropanol-methanol extracts of Dioscorea nipponica and Dioscorea caucasica at a wavelength of 366 nm after derivatization

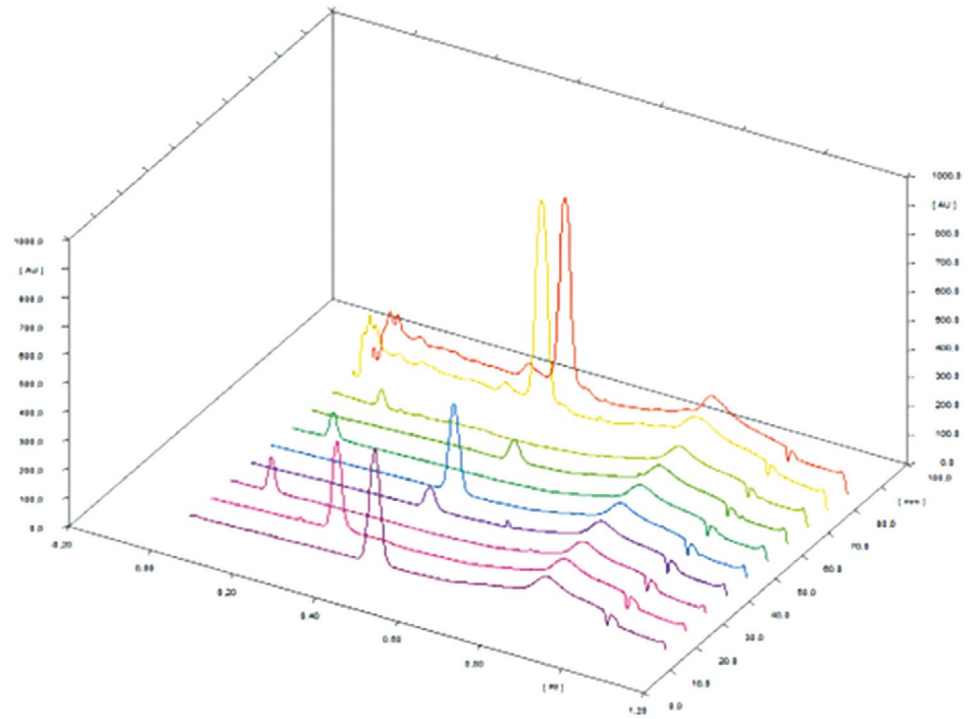


Рисунок 8. Денситограмма метанольных растворов стандартных образцов стероидных сапогенинов и изопропанол-метанольных экстрактов диоскореи ниппонской и кавказской при длине волны 366 нм после дериватизации

Figure 8. Densitogram of methanol solutions of standard samples of steroid sapogenins and isopropanol-methanol extracts of Dioscorea nipponica and Dioscorea caucasica at a wavelength of 366 nm after derivatization

Треки № 2 и 3 принадлежат представителям семейства диоскорейные: трек № 2 – изопропанол-метанольному экстракту корневищ с корнями диоскореи ниппонской, трек № 3 – корневищ с корнями диоскореи кавказской.

Треки с номерами с 4-го по 10-й принадлежат представителям семейства бобовые: трек № 4 – экстракту корня диоскореи обыкновенной, трек № 5 – травы астрагала перепончатого, трек № 6 – травы донника лекарственного, трек № 7 – травы козлятника лекарственного, трек № 8 – корней копеечника корончатого, трек № 9 – семян пажитника сенного, трек № 10 – плодов софоры японской.

Треки с номерами с 11-го по 15-й принадлежат представителям семейства лютиковые: трек № 11 – экстракту травы клопогона кистевидного, трек № 12 – травы ломоноса шестилепесткового, трек № 13 – корневищ с корнями морозника кавказского, трек № 14 – корневищ с корнями пиона уклоняющегося, трек № 15 – травы прострела раскрытого.

Трек № 16 принадлежит экстракту корневищ с корнями чемерицы Лобеля (сем. мелантьевые), трек № 17 – экстракту трав вероники лекарственной (сем. норичниковые).

Анализируя хроматограммы изопропанол-метанольных экстрактов растительных образцов до дериватизации при длинах волн 254 и 366 нм по трем хроматограммам с тремя отдельными группами стандартов стероидных сапогенинов, мы не обнаружили существенных различий в расположении пятен-штрихов «балластных» соединений и отсутствие пятен-штрихов стандартов стероидных сапогенинов по треку № 1 (рисунки 9 и 10).

После дериватизации с группой стандартов № 1 (диосгенин, рускогенин, сарсасапогенин) по треку № 1 четко обозначились три пятна-штриха соответствующих стандартов: внизу – грязно-желтого цвета стандарт рускогенина, среднее, более яркое пятно-штрих светло-синего цвета – диосгенин и верхнее пятно-штрих грязно-синего цвета – сарсасапогенин (рисунок 11).

Как следует из рисунка 11 и рисунка 12, из представленных хроматограмм и денситограмм изопропанол-метанольных растительных экстрактов, диосгенин, гитогенин и ямогенин (возможно, вместе) содержат только три экстракта на треках № 2, 3, 9, так как три соединения имеют схожие Rf и схожие окраски. Причем на треках 2 и 3 пятна диосгенина наиболее отчётливо выражены и практически одинаковы по интенсивности, что еще раз подтверждает, что корневища с корнями диоскореи ниппонской и кавказской являются источниками получения природного диосгенина [9]. Трек 9 принадлежит экстракту семян пажитника сенного. Из литературных источников известно, что семена пажитника сенного являются также природным источником диосге-

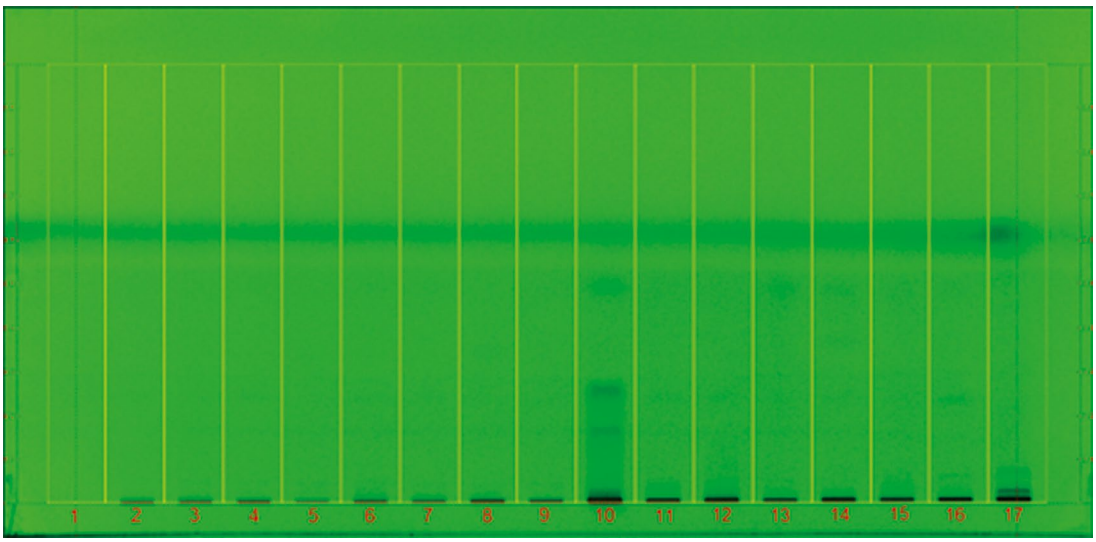


Рисунок 9. **Хроматограмма пятен-штрихов изопропанол-метанольных растительных экстрактов при длине волны 254 нм до дериватизации**

Figure 9. **Chromatogram of spots-strokes of isopropanol-methanol plant extracts at a wavelength of 254 nm before derivatization**

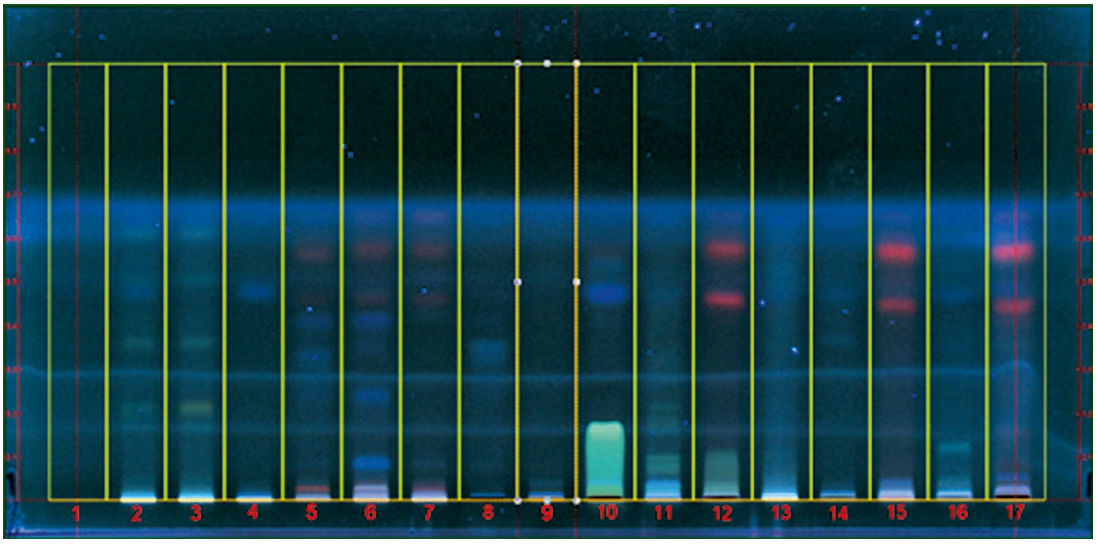


Рисунок 10. **Хроматограмма пятен-штрихов изопропанол-метанольных растительных экстрактов при длине волны 366 нм до дериватизации**

Figure 10. **Chromatogram of spots-strokes of isopropanol-methanol plant extracts at a wavelength of 366 nm before derivatization**

нина [9]. На треке 10, принадлежащем экстракту софоры японской, визуализируется бледное грязно-фиолетовое пятно, принадлежащее сарсасапогенину. Пятно рускогенина имеет грязно-желтый цвет. Ни в одном из изучаемых экстрактов не было детектировано данное вещество. На денситограмме, представленной на рисунке 15, присутствует пик на треке № 6 для экстракта травы донника лекарственного, но визуализируемое пятно имеет темно-синий цвет, Rf данного пятна совпадает с индексом Rf рускогенина.

После дериватизации с группой стандартов № 2 (гекогенин, неорускогенин, тигогенин) по треку № 1 были четко определены три пятна-штриха соответствующих стандартов: внизу – грязно-желтого цвета стандарт неорускогенина, среднее, более яркое пятно-штрих синего цвета – гекогенин и верхнее пятно-штрих грязно-синего цвета – тигогенин (рисунок 13).

Как следует из рисунка 13 и рисунка 14, из представленных хроматограмм и денситограмм изопропанол-метанольных растительных экстрактов, тигогенин, диосгенин и ямогенин (возможно, вместе) содержат экстракты на треках № 9, 15 и 17, принадлежащие семенам пажитника сенного, траве пролеска раскрытого и вероники лекарственной соответственно, так как три данных соединения имеют схожие Rf и схожие окраски.

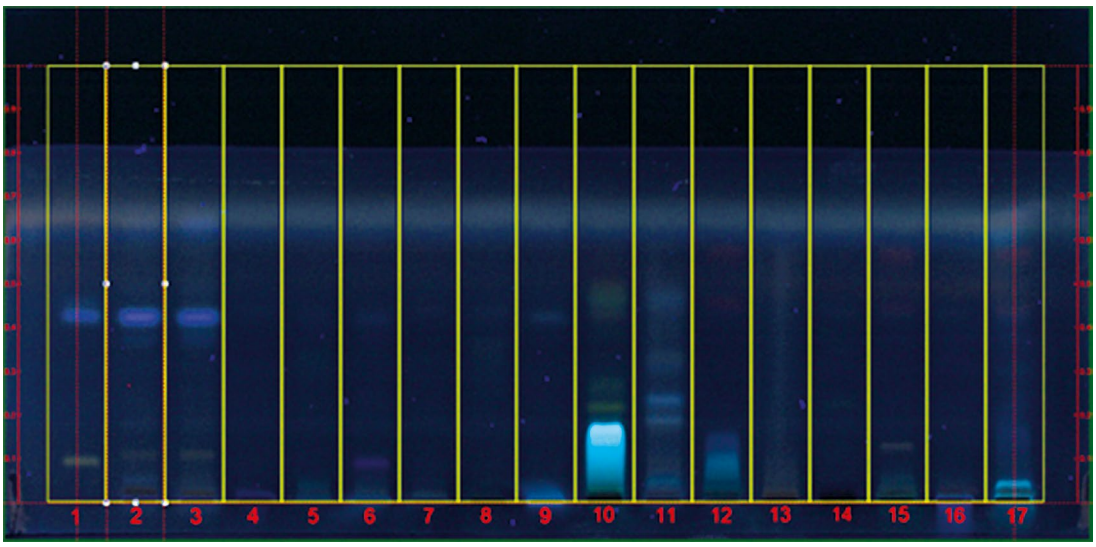


Рисунок 11. **Хроматограмма пятен-штрихов метанольных растворов диосгенина, рускогенина и сарсасапогенина и изопропанол-метанольных растительных экстрактов при длине волны 366 нм после дериватизации**

Figure 11. **Chromatogram of streak spots of methanol solutions of diosgenin, ruscogenin and sarsasapogenin and isopropanol-methanol plant extracts at a wavelength of 366 nm after derivatization**

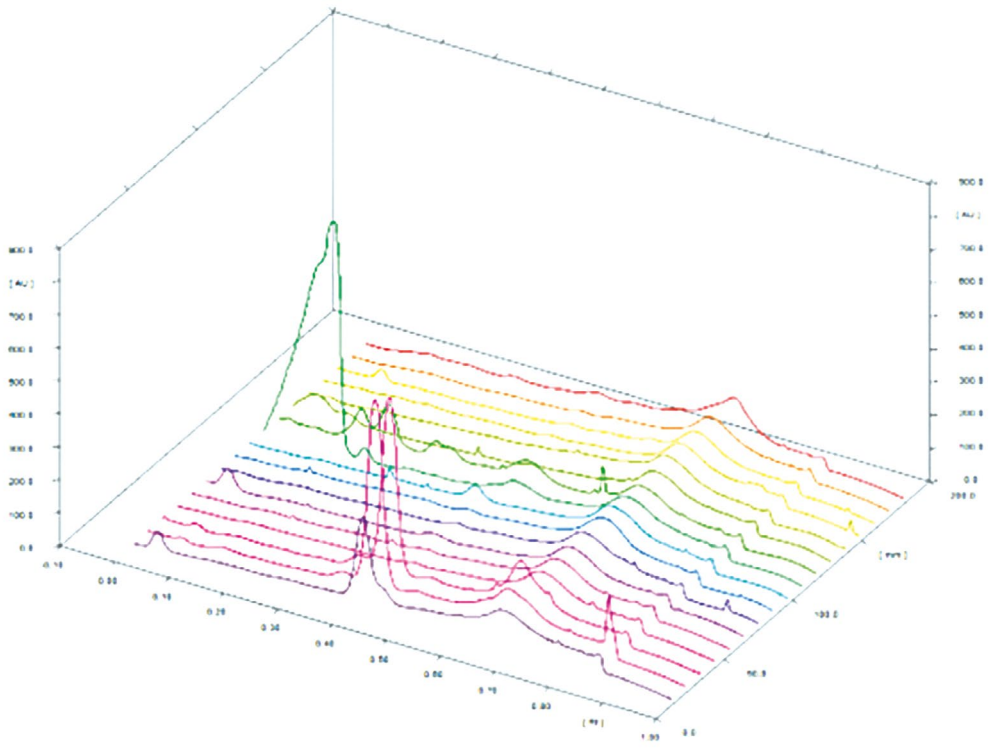


Рисунок 12. **Денситограмма метанольных растворов диосгенина, рускогенина и сарсасапогенина и изопропанол-метанольных растительных экстрактов при длине волны 366 нм после дериватизации**

Figure 12. **Densitogram of methanol solutions of diosgenin, ruscogenin and sarsasapogenin and isopropanol-methanol plant extracts at a wavelength of 366 nm after derivatization**

Причем пятна-штрихи тигогенина на хроматограмме на треках 15 и 17 слабо заметны. Идентификацию в таких случаях помогает произвести денситограмма (см. рисунок 8). Гекогенин во всех исследуемых экстрактах не детектируется. Пятна-штрихи неорускогенина на треках экстрактов отсутствуют. На денситограмме (см. рисунок 14) присутствует пик на треке № 6 для экстракта травы донника лекарственного, но визуализируемое пятно имеет темно-синий цвет, Rf данного пятна совпа-

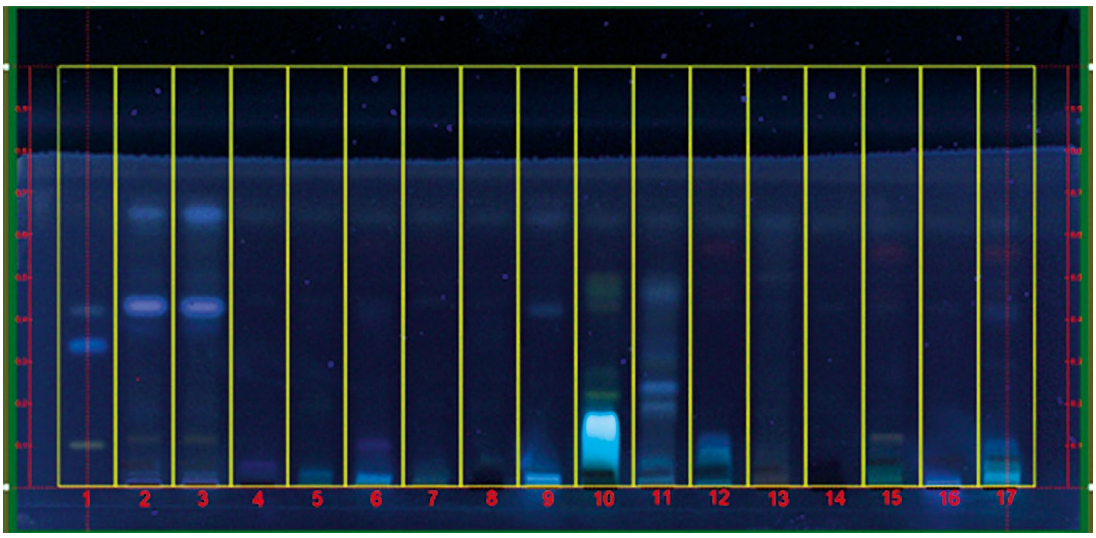


Рисунок 13. **Хроматограмма пятен-штрихов метанольных растворов гекогенина, нерускогенина и тигогенина и изопропанол-метанольных растительных экстрактов при длине волны 366 нм после дериватизации**

Figure 13. **Chromatogram of streak spots of methanol solutions of hecogenin, neruscogenin and tigogenin and isopropanol-methanol plant extracts at a wavelength of 366 nm after derivatization**

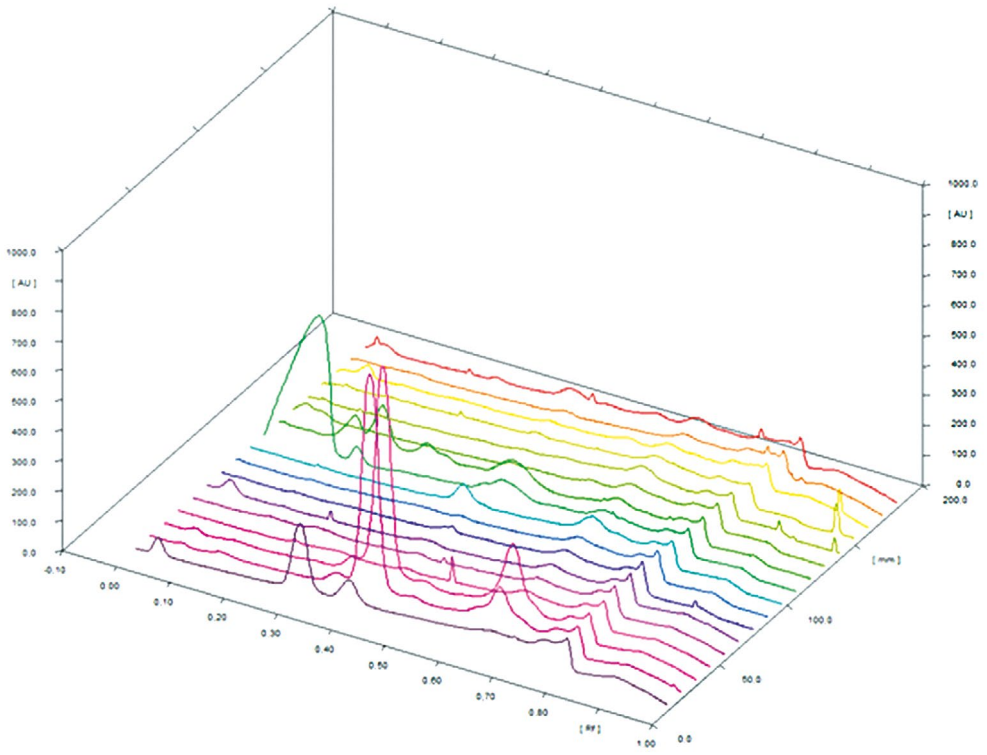


Рисунок 14. **Денситограмма метанольных растворов гекогенина, неорускогенина и тигогенина и изопропанол-метанольных растительных экстрактов при длине волны 366 нм после дериватизации**

Figure 14. **Densitogram of methanol solutions of hecogenin, neoruscogenin and tigogenin and isopropanol-methanol plant extracts at a wavelength of 366 nm after derivatization**

дает с индексом Rf рускогенина. Также отмечено совпадение Rf с нечетким пятном светло-голубого цвета на треке № 10, принадлежащим экстракту плодов софоры японской, но по цвету данное пятно не совпадает с пятном неорускогенина.

После дериватизации с группой стандартов № 3 (гитогенин, ямогенин) по треку № 1 обозначилось два пятна: нижнее – слабо заметное, темно-синего цвета, принадлежащее гитогенину и верхнее – четко выраженное голубое пятно ямогенина (рисунок 15).

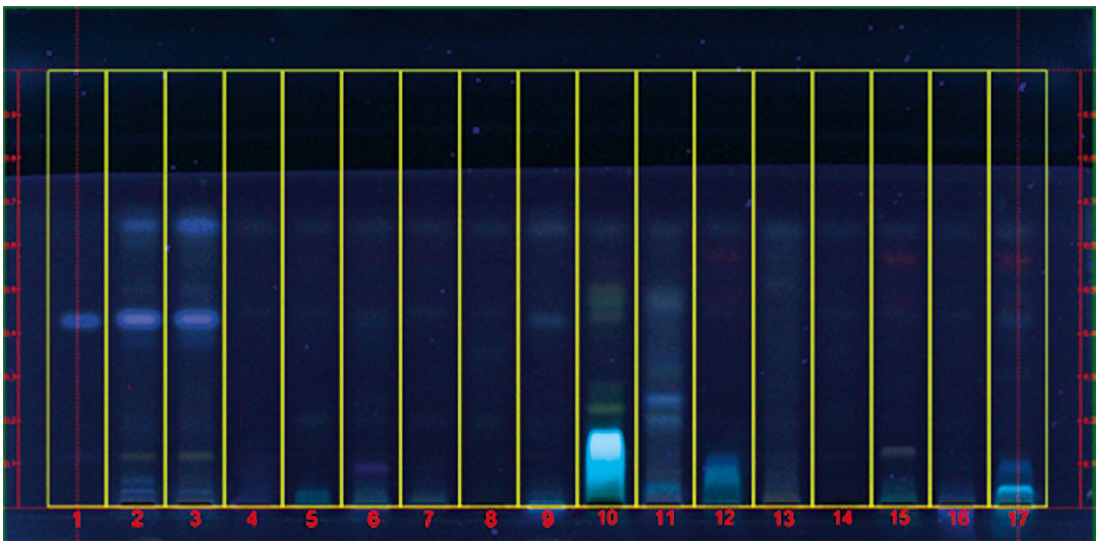


Рисунок 15. **Хроматограмма пятен-штрихов метанольных растворов гитогенина, ямогенина и изопропанол-метанольных растительных экстрактов при длине волны 366 нм после дериватизации**

Figure 15. **Chromatogram of streak spots of methanol solutions of gitogenin, yamogenin and isopropanol-methanol plant extracts at a wavelength of 366 nm after derivatization**

Пятно ямогенина на треке № 1 (рисунки 15, 16) имеет темно-синий цвет и практически совпадает с индексами удерживания диосгенина, которому соответствуют пятна-штрихи синего цвета на треках № 2 и 3, принадлежащих экстрактам корневищ с корнями диоскореи ниппонской и кавказской. Пятно ямогенина слабо заметно и плохо верифицируется на треках № 9 и 17, соответствующих экстрактам семян пажитника сенного и траве вероники лекарственной. Пятно-штрих гитогенина имеет грязно-фиолетовый цвет и не верифицируются на треках растительных экстрактов. Однако пятно грязно-желтого цвета

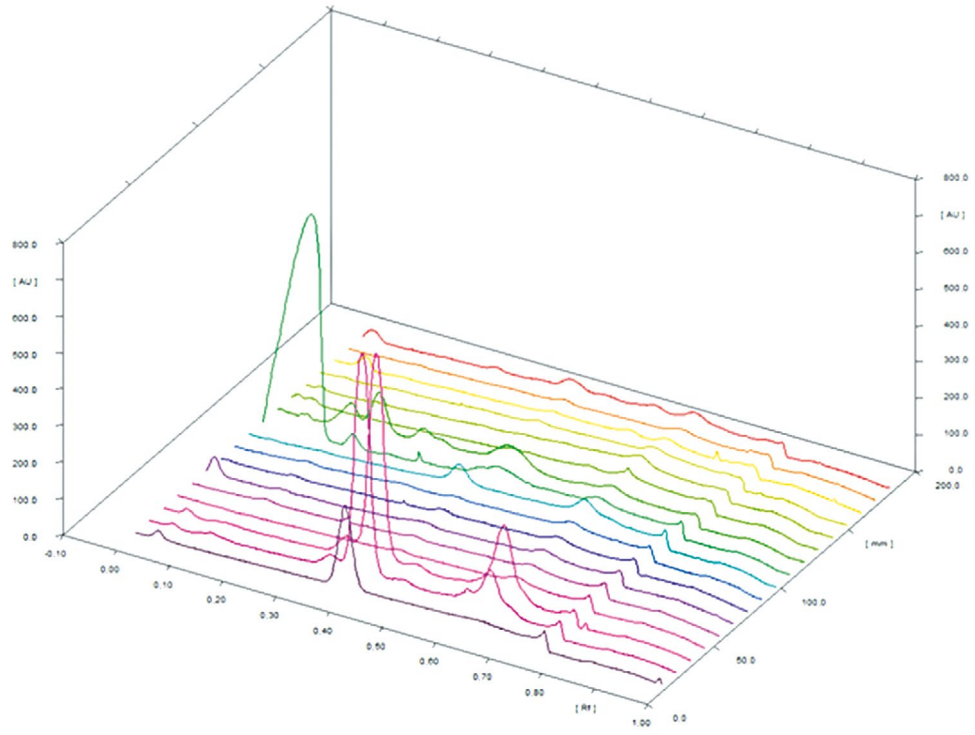


Рисунок 16. **Денситограмма метанольных растворов гитогенина и ямогенина и изопропанол-метанольных растительных экстрактов при длине волны 366 нм после дериватизации**

Figure 16. **Densitogram of methanol solutions of gitogenin and yamogenin and isopropanol-methanol plant extracts at a wavelength of 366 nm after derivatization**

с одинаковым с гитогенином Rf обнаружено на треке № 15, соответствующем экстракту травы прострела раскрытого, но имеет иное окрашивание.

Таким образом, были предварительно идентифицированы диосгенин, тигогенин и ямогенин (возможно, при совместном присутствии) в изопропанол-метанольных растительных экстрактах корневищ с корнями диоскореи ниппонской и кавказской и в семенах пажитника сенного. Сарсасапогенин верифицирован в экстрактах плодов софоры японской, тигогенин – в экстрактах семян пажитника сенного, траве прострела раскрытого и траве вероники лекарственной. Ямогенин был обнаружен в экстрактах семян пажитника сенного и траве вероники лекарственной. Не были идентифицированы методом ВЭТСХ в исследуемом ЛРС следующие сапогенины: рускогенин, неорускогенин и гитогенин. В отдельных спорных случаях при совпадении индексов удерживания идентифицировали соединения на основании окраски пятен-штрихов, а при слабо заметных пятнах-штрихах на хроматограмме – на основании денситограмм пятен, а также с помощью детекции другими методами физико-химических исследований.

Данная работа носит поисковый характер с оценкой присутствия тех или иных сапонинов по их сапогенинам в выбранных экстрактах. Будет оптимизирована процедура разделения в рамках ВЭТСХ и выбраны другие способы детектирования для однозначной оценки совместного присутствия изучаемых сапогенинов с примерно одинаковыми оттенками окрашивания после дериватизации и совпадающими индексами удерживания: есть пары стероидных сапогенинов, которые имеют одинаковое удерживание, мы решили сгруппировать их в смеси так, чтобы было разделение внутри группы и последующее сравнение с оригинальными экстрактами давало бы возможность идентифицировать те или иные сапогенины в таких экстрактах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu Z.-H., Yan H., Liu H.-Y. Chemical constituents and their bioactivities of plants of Taccaceae. *Chemistry and Biodiversity*. 2015;12:221–238. DOI: 10.1002/cbdv.201300353.
2. Tian L.-W., Zhang Z., Long H.-L., Zhang Y. J. Steroidal saponins from the genus Smilax and their biological activities. *Natural products and bioprospecting*. 2017;7:283–298. DOI: 10.1007/s13659-017-0139-5.
3. Agrawal P. K. 25R/25S stereochemistry of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring-F. *Magnetic resonance in chemistry*. 2003;41(11):965–968. DOI: 10.1002/MRC.1278.
4. Agrawal P. K. A systematic NMR approach for the determination of the molecular structure of steroidal saponins. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996;405:299–315. DOI: 10.1007/978-1-4613-0413-5_26.
5. Agrawal P. K. Assigning stereodiversity of the 27-Me group of furostane-type steroidal saponins via NMR chemical shifts. *Steroids*. 2005;70(10):715–724. DOI: 10.1016/j.steroids.2005.04.001.
6. Agrawal P. K., Burkholz T., Jacob C. Revisit to 25R/25S stereochemical analysis of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via 1H NMR chemical shift data. *Natural product communications*. 2012;7(6):709–711. DOI: 10.1177/1934578X1200700605.
7. Diab Y., Ioannou E., Emam A., Vagias C., Roussis V. Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from Yucca desmettiana. *Steroids*. 2012;77(6):686–690. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.02.014.
8. Michalak O., Krzeczyński P., Cieślak M., Cmoch P., Cybulski M., Królewska-Golińska K., Kaźmierczak-Barańska J., Trzaskowski B., Ostrowska K. Synthesis and anti-tumour, immunomodulating activity of diosgenin and tigogenin conjugates. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2020;198:105573. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105573.
9. Sun G. C., Jan C. R., Liang W. Z. Exploring the impact of a naturally occurring sapogenin диосгенин on underlying mechanisms of Ca2+ movement and cytotoxicity in human prostate cancer cells. *Environmental toxicology*. 2020;35(3):395–403. DOI: 10.1002/tox.22876.
10. Васильева И. С., Пасешниченко В. А. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность. *Успехи биологической химии*. 2000;40:153–204.
11. Laila O., Murtaza I., Muzamil S., Ali S. I., Ali S. A., Paray B. A., Gulnaz A., Vladulescu C., Mansoor S. Enhancement of nutraceutical and anti-diabetic potential of fenugreek (Trigonella foenum-graecum). Sprouts with natural elicitors. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(1):1–13. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.11.00.
12. Суханов А. Е., Буюклинская О. В., Коптяева Р. Г. Стероидные соединения растительного происхождения: наукометрическое исследование данных научно-практической литературы. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2017;13(1):14–21.
13. Стекольщикова А. А. Новые подходы к идентификации и определению сапонинов растений методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Дисс. ... канд. хим. наук. М.; 2018.
14. Stavrianidi A. N., Stekolshchikova E. A., Turova P. N., Rodin I. A., Shpigun O. A. Quantitative analysis of a multicomponent system for liquid chromatography–mass spectrometry determination of diosgenin, dioscin and protodioscin in plant extracts of Tribulus terrestris, 2017. *Moscow university chemistry bulletin*. 2017;72:144–153. DOI: 10.3103/S0027131417030063.
15. Sarvin B., Stekolshikova E. A., Rodin I. A., Stavrianidi A. N., Shpigun O. A. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from T. terrestris. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*. 2018;8:75–82. DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.12.002.
16. Jork H., Werner F., Fischer W., Wimmer H. Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Volume I. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I Thin layer chromatography. Weinheir: Wiley-VCH; 1990. 464 p. DOI: 10.1016/s0003-2670(00)83962-8.
17. Sastre F., Ferreira F., Pedreschi F. TLC fingerprint of phenolics and saponins in commercial extracts of Yucca schidigera Roezl. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2016;39(15):698–701. DOI: 10.1080/10826076.2016.1234393.
18. Singh R., Kharat S. N., Mendhulkar V. D. Chromatographic analysis for «Diosgenin» content in *Abutilon indicum* L. sweet. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2016;8(2):178–182.
19. Suja S., Sivakala S. Phytochemical, purification and spectral analysis of compounds from root tuber extract of *Asparagus racemosus* (Willd). *Materials Today: Proceedings*. 2021;41(3):618–621. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.05.262.

REFERENCES

1. Liu Z.-H., Yan H., Liu H.-Y. Chemical constituents and their bioactivities of plants of Taccaceae. *Chemistry and Biodiversity*. 2015;12:221–238. DOI: 10.1002/cbdv.201300353.

2. Tian L.-W., Zhang Z., Long H.-L., Zhang Y. J. Steroidal saponins from the genus Smilax and their biological activities. *Natural products and bioprospecting*. 2017;7:283–298. DOI: 10.1007/s13659-017-0139-5.
3. Agrawal P. K. 25R/25S stereochemistry of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring-F. *Magnetic resonance in chemistry*. 2003;41(11):965–968. DOI: 10.1002/MRC.1278.
4. Agrawal P. K. A systematic NMR approach for the determination of the molecular structure of steroidal saponins. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996;405:299–315. DOI: 10.1007/978-1-4613-0413-5_26.
5. Agrawal P. K. Assigning stereodiversity of the 27-Me group of furostane-type steroidal saponins via NMR chemical shifts. *Steroids*. 2005;70(10):715–724. DOI: 10.1016/j.steroids.2005.04.001.
6. Agrawal P. K., Burkholz T., Jacob C. Revisit to 25R/25S stereochemical analysis of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via 1H NMR chemical shift data. *Natural product communications*. 2012;7(6):709–711. DOI: 10.1177/1934578X1200700605.
7. Diab Y., Ioannou E., Emam A., Vagias C., Roussis V. Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from Yucca desmettiana. *Steroids*. 2012;77(6):686–690. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.02.014.
8. Michalak O., Krzeczyński P., Cieślak M., Cmoch P., Cybulski M., Królewska-Golińska K., Kaźmierczak-Barańska J., Trzaskowski B., Ostrowska K. Synthesis and anti-tumour, immunomodulating activity of diosgenin and tigogenin conjugates. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2020;198:105573. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105573.
9. Sun G. C., Jan C. R., Liang W. Z. Exploring the impact of a naturally occurring sapogenin диосгенин on underlying mechanisms of Ca2+ movement and cytotoxicity in human prostate cancer cells. *Environmental toxicology*. 2020;35(3):395–403. DOI: 10.1002/tox.22876.
10. Vasilyeva I. S., Paseshnichenko V. A. Steroid glycosides of plants and dioscorea cell cultures, their metabolism and biological activity. *Advances in biological chemistry*. 2000;40:153–204. (In Russ.)
11. Laila O., Murtaza I., Muzamil S., Ali S. I., Ali S. A., Paray B. A., Gulnaz A., Vladulescu C., Mansoor S. Enhancement of nutraceutical and anti-diabetic potential of fenugreek (Trigonella foenum-graecum). Sprouts with natural elicitors. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2023;31(1):1–13. DOI: 10.1016/j.jsps.2022.11.00.
12. Sukhanov A. E., Buyuklinskaya O. V., Koptyaeva R. G. Steroid compounds of plant origin: a scientometric study of the data of scientific and practical literature. *Saratov Scientific and Medical Journal*. 2017;13(1):14–21. (In Russ.)
13. Stekolshchikova A. A. Novel approaches to identifying and defining plant saponins by high-performance liquid chromato-mass spectrometry. [Dissertation.] Moscow; 2018. (In Russ.)
14. Stavrianidi A. N., Stekolshchikova E. A., Turova P. N., Rodin I. A., Shpigun O. A. Quantitative analysis of a multicomponent system for liquid chromatography–mass spectrometry determination of diosgenin, dioscin and protodioscin in plant extracts of Tribulus terrestris, 2017. *Moscow university chemistry bulletin*. 2017;72:144–153. DOI: 10.3103/S0027131417030063.
15. Sarvin B., Stekolshikova E. A., Rodin I. A., Stavrianidi A. N., Shpigun O. A. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from T. terrestris. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*. 2018;8:75–82. DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.12.002.
16. Jork H., Werner F., Fischer W., Wimmer H. Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Volume I. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I Thin layer chromatography. Weinheir: Wiley-VCH; 1990. 464 p. DOI: 10.1016/s0003-2670(00)83962-8.
17. Sastre F., Ferreira F., Pedreschi F. TLC fingerprint of phenolics and saponins in commercial extracts of Yucca schidigera Roezl. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2016;39(15):698–701. DOI: 10.1080/10826076.2016.1234393.
18. Singh R., Kharat S. N., Mendhulkar V. D. Chromatographic analysis for «Diosgenin» content in *Abutilon indicum* L. sweet. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2016;8(2):178–182.
19. Suja S., Sivakala S. Phytochemical, purification and spectral analysis of compounds from root tuber extract of *Asparagus racemosus* (Willd). *Materials Today: Proceedings*. 2021;41(3):618–621. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.05.262.

АНАЛИТИКА ЭКСПО

22-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

16–18.04.2024

Москва, Крокус Экспо

Получите билет

analitikaexpo.com

ITE ОРГАНИЗАТОР ORGANISER

0+

Ваш промокод

pharmjournal

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1491
UDC 546.05

Check for updates

CC BY 4.0

Research article / Оригинальная статья

Antibacterial and Chemical Properties of Sr-BDC$_\infty$ Metal-Organic Framework (MOF)

Andrey A. Vodyashkin[1]✉, Parfait Kezimana[2], Joseph Arsene A. Mbarga[2], Maria Y. Putirskaya[2], Yaroslav M. Stanishevskiy[2]

[1] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Bauman Moscow State Technical University". 5/1, 2nd Baumanskaya str., Moscow, 105005, Russia
[2] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Andrey A. Vodyashkin. **E-mail:** av.andrey2013@yandex.ru

ORCID: Andrey A. Vodyashkin – https://orcid.org/0000-0003-1556-7635; Parfait P. Kezimana – https://orcid.org/0000-0002-1682-6128;
Joseph Arsene A. Mbarga – https://orcid.org/0000-0001-9626-9247; Maria Y. Putirskaya – https://orcid.org/0009-0005-9485-8650;
Yaroslav M. Stanishevskiy – https://orcid.org/0000-0002-4248-2453.

Received: 29.05.2023 **Revised:** 10.01.2024 **Published:** 12.01.2024

Abstract

Introduction. In this work, Sr-BDC MOFs were obtained by a simple solvothermal process without the use of elevated pressure. This method is easily scalable and does not require any special equipment. In this work, the crystals obtained from the synthesis were studied by Raman spectroscopy. In addition, the obtained materials were analysed for antibacterial activity against Gram-positive and against Gram-negative bacteria.

Aim. During this work, the main objective was to comparatively evaluate the antibacterial properties of Sr-BDC MOFs activated by different methods (and without activation).

Materials and methods. In this work we used a solvothermal process using terephthalic acid, strontium nitrate and dimethylformamide. The peculiarity of this method is the absence of autoclaving in the synthesis process. Optical microscopy and Raman spectroscopy were used for characterization. Also, to study the antibacterial properties, a medium diffusion test was performed. The combination of these methods will help to establish the relationship between the method of activation and the biological activity of the resulting materials.

Results and discussion. In this work, the chemical structure of Sr-BDC MOFs was studied by Raman spectroscopy. The influence of the activation method on the chemical structure of MOFs was studied. It was found that the characteristic peaks of Raman spectroscopy can be used to confirm the removal of solvent (DMFA) from the crystal structure. In addition, tests on the manifestation of antibacterial activity were carried out for MOFs with different activation method. The MIC and MBC were established for each sample.

Conclusion. In the course of the work the effect of the activation method on the chemical structure of Sr-BDC MOFs was shown. We also found that the activation method could affect the biological activity of the obtained MOFs. It was also demonstrated that MOFs exhibit different antibacterial activities depending on the type of bacteria, which can be primarily related to the composition of the cell wall of microorganisms.

Keywords: metal-organic framework (MOF), antibacterial properties, MOFs' characterization, Raman spectroscopy, Strontium, Sr-BDC MOFs, solvothermal method, terephthalic 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. Andrey A. Vodyashkin designed the course of the experiment. Andrey A. Vodyashkin, Joseph Arsene A. Mbarga and Maria Y. Putirskaya conducted the experiments (Andrey A. Vodyashkin – synthesis and post-synthetic modification. Maria Y. Putirskaya Raman spectroscopy. Joseph Arsene A. Mbarga – antibacterial activity). Andrey A. Vodyashkin and Parfait Kezimana prepared the manuscript and author Y. M. Stanishevskiy proofread it. All the authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The publication has been prepared with the support of the «RUDN University Strategic Academic Leadership Program».

For citation: Vodyashkin A. A., Kezimana P., Mbarga J. A. A., Putirskaya M. Y., Stanishevskiy Ya. M. Antibacterial and chemical properties of Sr-BDC$_\infty$ Metal-Organic Framework (MOF). *Drug development & registration*. 2024;13(1):176–181. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1491

Изучение антибактериальных и химических свойств металл-органических координационных полимеров Sr-BDC$_\infty$

А. А. Водяшкин[1]✉, П. Кезимана[2], М. Дж. А. Мбарга[2], М. Ю. Путырская[2], Я. М. Станишевский[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана (национальный исследовательский университет)» (МГТУ им. Н. Э. Баумана). 105005, Россия, г. Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, стр. 1
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ **Контактное лицо:** Водяшкин Андрей Алексеевич. **E-mail:** av.andrey2013@yandex.ru

ORCID: А. А. Водяшкин – https://orcid.org/0000-0003-1556-7635; П. Кезимана – https://orcid.org/0000-0002-1682-6128;
М. Дж. А. Мбарга – https://orcid.org/0000-0001-9626-9247; М. Ю. Путырская – https://orcid.org/0009-0005-9485-8650;
Я. М. Станишевский – https://orcid.org/0000-0002-4248-2453.

Статья поступила: 29.05.2023 **Статья принята в печать:** 10.01.2024 **Статья опубликована:** 12.01.2024

© Vodyashkin A. A., Kezimana P., Mbarga J. A. M., Putirskaya M. Y., Stanishevskiy Ya. M., 2024
© Водяшкин А. А., Кезимана П., Мбарга М. Дж. А., Путырская М. Ю., Станишевский Я. М., 2024

Резюме
Введение. В ходе данной работы был получен МОФ Sr-BDC с помощью простого сольвотермального процесса без использования повышенного давления. Данный способ является легко масштабируемым и не требует специального оборудования. В ходе этой работы кристаллы, полученные при синтезе, изучаются с помощью Рамановской спектроскопии. Кроме того, полученные материалы были проанализированы на антибактериальную активность по отношению к грамположительным и к грамотрицательным бактериям.
Цель. В ходе данной работы основной целью являлись сравнительная оценка антибактериальных свойств металл-органического соединения Sr-BDC, активированных различными способами (и без активации).
Материалы и методы. В данной работе применяется сольвотермальный процесс с использованием терефталевой кислоты, нитрата стронция и диметилформамида. Особенностью данного метода является отсутствие автоклавирования в процессе синтеза. Для характеризации использовались оптическая микроскопия и Рамановская спектроскопия. Также для изучения антибактериальных свойств, был проведен тест на диффузию в среду. Совокупность данных методов поможет установить взаимосвязь, между методом активации и биологической активностью получаемых материалов.
Результаты и обсуждение. В ходе этой работы изучено химическое строение МОФ Sr-BDC с помощью Рамановской спектроскопии. Проведено изучение влияние способа активации на химическое строение МОФ. Установлено, что с помощью характеристичных пиков Рамановской спектроскопии можно подтвердить удаление растворителя (ДМФА) из структуры кристалла. Кроме того, проведены тесты по проявлению антибактериальной активности для МОФ с различным способом активации. Для каждого образца установлены МИК и МБК.
Заключение. В ходе работы изучено влияние способа активации на химическую структуру металл-органической конструкции Sr-BDC. Установлено, что способ активации может влиять на биологическую активность получаемых кристаллов. Также продемонстрировано что к различным типам бактерий МОФ проявляют различную антибактериальную активность, что в первую очередь может быть связано с составом клеточной стенки микроорганизмов.

Ключевые слова: металл-органические соединения (МОФ), антибактериальные свойства, характеристика МОФ, Рамановская спектроскопия, стронций, Sr-BDC МОФ, сольвотермический метод, терефталевая кислота

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

Вклад авторов. А. А. Водяшкин разработал ход проведения эксперимента. А. А. Водяшкин, М. Дж. А. Мбарга и М. Ю. Путирская, провели эксперимент (А. А. Водяшкин – синтез и пост-синтетическая модификация. М. Ю. Путырская – рамановская спектроскопия. М. Дж. А. Мбарга – антибактериальная активность). А. А. Водяшкин и П. Кезимана подготовили статью, и автор Я. М. Станишевский вычитал ее. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

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

Для цитирования: Водяшкин А. А., Кезимана П., Мбарга М. Дж. А., Путырская М. Ю., Станишевский Я. М. Изучение антибактериальных и химических свойств металл-органических координационных полимеров Sr-BDC$_\infty$. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):176–181. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1491

INTRODUCTION

Currently, there are actively developing directions for the development of various materials [1, 2]. It is especially worth mentioning the possibility of creating functional materials that can be applied to various spheres of life activities [3, 4]. The biological activities of various materials can be actively used in medicine, biology, and the creation of hybrid devices [5].

Various polymeric materials have been actively used in the biomedical field [6]. It can be used to create devices, modify surfaces, as implants, and for other purposes [7]. In recent years, methods for applying metal nanoparticles [8], intermetallides, and polymers [9] to solve the problems of various spectra in the biomedical industry have become relevant.

It is also worth noting that in recent years, the topic of creating various metal-organic coordination polymers (MOFs) [10, 11] has intensified. Currently, these methods allow for a variety of systems that use different ligands and metals [12]. Of particular importance are MOFs that use biocompatible metals in their structure [13]. Such MOFs can be successfully used in the near future to treat and diagnose various diseases, as well as to create hybrid devices [14, 15]. MOFs have a relatively high specific surface area, which suggests high potential for their use as sorbents for *in vivo* and *in vitro* applications. In addition, there is have potential applications as carriers of biologically active substances [16].

Bacterial diseases are among the most common [17]. Simultaneously, new and increasingly dangerous microorganisms with resistance to antibiotics have emerged owing to evolution [18]. MOFs can be used both as antibacterial agents and carriers in hybrid systems [19]. Therefore, studying the effects of different materials on microorganisms is an important and urgent task.

MATERIALS AND METHODS

Research materials

All reagents used for the preparation of Sr-BDC MOFs were of analytical grade. During the synthesis we used N,N-dimethylformamide (DMFA) solvent imp.

(C.P.) JSC "VEKTON"; strontium chloride 6-water (P) (SrCl2 – 6H2O), "LenReactiv", mass fraction not less than 99.7 %; terephthalic acid, 98 %, "Acros Organics"; ethanol (C2H5OH), mass fraction not less than 98 %; dimethyl sulfoxide imp. (C.P.) JSC "VEKTON", Doxorubicin (DOX) produced by "BRYNZALOV-A" (Russia).

Synthesis of Sr-BDC MOFs

The organometallic compound Sr-BDC was prepared according to the following procedure: in the solvothermal synthesis of Sr-BDC, strontium nitrate (0.038 g, 0.180 mmol), terephthalic acid (0.05 g, 0.301 mmol) and 7.2 ml of N,N-dimethylformamide solvent were used as precursors, placed in heat resistant glass tubes, and stirred, then incubated at 120 °C for 30 h. After cooling to room temperature, the synthesized transparent crystals were washed repeatedly with DMF (5 mL) and dried at 120 °C for 24 h.

The synthesis was carried out using DMFA solvent in closed tubes, and this system is naturally not a closed system, but the loss of solvent (about 40 %) in the process did not have a significant impact on the synthesis. It should also be noted that this is a heterogeneous process and Sr-BDC MOFs, after formation, "fall out" of the system into a precipitate, and the process of crystal formation ends before the solvent evaporates.

The obtained Sr-BDC samples were further processed to remove the residual DMFA solvent from the pores of the obtained crystals.

Post-Synthetic Modification

Post-synthetic modification is a special step in the production of Sr-BDC. This step made it possible to treat the obtained MOFs and provide them with the necessary properties. In this study, Sr-BDC MOFs are planned for use in biomedical applications, namely, for the delivery of drug molecules. The ability to incorporate the maximum amount of biologically active substances is an important factor in the delivery of drug compounds. After solvothermal synthesis, due to the forces of adsorption, pressure, and non-covalent interactions, traces of solvent can remain in the pores of MOFs, which reduces the loading capacity of MOFs and can be unsafe for biomedical applications. Elevated temperatures can be used to remove solvents, which are not always available and do not allow all solvents to be removed. Selecting special solutions into which the solvent will be desorbed is an easy and safe way to remove it from the pores.

For the developed system, a method for removing DMF using ethanol was proposed. After solvothermal synthesis, the obtained samples of Sr-BDC(DMF) dried at 120 °C for 4 h were immersed in 10 ml of ethanol and incubated under constant stirring. After 4 h the solution was decanted, the white crystals were dried at 60 °C for 3 h to remove the ethanol (Sr-BDC)

Heating to a temperature approximately equal to the boiling point of the solvent is often used for such systems, so we used heating to 260 °C for 4 hours as an alternative heating method (Sr-BDC (260 °C))

Raman spectroscopy

Raman spectroscopic studies were recorded using a specially made Raman spectrometer with 150/500 grating, solid-state laser model LM473 with wavelength 473 nm, accumulation time 10 seconds, setup of signal registration by CCD camera.

Antibacterial activity

Well diffusion method – The well diffusion method was used to assess the antimicrobial activity of the three solutions (Sr-BDC, Sr-BDC(DMF), and Sr-BDC (260 °C)). First, concentrations of 1 mg/ml were prepared by dissolving the MOFs samples in distilled water. The 3 solutions were sterilized by microfiltration with sterile filter membranes of 0.22μm. Subsequently, three cultures of microorganisms were prepared in Brain Heart infusion broth (for *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 6538) and Sabouraud Dextrose broth (for *C. albicans* ATCC 10231). After 24 h of incubation at 37 °C, the strains were centrifuged (6000 rpm for 10 min) and then re-dissolved in sterile Phosphate Buffer Saline (PBS) at 0.5 McFarland scale (approximatively 1.5×108 CFU/ml). The strains were plated in Petri dishes containing sterile Muller–Hinton agar (for *E. coli* ATCC 25922i and *S. aureus* ATCC 6538) and Sabouraud Dextrose Agar (for *C. albicans* ATCC 10231). Wells with a capacity of 20 μL were then perforated on agar, and 20 μL of each solution was added. One antibiotic disk and one antifungal disk were used as positive controls, while distilled water used to prepare the solutions was used as a negative control. Inhibition diameters were observed after 24 h of incubation at 37 °C.

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) determination: MIC and MBC were determined by microbroth dilution method in a 96-well microplate. Sabouraud dextrose broth (SDB) (*C. albicans* ATCC 10231) was used for the fungus, whereas brain Heart Infusion broth (BHIB) was used for the bacteria (*E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 6538). The method used was that used in our previous study, without any modifications. Briefly, the culture broths (100 μL) were introduced into all wells of the microplates, and 100 μL of the test solutions (Sr-BDC, Sr-BDC(DMF), and Sr-BDC (260 °C)) was introduced into the first line according to previously described labelling. A two-fold dilution was performed, and the excess of the last line was discarded to obtain an identical volume (100 μL) in each well. Each microorganism was added to three columns, each containing the culture medium and one of the test solutions. The plates were then covered and incubated for 24 h at 37 °C. Moving downwards for each test solution, the

last dilution at which no visible growth was observed was defined as the MIC. Subsequently, the lines on which no growth was observed were further inoculated into the solid culture medium after labelling the Petri dishes. The final concentration at which no growth was observed after further incubation of the Petri dishes at 37 °C for 24 h was considered as the MBC.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of Sr-BDC MOFs

Strontium metal-organic frameworks were synthesized using DMF. During the solvothermal synthesis, a 6-water strontium chloride salt was used in the reaction; the water reacting chemically with DMFA formed strong heteromolecular associations with the help of hydrogen bonds. After cooling to room temperature, the synthesized transparent crystals were washed repeatedly with DMF (5 mL) and dried at 120 °C for 24 h (Figure 1).

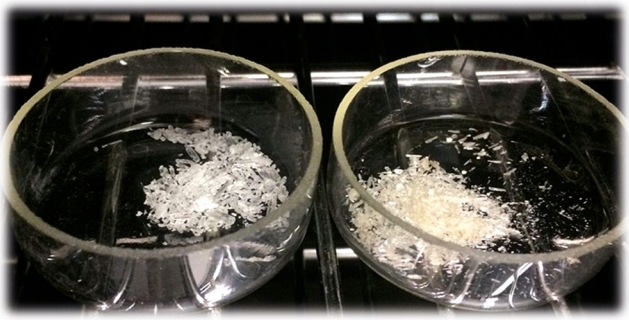


Figure 1. The obtained Sr–BDC MOF crystals dried at 120 °C for 24 h

Raman spectroscopy

Figure 2 shows the Raman spectra of Sr-BDC MOFs with different activation modes.

Peaks in the region of 1000-1500 cm^{-1} can be associated with C—C or C—H bending oscillations as well as stretching and bending oscillations of carboxylates in the terephthalic acid molecule. The peaks around 350–420 cm^{-1} can be related either to lattice vibrations or to vibrations of the metal-ligand coordination bond. C—H valence oscillations around 3100 cm^{-1} were observed in all samples, regardless of the activation method. In addition, the peak at approximately 1610 cm^{-1} indicates the presence of an aromatic group in the crystal structure, which confirms the stability of the MOFs, regardless of the activation method. The peak at approximately 280 cm^{-1} observed in the samples after activation confirms the successful removal of the solvent from the crystal structure, as previously stated [20].

Notably, the wave-like structures of the spectra indicate a high level of fluorescence within the MOFs structure, which is associated with the presence of organic groups in the structure [21]. It is worth noting that when using activation with ethanol, this effect is seen to a lesser extent, which may also indicate the most successful activation of MOFs.

The oscillations observed in the peaks are related to the stretching of the CH— in the acid molecule and are encompassed by a broad peak around 3100 cm^{-1}, which reflects similar bonds resulting from the interframe interactions. The peak at 3000 cm^{-1} appears due to the activation process and the MOFs interacting with temperature and ethanol. As a result of this interaction, a vibrational or electronic band splitting is observed in the molecular crystals, which is related to the difference in the strength of the C—H bonds.

In addition to Raman spectroscopy, we intend to use other methods of physico-chemical analysis, such as IR spectroscopy, X-ray diffraction, thermal analysis for a complete description of our obtained MOFs.

Antibacterial Activity

In the present study, the antimicrobial activity evaluation of the three solutions of MOFs – Sr-BDC, Sr-BDC(DMF), and Sr-BDC (260 °C) at 1mg/ml (obtained by diluting the crystals in distilled water) by the well diffusion method revealed that none of these solutions exhibited an inhibition zone against *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538 and *C. albicans* ATCC 10231. This result was clearly observed, given that the inhibition diameters exhibited by the positive controls consisting of tetracycline were very large (25 mm and 32 mm, respectively, against *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 6538). The same observation was made with fluconazole as a positive control against *C. albicans* ATCC 10231, in which an inhibition diameter of 22 mm was observed. As expected, no inhibition zone was observed in the test with distilled water (negative control). However, as suggested by Choyam et al. [22], the absence of an inhibition zone does not automatically mean that the tested molecules have no antimicrobial activity. Choyam et al also explained that the results of such indirect methods (well diffusion method) do not necessarily correlate with antimicrobial activity [22]. Thus, we determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal (fungicidal) concentrations (MBC or MFC). Interestingly, it was found that the 3 test solutions inhibited the growth of all the three microorganisms at the first or second dilution, which indicated that the MICs for all of them were 0.25 mg/ml or 0.5 mg/ml. More specifically, as shown in Table 1, against *E. coli* ATCC 25922 the MICs were 0.5, 0.25 and 0.25 mg/ml for Sr-BDC, Sr-BDC(DMF), and Sr-BDC (260 °C) respectively. *S. aureus* ATCC 6538 was the most susceptible strain against all the test solutions, since all of them showed an MIC equal to 0.25 mg/ml; this was confirmed by the MBC, since the only MBC determined was against this strain (MBC = 0.5 mg/ml), while the other MBCs were higher than the highest dilution that was tested (MBC > 0.5 mg/ml).

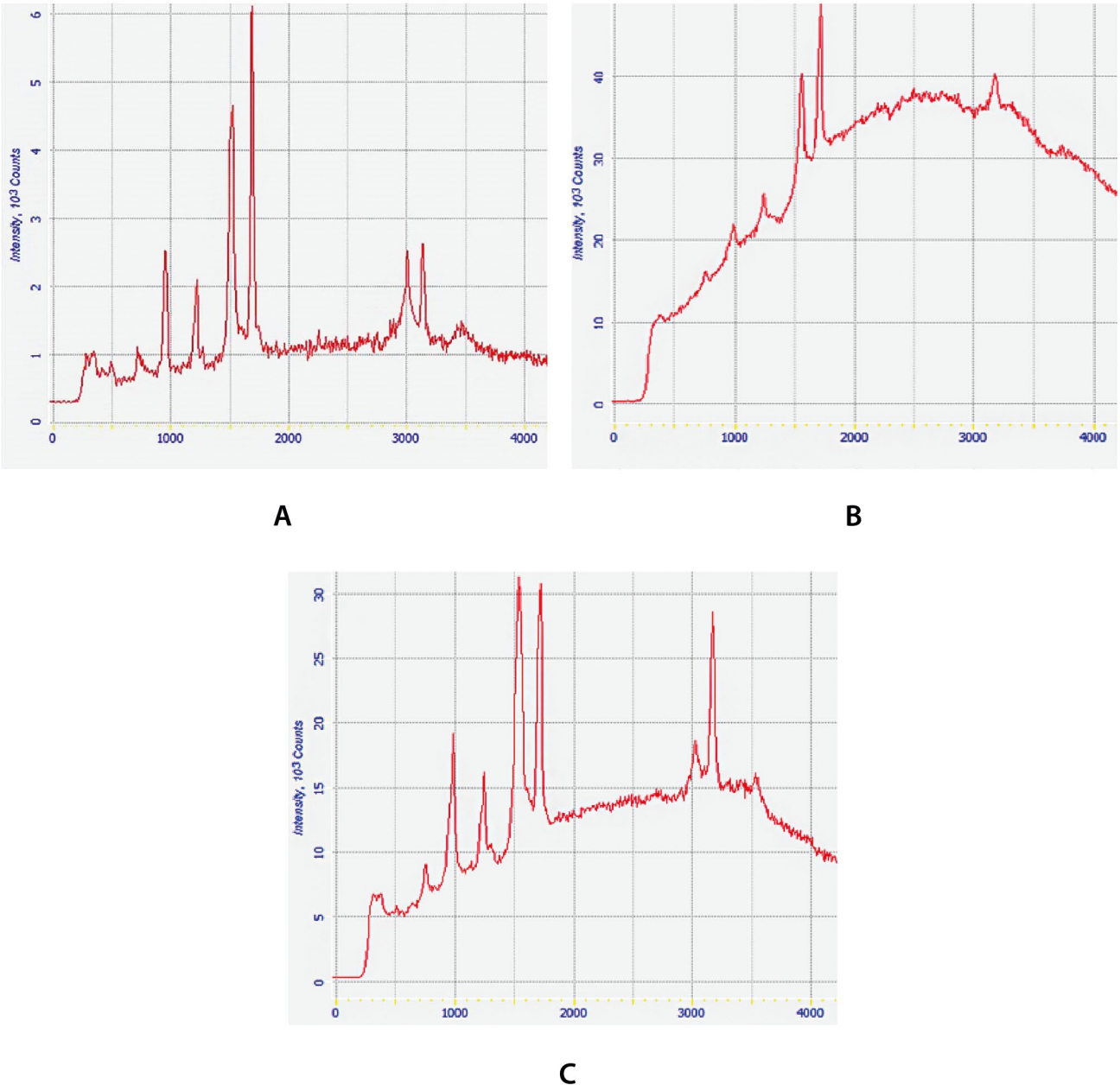


Figure 2. **Raman spectroscopy:**
A – Sr-BDC; B – Sr-BDC (DMFA); C – Sr-BDC (260 °C)

Table 1. **MIC, MBC, and MFC of MOFs' solutions against *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, and *C. albicans* ATCC 10231.**

	Sr-BDC		Sr-BDC(DMF)		Sr-BDC (260°C)	
	MIC	MBC (MFC)	MIC	MBC (MFC)	MIC	MBC (MFC)
E. coli ATCC 25922	0.5	>0.5	0.5	>0.5	0.25	>0.5
S. aureus ATCC 6538	0.25	0.5	0.25	>0.5	0.25	>0.5
C. albicans ATCC 10231	0.5	>0.5	0.5	>0.5	0.5	>0.5

As a comparison (Table 2), we also looked at different antibacterial activity of other MOFs against Gram-negative and Gram-positive bacteria by well diffusion method and their MIC are provided in the following table.

It should be noted that the MOFs used in our comparison were mixed with the antibacterial agent (the first name in the compound), which has an influence on their antibacterial activity. As we can see in the table, the Zn-based MOFs, IRMOF-3 and MOF-5, and the silver-based Ag-MOF, when mixed with the

antibacterial agents, ampicillin or kanamycin or graphene oxide, show a high antibacterial efficiency compared to our Sr-BDC MOFs.

Table 2. Comparison of MIC value of Sr-BDC MOFs with other compounds

Compound	MIC (μg/mL)		References
	E. coli	*S. aureus*	
Sr-BDC	500	250	This work
Sr-BDC(DMF)	500	250	
Sr-BDC (260 °C)	250	250	
Kanamycin/MOF-5	100	100	[23]
Kanamycin/IRMOF-3	25	50	[23]
Graphene-oxide/Ag-MOF	50	–	[24]
Ampicillin/IRMOF-3	50	100	[23]
Ampicillin/MOF-5	100	100	[23]

In the work we are trying to demonstrate the biological activity of our system against bacteria. At the same time, we want to highlight the possibility of loading the MOF with different drugs that can increase the antibacterial activity, as shown in the comparison in Table 2.

CONCLUSIONS

In this study, without the use of mechanochemical treatment or elevated pressure, the metal-organic framework Sr-BDC has been successfully synthesized. The presence of an aromatic group in the crystal structure, indicating that the strontium ions are coordinated by the terephthalic acid molecule, was confirmed by Raman spectroscopy. In order to remove the solvent residues from the structure, a post-synthetic modification synthesis using ethanol and heating was proposed for these crystals. In addition, the antibacterial properties were investigated for all samples. MIC and MBC were determined for *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*. It is noteworthy that the antibacterial assay demonstrates the need for customization of conditions for each biological object to optimize exposure (lack of exposure). This study shows the importance of the post-synthetic modification and, in particular, of the activation steps for different materials used in biomedical applications.

REFERENCES

1. Xia F., Wang H., Xiao D., Dubey M., Ramasubramaniam A. Two-dimensional material nanophotonics. *Nature Photonics*. 2014;12(8):899–907. DOI: 10.1038/nphoton.2014.271.
2. Krivoshapkin P. V., Ivanets A. I., Torlopov M. A., Mikhaylov V. I., Srivastava V., Sillanpää M., Prozorovich V. G., Kouznetsova T. F., Koshevaya E. D., Krivoshapkina E. F. Nanochitin/manganese oxide-biodegradable hybrid sorbent for heavy metal ions. *Carbohydrate Polymers*. 2019;210:135–143. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.045.
3. Omenetto F. G., Kaplan D. L. New Opportunities for an Ancient Material. *Science*. 2010;329(5991):528–531. DOI: 10.1126/science.1188936.
4. Koshevaya E., Krivoshapkina E., Krivoshapkin P. Tantalum oxide nanoparticles as an advanced platform for cancer diagnostics: a review and perspective. *Journal of Materials Chemistry B*. 2021;25(9):5008–5024. DOI: 10.1039/d1tb00570g.
5. Lu Y., Aimetti A. A., Langer R., Gu Z. Bioresponsive materials. *Nature Reviews Materials*. 2016.1(2):16075. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.75.
6. Lee L. J. Polymer Nanoengineering for Biomedical Applications. *Annals of Biomedical Engineering*. 2006;34(1):75–88. DOI: 10.1007/s10439-005-9011-6.
7. Zhang Y., Lim C. T., Ramakrishna S., Huang Z.-M. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005;16(10):933–946. DOI: 10.1007/s10856-005-4428-x.
8. Rejepov D. T., Vodyashkin A. A., Sergorodceva A. V., Stanishevskiy Ya. M. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(3):176–187. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-176-187.
9. Vodyashkin A. A., Kezimana P., Vetcher A. A., Stanishevskiy Y. M. Biopolymeric Nanoparticles–Multifunctional Materials of the Future. *Polymers*. 2022;14(11):2287. DOI: 10.3390/polym14112287.
10. Kuzminova A., Dmitrenko M., Mazur A., Ermakov S., Penkova A. Novel Pervaporation Membranes Based on Biopolymer Sodium Alginate Modified by FeBTC for Isopropanol Dehydration. *Sustainability*. 2021;13(11):6092. DOI: 10.3390/su13116092.
11. Penkova A. V., Kuzminova A. I., Dmitrenko M. E., Surkova V. A., Liamin V. P., Markelov D. A., Komolkin A. V., Poloneeva D. Y., Laptenkova A. V., Selyutin A. A., Mazur A. S., Emeline A. V., Thomas S., Ermakov S. S. Novel pervaporation mixed matrix membranes based on polyphenylene isophtalamide modified by metal–organic framework UiO-66(NH_2)-EDTA for highly efficient methanol isolation. *Separation and Purification Technology*. 2021;263:118370. DOI: 10.1016/j.seppur.2021.118370.
12. Stock N., Biswas S. Synthesis of Metal-Organic Frameworks (MOFs): Routes to Various MOF Topologies, Morphologies, and Composites. *Chemical Reviews*. 2012;112(2):933–969. DOI: 10.1021/cr200304e.
13. Ding M., Cai X., Jiang H.-L. Improving MOF stability: approaches and applications. *Chemical Science*. 2019;10(44):10209–10230. DOI: 10.1039/c9sc03916c.
14. Kuzminova A. I., Dmitrenko M. E., Poloneeva D. Y., Selyutin A. A., Mazur A. S., Emeline A. V., Mikhailovskii V. Y., Solovyev N. D., Ermakov S. S., Penkova A. V. Sustainable composite pervaporation membranes based on sodium alginate modified by metal organic frameworks for dehydration of isopropanol. *Journal of Membrane Science*. 2021;626:119194. DOI: 10.1016/j.memsci.2021.119194.
15. Vodyashkin A. A., Sergorodceva A. V., Kezimana P., Stanishevskiy Y. M. Metal-Organic Framework (MOF)—A Universal Material for Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(9):7819. DOI: 10.3390/ijms24097819.
16. Wu M.-X., Yang Y.-W. Metal-Organic Framework (MOF)-Based Drug/Cargo Delivery and Cancer Therapy. *Advanced Materials*. 2017;29(23):1606134. DOI: 10.1002/adma.201606134.
17. Liu Y., Zhou L., Dong Y., Wang R., Pan Y., Zhuang S., Liu D., Liu J. Recent developments on MOF-based platforms for antibacterial therapy. *RSC Medicinal Chemistry*. 2021;12(6):915–928. DOI: 10.1039/d0md00416b.
18. Karimi Alavijeh R., Beheshti S., Akhbari K., Morsali A. Investigation of reasons for metal–organic framework's antibacterial activities. *Polyhedron*. 2018;156:257–278. DOI: 10.1016/j.poly.2018.09.028.
19. Hasan Md. N., Bera A., Maji T. K., Pal S. K. Sensitization of nontoxic MOF for their potential drug delivery application against microbial infection. *Inorganica Chimica Acta*. 2021;523:120381. DOI: 10.1016/j.ica.2021.120381.
20. Kumari G., Patil N. R., Bhadram V. S., Haldar R., Bonakala S., Maji T. K., Narayana C. Understanding guest and pressure-induced porosity through structural transition in flexible interpenetrated MOF by Raman spectroscopy: Understanding guest and pressure-induced porosity. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2016;47(2):149–155. DOI: 10.1002/jrs.4766.
21. Hadjiivanov K. I., Panayotov D. A., Mihaylov M. Y., Ivanova E. Z., Chakarova K. K., Andonova S. M., Drenchev N. L. Power of Infrared and Raman Spectroscopies to Characterize Metal-Organic Frameworks and Investigate Their Interaction with Guest Molecules. *Chemical Reviews*. 2021;121(3):1286–1424. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00487.
22. Choyam S., Lokesh D., Kempaiah B. B., Kammara R. Assessing the antimicrobial activities of Ocins. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:1034. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01034.
23. Bhardwaj N., Pandey S. K., Mehta J., Bhardwaj S. K., Kim K.-H., Deep A. Bioactive nano-metal–organic frameworks as antimicrobials against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Toxicology Research*. 2018;7:931–941. DOI: 10.1039/c8tx00087e.
24. Firouzjaei M. D., Shamsabadi A. A., Sharifian Gh. M., Rahimpour A., Soroush M. A Novel Nanocomposite with Superior Antibacterial Activity: A Silver-Based Metal Organic Framework Embellished with Graphene Oxide. *Advanced Materials Interfaces*. 2018;5:1701365. DOI: 10.1002/admi.201701365.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1478
УДК 616.8–005

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Биомаркеры ишемии головного мозга (обзор)

А. С. Самойлов, Е. И. Балакин✉, В. И. Пустовойт

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна ФМБА России». 123098, Россия, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23

✉ **Контактное лицо:** Балакин Евгений Игоревич. **E-mail:** evgbalakin@yandex.ru

ORCID: А. С. Самойлов – https://orcid.org/0000-0002-9241-7238; Е. И. Балакин – https://orcid.org/0000-0001-5545-135X; В. И. Пустовойт – https://orcid.org/0000-0003-3396-5813.

Статья поступила: 29.05.2023 **Статья принята в печать:** 16.01.2024 **Статья опубликована:** 19.01.2024

Резюме

Введение. Инсульты остаются на втором месте среди основных причин смертности и на третьем среди всех заболеваний, приводящих к инвалидности. Для более эффективной диагностики транзиторной ишемической атаки (ТИА) необходимо использовать дополнительное исследование сывороточных биомаркеров, однако большинство нейроспецифических биомаркеров имеют низкую прогностическую специфичность и чувствительность. Своевременное определение ТИА и дифференциальная диагностика инсульта в первый час позволит обеспечить более короткий период восстановления пациентов и уменьшить риск смертности и инвалидизации. Для преодоления трудностей диагностики ТИА необходимо включить исследование сывороточных биомаркеров.

Текст. Нейроспецифические биомаркеры, такие как S100B, GFAP и NSE, используются для диагностики острого ишемического повреждения глиальных клеток и нейронов. S100B и GFAP обнаруживаются в астроцитах, а NSE – в нейронах и клетках нейроэндокринной системы. Повышение концентрации этих биомаркеров в сыворотке крови связано с различными патологическими состояниями, такими как инсульты, травмы головного мозга и другие поражения центральной нервной системы (ЦНС). Динамический мониторинг концентрации биомаркеров позволяет оценить эффективность проводимой терапии и выявить предикторы ухудшения состояния пациента для оперативной коррекции лечебных процедур. Для создания диагностической панели необходимо изучить метаболические процессы в ишемизированной ткани, учитывая сопутствующие диагнозы и результаты нейровизуализации, а также использовать прорывные достижения в машинном обучении и технологиях обработки больших данных.

Заключение. Обзор показал, что ни один из оцененных биомаркеров не может быть рекомендован для диагностики нарушения мозгового кровообращения, однако сочетание нескольких нейроспецифических биомаркеров может значительно повысить диагностическую эффективность и найти применение в дифференциальной диагностике инсульта, внутричерепной гематомы и других поражений головного мозга с целью проведения ранней фармакотерапии поражений ЦНС и в качестве суррогатных точек при проведении клинических исследований.

Ключевые слова: биомаркер, инсульт, транзиторная ишемическая атака, ТИА

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

Вклад авторов. Е. И. Балакин – обоснование концепции обзора литературы. В. И. Пустовойт, Е. И. Балакин – анализ и обобщение данных литературы. В. И. Пустовойт, Е. И. Балакин – написание текста статьи. А. С. Самойлов – систематизация литературных данных, формирование статьи.

Для цитирования: Самойлов А. С., Балакин Е. И., Пустовойт В. И. Биомаркеры ишемии головного мозга. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):182–189. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1478

Biomarkers of Brain Ischemia (Review)

Alexander S. Samoylov, Evgenii I. Balakin✉, Vasily I. Pustovoit

State Research Center – A. I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency. 23, Marshala Novikova str., Moscow, 123098, Russia

✉ **Corresponding author:** Evgenii I. Balakin. **E-mail:** evgbalakin@yandex.ru

ORCID: Alexander S. Samoylov – https://orcid.org/0000-0002-9241-7238; Evgenii I. Balakin – https://orcid.org/0000-0001-5545-135X;
Vasily I. Pustovoit – https://orcid.org/0000-0003-3396-5813.

Received: 29.05.2023 **Revised:** 16.01.2024 **Published:** 19.01.2024

Abstract

Introduction. Strokes remain the second leading cause of death and the third leading cause of disability. Additional serum biomarker testing should be used to better diagnose transient ischemic attack (TIA), but most neurospecific biomarkers have low prognostic specificity and sensitivity. Timely identification of TIA and differential diagnosis of stroke in the first hour will ensure a shorter period of patient recovery and reduce the risk of mortality and disability. Serum biomarker studies should be included to overcome the difficulty of diagnosing TIA.

Text. Neurospecific biomarkers such as S100B, GFAP, and NSE are used to diagnose acute ischemic damage to glial cells and neurons. S100B and GFAP are detected in astrocytes and NSE in neurons and cells of the neuroendocrine system. Elevated serum concentrations of these biomarkers are associated with various pathological conditions such as strokes and brain injuries and other central nervous system (CNS) lesions. Dynamic monitoring of biomarker concentrations makes it possible to evaluate the efficacy of the ongoing therapy and to identify predictors of patient deterioration for prompt correction of therapeutic procedures. To create a diagnostic panel it is necessary to study metabolic processes in ischemic tissue, taking into account concomitant diagnoses and results of neuroimaging, and to use breakthrough advances in machine learning and big data.

© Самойлов А. С., Балакин Е. И., Пустовойт В. И., 2024
© Samoylov A. S., Balakin E. I., Pustovoit V. I., 2024

Conclusion. The review showed that none of the assessed biomarkers can be recommended for the diagnosis of cerebral circulation disorders, but the combination of several neurospecific biomarkers can significantly improve diagnostic efficiency and find application in the differential diagnosis of stroke, intracranial hematoma, and other brain lesions for the purpose of early pharmacotherapy of CNS lesions and as surrogate endpoints during clinical trials.

Keywords: biomarker, stroke, transient ischemic attack, TIA

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. Evgenii I. Balakin – justification of the concept of literature review. Vasily I. Pustovoit, Evgenii I. Balakin – analysis and synthesis of literature data. Vasily I. Pustovoit, Evgenii I. Balakin – writing the text of the article. Alexander S. Samoilov – systematization of literary data, preparation of the article.

For citation: Samoylov A. S., Balakin E. I., Pustovoit V. I. Biomarkers of brain ischemia. *Drug development & registration*. 2024;13(1):182–189. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1478

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения[1] инсульты остаются на втором месте по значимости среди основных причин смертности и на третьем среди всех заболеваний, приводящих к инвалидности [1]. По механизму развития острые нарушения мозгового кровообращения распределены следующим образом: ишемические – 62,4 %, внутримозговые кровоизлияния – 27,9 % и субарахноидальные кровоизлияния – 9,7 % [1]. В материалах Европейской организации по борьбе с инсультом у каждого четвертого пациента продемонстрирована связь развития ТИА с наличием клинических признаков, предшествующих острому инсульту [2]. Своевременное определение ТИА, а также дифференциальная диагностика ишемического и геморрагического инсультов в первый час позволит обеспечить окно для проведения максимально эффективных медицинских мероприятий, обеспечивая более короткий период восстановления пациентов, и, как следствие, будет способствовать уменьшению риска смертности и инвалидизации трудоспособного населения, снижая экономическую нагрузку на национальном уровне.

В России постановка диагноза ТИА до настоящего времени остается клинической прерогативой, где окончательный вывод о здоровье пациента в значительной степени зависит от субъективной оценки невролога [3–5]. К тому же гетерогенный и временный характер клинических симптомов ТИА и отсутствие результатов нейровизуализации у большинства пациентов делает постановку диагноза еще более сложной, увеличивая риск ошибочного диагноза, особенно для непрофильных специалистов [6].

[1] World Health Organization. World Health Organization. The Top 10 Causes of Death. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2020. Available from: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death. Accessed: 03.11.2023.

С целью преодоления вышеуказанных трудностей диагностика ТИА должна включать дополнительное исследование сывороточных биомаркеров. Выявление факторов, связанных с различными компонентами ишемического каскада в головном мозге, может предоставить ценную прогностическую информацию о физическом состоянии пациента [7].

В связи с тем, что патофизиологические механизмы ишемического каскада развития ТИА и инсульта схожи, биомаркеры гипотетически могут использоваться с идентичной диагностической целью. Однако необходимо учитывать, что большинство нейроспецифических биомаркеров имеют низкую прогностическую специфичность и чувствительность для диагностики острой фазы инсульта и не отражают тяжесть течения заболевания. В связи с этим, по настоящее время нет четких лабораторных диагностических критериев оценки ТИА и ишемического инсульта. В данной статье нами произведена оценка потенциальных биомаркеров повреждения тканей ЦНС и их практической значимости в диагностике ТИА или инсульта.

Подбор литературы

Поиск литературы проводился в базах данных: PubMed, MEDLINE, eLIBRARY и EMBASE. С целью снижения количества ответов на задаваемый запрос в вышеперечисленных научных электронных библиотеках в поисковом режиме за последние 25 лет формировался запрос: NSE, S100B, GFAP, N-метил-D-аспартат, биомаркеры при инсульте и биомаркеры при ТИА, а также ключевые слова, связанные с диагностическими исследованиями и ишемией головного мозга, опубликованные до 1 июня 2022 года. В первичном анализе учитывалось название и аннотация к каждой отобранной статье. После отбора целевых статей просмотрены списки литературы всех включенных исследований для изучения дополни-

тельной информации. Полные тексты отобранных статей оценивались после завершения системного обзора. Необходимые данные извлекались и составили основу данной статьи. Ведущим аспектом приемлемости результатов поиска выбранных исследований являлась актуальность их применения в клинической практике и использование биомаркеров с целью диагностики ишемического или геморрагического инсульта, а также ТИА. В ходе системного анализа определены наиболее актуальные направления диагностических исследований. Не менее важным аспектом в ходе анализа статей являлось описание сроков отбора образцов крови после развития инсульта или ТИА и эталонная диагностика ТИА и инсульта, в которой неврологи использовали методы нейровизуализации [8], а констатация ТИА базировалась на временном показателе (24 часа) и максимальной продолжительности симптомов в отсутствие инфаркта при нейровизуализации головного мозга [9].

В связи с ожидаемым разнообразием нейроспецифических биомаркеров проведение метаанализа полученных данных не планировалось, но предполагалось проанализировать результаты исследований отдельных потенциальных биомаркеров, которые в перспективе возможно использовать в качестве достоверного дифференциального предиктора нарушений тканевого кровообращения головного мозга.

Поиск в пяти базах данных сформировал пул из 5603 статей, удаление дубликатов и нерелевантных публикаций снизило общее количество до 246, из которых 198 публикаций было исключено после полнотекстового анализа, а 48 исследований соответствовало нашим критериям отбора.

В результате анализа статей сформированы следующие группы: связанные с процессами коагуляции и нейроспецифические биомаркеры, характеризующие острое повреждение нейронов и глиальных клеток.

Нейроспецифические биомаркеры острого ишемического повреждения глиальных клеток

Низкомолекулярный глиально-специфический белок – S100B в большинстве случаев обнаруживается в цитоплазме и ядрах астроцитов [10]. Повышение концетрации S100B в сыворотке крови является важным биомаркером повреждения глиальных клеток [11, 12]. Анализ литературы показал, что S100B и нейронспецифическая енолаза (NSE) являются специфическими белками центральной нервной системы, повышение концентрации которых в первую очередь связано с регистрацией эссенциальной гипертензии [13]. Также в некоторых исследованиях показано повышение S100B при неврологическом дефиците, ишемическом и геморрагическом инсультах [10].

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) обычно обнаруживается в астроцитах и – в меньших количествах – в эпендимальных клетках головного мозга [14]. Подобно нейрональному гликолитическому ферменту NSE и кальцийсвязывающему белку, участвующему в клеточном цикле прогрессии и дифференциации астроцитов S100B, любое повреждение ткани мозга приводит к увеличению уровня GFAP в спинномозговой жидкости [15, 16]. По недавним и убедительным клинико-экспериментальным данным, концентрация GFAP у здоровых людей находится в диапазоне (0,07 ± 0,11) нг/мл [17], а при ишемии головного мозга повышение концентрации GFAP в сыворотке крови наблюдается в течение первых часов от начала возникновения патологических процессов в ткани [16].

Биомаркер GFAP по чувствительности к незначительному повреждению тканей головного мозга существенно превосходит белок S100B [18], однако при ТИА повышение концетрации GFAP отложено во времени, что делает его клиническое использование в качестве диагностического инструмента ограниченным [19]. В литературе есть исследование, где показано, что ТИА стимулирует экспрессию гена, кодирующего GFAP [20]. На основании представленных данных видно, что GFAP может использоваться как биомаркер при диагностике ТИА и ишемического инсульта. Тем не менее необходимо более глубокое изучение механизмов патологического процесса и получение данных о кинетике концентраций GFAP при разных патологических состояниях, которые позволят детальнее охарактеризовать показатели специфичности и чувствительности тестов. Динамический мониторинг концентрации GFAP у пациентов с диагнозом инсульт позволит неврологу осуществлять оценку эффективности проводимой терапии и выявлять предикторы ухудшения состояния пациента для оперативной коррекции лечебных процедур.

Нейроспецифические биомаркеры острого ишемического повреждения нейронов

Нейроны и клетки нейроэндокринной системы являются основным источником фермента NSE [18]. Авторы также отмечают резкое повышение концентрации NSE в сыворотке крови при тяжелом поражении белого вещества головного мозга [21, 22]. В целом повышение концентрации NSE в сыворотке крови можно рассматривать как диагностический инструмент прогнозирования клинического исхода ишемии головного мозга, а также не исключено его использование при раннем определении прогрессирования вторичного повреждения головного мозга [23].

Некоторые авторы в исследованиях маркеров ТИА и острого инсульта отмечают повышение концентрации белка – Tau, экспрессирующегося в не-

миелинизированных кортикальных аксонах и входящего в структуру цитоскелета нейронов [24]. При разрушении синаптических ионотропных глутаматных рецепторов увеличивается содержание N-метил-D-аспартата (NMDA) [25], экспрессируемого в секторе CA1 гиппокампа, стриатуме и зубчатой извилине [26]. Рецептор NMDA состоит из четырех субъединиц (две глицинсвязывающие NR1 и две глутаматсвязывающие NR2). В ответ на высвобождение пептидных фрагментов, образующихся в результате инсульта, вырабатываются антитела (aAbs) к рецептору NMDA в организме пациентов и сохраняются в течение многих месяцев [27]. Рецептор NMDA является одним из ключевых регуляторов ишемического каскада головного мозга: так, после инсульта NR2 повышается [28] в отличие от субъединицы NR1 [28]. В первые 72 ч после острого геморрагического инсульта отмечается повышение уровня аутоантител (Ab) в сыворотке крови к субъединицам NR2A/2B NMDA-рецепторов [29]. Кроме того, диагностика наличия Ab к субъединице NR2 помогает дифференцировать ТИА, ишемический инсульт от болезни-имитатора инсульта [30, 31]. Некоторые авторы получили противоречивые результаты, доказывающие, что аутоантитела к субъединицам NR2A/2B NMDA-рецепторов не имеют дополнительной диагностической ценности при диагностике ТИА [32].

Изучение белковой дегликазы (DJ-1), широко известной в научном мире как белок 7 болезни Паркинсона, кодирующийся геном PARK7 и специфичный для ткани головного мозга, характеризуется функцией защиты его клеток от окислительного стресса [33]. Обнаружение DJ-1 в сыворотке крови у пациентов с ишемией головного мозга повышает диагностическую ценность при оценке инсульта, особенно в позднем возрасте [34].

В течение первых суток после ишемии головного мозга прогностически значимым для диагностики ТИА и инсульта является повышение концетрации нуклеотиддифосфаткиназы А (NDKA) [35] и белка деградации слияния убиквитина 1 (UFD1) [36].

Некоторыми учеными в качестве биомаркеров рассматривается активность микроРНК и цитоплазматической ДНК как предвестников ишемического повреждения головного мозга. В эксперименте на лабораторных животных при ТИА обнаружена повышенная активность микроРНК (miRNA) в экзосомных образцах плазмы крови [37], что является следствием изменения экспрессии генов в ишемизированной ткани головного мозга после ишемического стресса [38]. Воспалительные процессы в мозговой ткани после ишемического повреждения являются причиной повышения гаплогруппы митохондриальной ДНК (mtDNA) [39], что также вызывает определенный интерес у исследователей.

Активность биомаркеров свертывающей системы крови на фоне острого инсульта

В качестве биомаркеров воспаления и факторов свертывания крови широко изучаются фибриноген [40] и гликопротеин (фактор Виллебранда – vWF) [41], однако большой связи подтипов инсульта с уровнями концетрации фибриногена не обнаружено [42]. Дополнительные клинико-экспериментальные исследования с целью уточнения связи ишемии головного мозга с активностью фибриногена в организме пострадавшего пациента, возможно, расширят подходы к диагностике и лечению инсульта [43]. Например, у пациентов с ТИА или ишемическим инсультом в сочетании с высокой активностью свертывающей системы крови имеются большие шансы на рецидив [43].

Экспериментальные исследования на лабораторных животных показали, что vWF участвует в регуляции свертывающей системы крови и проницаемости сосудов головного мозга, а также характеризуется сильной связью с воспалительными процессами и острой ишемией головного мозга [37].

Клинические исследования активности vWF в случаях с ТИА или острым инсультом подтвердили повышение уровня гликопротеина только ко 2–4 неделе от госпитализации [44]. Эти данные говорят о несостоятельности гипотезы «высокой чувствительности маркера при диагностике острой фазы инсульта на фоне разрушения эндотелиальных клеток», тем не менее высокий уровень vWF оказался прогностически неблагоприятным фактором в клиническом исходе, так как коррелировал с наличием рецидивов [45].

Обсуждение

В данном литературном обзоре рассмотрены нейроспецифические биомаркеры и активность показателей свертывающей системы крови. Существуют временные и этиологические различия повышения концетрации биомаркеров, характеризующих ишемию головного мозга, поэтому для объективной и своевременной дифференциальной диагностики необходимо учитывать комплекс показателей, характеризующих признаки разрушения гематоэнцефалического барьера, глиальных клеток и непосредственно нейронов. В связи с временными различиями в патогенезе надо принимать во внимание особенности диагностики на этапе оказания скорой медицинской и стационарной помощи пациентам с острой ишемией головного мозга. Анализ литературных данных, представленных в статье, показал, что некоторые биомаркеры возможно использовать в качестве диагностических предикторов при более углубленном клинико-лабораторном исследовании, поскольку многие из найденных статей были ограничены неболь-

шим размером выборки и отсутствием валидации. Для дальнейшего исследования целесообразно создание панели, включающей в себя несколько биомаркеров с высокой чувствительностью и специфичностью к патофизиологическим показателям, участвующим в ишемическом каскаде при повреждении головного мозга. Для определения специфичности и чувствительности нейроспецифических биомаркеров необходимо использовать инструменты нейровизуализации с целью уточнения типа патологического процесса при острых инсультах [46]. Тем не менее ни один из текущих нейроспецифических биомаркеров не является достаточно надежным, чтобы можно было его противопоставить диагностическому методу МРТ при ишемии головного мозга.

Большое количество заболеваний и патологических состояний, характеризующихся разрушением нервной ткани и повреждением ГЭБ, сопровождаются повышением концентрации нейроспецифических белков в периферической крови. Теоретически концепция аналогичных диагностических систем может найти применение при решении следующих клинических проблем:

1) дифференциальной диагностики инсульта головного мозга в первые 4 часа после появления симптомов;
2) диагностики внутричерепной гематомы при ушибах мозга (автомобильные аварии, в качестве диагностической системы у медицинских работников, сопровождающих специалистов экстремальных профессий);
3) дифференциальной диагностики других поражений головного мозга (опухоли головного мозга и бактериальные менингиты).

Перечисленное выше является неполным перечнем возможных областей применения, но для каждой требуется детальное изучение, расчет чувствительности и специфичности тест-системы, а также всесторонняя оценка специалистов на предмет практического применения.

Учитывая разнообразие клеток ЦНС, можно предположить, что широкое изучение нейроспецифических биомаркеров и их определение в периферической крови поможет создать диагностическую панель. Для этого необходимо изучить особенности метаболических процессов в ишемизированной ткани мозга, определить минимально возможное время, когда может быть эффективно диагностировано тканеспецифическое ишемическое повреждение, а также минимальный объем повреждения ткани, влияющий на уровень биомаркеров.

В процессе разработки панели необходимо учитывать сопутствующие или альтернативные диагнозы, связанные с патологическими процессами центральной нервной системы и результатами нейровизуализации (включая неинвазивные ангиограммы). Совместное использование прорывных достижений в области машинного обучения и больших данных открывает новые горизонты в прогнозировании заболеваний и их исходов [47].

В качестве результата внедрения диагностических систем в реальную клиническую практику следует ожидать новых исследований в сфере фармакотерапии вышеописанных состояний на самых ранних этапах развития, а также использования биомаркеров в качестве суррогатных конечных точек оценки состояния при проведении клинических исследований препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ проведенного обзора позволяет сделать вывод, что ни один из оцененных биомаркеров в настоящее время не может быть рекомендован для диагностики нарушения мозгового кровообращения без дополнительных исследований. Сочетание нескольких нейроспецифических биомаркеров предоставит возможность направить экспериментальные результаты в практическое русло и значительно повысить диагностическую эффективность с целью проведения ранней фармакотерапии поражений ЦНС и использования в качестве суррогатных конечных точек при проведении клинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feigin V. L., Stark B. A., Johnson C. O., Roth G. A., Bisignano C., Abady G. G., et al. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Neurology*. 2021;20(10):795–820. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0.
2. Holtkamp M., Beghi E., Benninger F., Kälviäinen R., Rocamora R., Christensen H. European Stroke Organisation guidelines for the management of post-stroke seizures and epilepsy. *European Stroke Journal*. 2017;2(2):103–15. DOI: 10.1177/2396987317705536.
3. Михалюк Р. А. Транзиторная ишемическая атака как предиктор ишемического инсульта. *Рецепт*. 2021;24(6):858–864. DOI: 10.34883/PI.2021.24.6.009.
4. Нуржанова Р. Б., Жакенова Г. Ж., Сраилова К. Б., Шерияздан Ж. С., Ташманова А. Б., Раимкулов Б. Н. Транзиторные ишемические атаки: дифференциальный диагноз, лечение, профилактика (Обзор литературы). *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. 2021;(3):85–90. DOI: 10.53065/kaznmu.2021.60.74.016.
5. Широков Е. А., Глатко В. Л., Сапроненкова О. А. Современные алгоритмы диагностики и лечения транзиторных ишемических атак. *Клиническая медицина*. 2021;99(2):85–90. DOI: 10.30629/0023-2149-2021-99-2-85-90.
6. Shahjouei S., Sadighi A., Chaudhary D., Li J., Abedi V., Holland N., Phipps M., Zand R. A 5-Decade Analysis of Incidence Trends of Ischemic Stroke After Transient Ischemic Attack: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2021;78(1):77–87. DOI: 10.1001/jamaneurol.2020.3627.
7. Coutts S. B., Moreau F., Asdaghi N., Boulanger J.-M., Camden M.-C., Campbell B. C. V., Demchuk A. M., Field T. S., Goyal M., Krause M., Mandzia J., Menon B. K., Mikulik R., Penn A. M., Swartz R. H., Hill M. D. Rate and Prognosis of Brain Ischemia in Patients With Lower-Risk Transient or Persistent Minor Neurologic Events. *JAMA Neurology*. 2019;76(12):1439–45. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.3063.

8. Bertens L. C. M., Broekhuizen B. D. L., Naaktgeboren C. A., Rutten F. H., Hoes A. W., van Mourik Y., Moons K. G. M., Reitsma J. B. Use of expert panels to define the reference standard in diagnostic research: a systematic review of published methods and reporting. *PLoS Medicine*. 2013;10(10):e1001531. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001531.
9. Fonseca A. C., Merwick Á., Dennis M., Ferrari J., Ferro J. M., Kelly P., Lal A., Ois A., Olivot J. M., Purroy F. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on management of transient ischaemic attack. *European Stroke Journal*. 2021;6(2):CLXIII–CLXXXVI. DOI: 10.1177/2396987321992905.
10. Мухамадеева Н. Р., Качемаева О. В., Бузаев И. В., Галимова Р. М., Юсупова И. И., Загидуллин Ш. З., Загидуллин Н. Ш. Сывороточные биомаркеры при повреждении головного мозга. *Нервные болезни*. 2022;1:3–10. DOI: 10.24412/2226-0757-2022-12406.
11. Одинак М. М., Цыган Н. В., Иванов А. М., Камилова Т. А., Никитин В. Ю., Мешкова М. Е. Белок S100β – биомаркер повреждения головного мозга. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2011;1(33):210–214.
12. González-Quevedo A., González-García S., Hernández-Díaz Z., Fernández Concepción O., Quevedo Sotolongo L., Peña-Sánchez M., Márquez Rosales B., Santiesteban Freixas R., Fernández-Almirall I., Caridad Menéndez-Sainz M., Fernández-Carriera R. Serum neuron specific enolase could predict subclinical brain damage and the subsequent occurrence of brain related vascular events during follow up in essential hypertension. *Journal of the Neurological Sciences*. 2016;363:158–163. DOI: 10.1016/j.jns.2016.02.052.
13. Retraction: Protective effects of transduced Tat-DJ-1 protein against oxidative stress and ischemic brain injury. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013;45:e24. DOI: 10.1038/emm.2013.54.
14. Nadarajan V., Perry R. J., Johnson J., Werring D. J. Transient ischaemic attacks: mimics and chameleons. *Practical Neurology*. 2014;14(1):23–31. DOI: 10.1136/practneurol-2013-000782.
15. Цыган Н. В., Трашков А. П. Повреждение головного мозга и нейротрофические механизмы его защиты на модели острой церебральной гипоксии. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2013;3(43):102–110.
16. Mattila O. S., Ashton N. J., Blennow K., Zetterberg H., Harve-Rytsälä H., Pihlasviita S., Ritvonen J., Sibolt G., Nukarinen T., Curtze S., Strbian D., Pystynen M., Tatlisumak T., Kuisma M., Lindsberg P. J. Ultra-Early Differential Diagnosis of Acute Cerebral Ischemia and Hemorrhagic Stroke by Measuring the Prehospital Release Rate of GFAP. *Clinical Chemistry*. 2021;67(10):1361–72. DOI: 10.1093/clinchem/hvab128.
17. Mayer C. A., Brunkhorst R., Niessner M., Pfeilschifter W., Steinmetz H., Foerch C. Blood levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in patients with neurological diseases. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e62101. DOI: 10.1371/journal.pone.0062101.
18. Чайковская А. Д., Топузова М. П., Маханова А. М., Михеева А. Г., Короткова Д. С., Поспелова М. Л., Панина Е. Б., Вавилова Т. В., Васильева Е. Ю., Симаков К. В., Сергеева Т. В., Алексеева Т. М. Роль нейрон-специфической енолазы, глиального фибриллярного кислого белка и NR2-антител в ранней диагностике ишемического инсульта. *Трансляционная медицина*. 2021;8(5):5–20. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-5-20.
19. Sun Y., Qin Q., Shang Y.-J., Fang C.-P., Zhang W.-W., Gu M.-L., Chen Y., Hu Z.-D., Deng A.-M. The accuracy of glial fibrillary acidic protein in acute stroke differential diagnosis: A meta-analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2013;73(8):601–606. DOI: 10.3109/00365513.2013.830326.
20. Herrmann M., Vos P., Wunderlich M. T., de Bruijn C. H., Lamers K. J. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke*. 2000;31(11):2670–2677. DOI: 10.1161/01.str.31.11.2670.
21. Lasek-Bal A., Jedrzejowska-Szypulka H., Student S., Warsz-Wianecka A., Zareba K., Puz P., Bal W., Pawletko K., Lewin-Kowalik J. The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2019;70(2). DOI: 10.26402/jpp.2019.2.04.
22. Tokshilykova A. B., Sarkulova Z. N., Kabdrakhmanova G. B., Utepkaliyeva A. P., Tleuova A. S., Satenov Z. K. Neuron-Specific Markers and their Correlation with Neurological Scales in Patients with Acute Neuropathologies. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2020;70(8):1267–1273. DOI: 10.1007/s12031-020-01536-5.
23. Цыган Н. В., Трашков А. П. Патогенетические варианты повреждения головного мозга и фармакологическая церебропротекция на модели состояния головного мозга при кардиохирургических операциях в условиях искусственного кровообращения. *Военно-медицинский журнал*. 2014;335(10):34–45.
24. Onatsu J., Vanninen R., Jäkälä P., Mustonen P., Pulkki K., Korhonen M., Hedman M., Höglund K., Blennow K., Zetterberg H., Herukka S.-K., Taina M. Tau, S100B and NSE as Blood Biomarkers in Acute Cerebrovascular Events. *In Vivo*. 2020;34(5):2577–2586. DOI: 10.21873/invivo.12075.
25. Karimi S., Motamed H., Aliniagerdroudbari E., Babaniamansour S., Jami A., Baratloo A. The Prehospital Ambulance Stroke Test vs. the Cincinnati Prehospital Stroke Scale: a diagnostic accuracy study. *Australasian Journal of Paramedicine*. 2020;17. DOI: 10.33151/ajp.17.784.
26. Jensen M. B., Chacon M. R., Sattin J. A., Aleu A., Lyden P. D. The promise and potential pitfalls of serum biomarkers for ischemic stroke and transient ischemic attack. *The Neurologist*. 2008;14(4):243–246. DOI: 10.1097/NRL.0b013e31815a9945.
27. Dambinova S. A., Bettermann K., Glynn T., Tews M., Olson D., Weissman J. D., Sowell R. L. Diagnostic potential of the NMDA receptor peptide assay for acute ischemic stroke. PLoS ONE. 2012;7(7):e42362. DOI: 10.1371/journal.pone.0042362.
28. Maas M. B., Furie K. L. Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *Biomarkers in Medicine*. 2009;3(4):363–383. DOI: 10.2217/bmm.09.30.
29. Топузова М. П., Алексеева Т. М., Панина Е. Б., Вавилова Т. В., Поспелова М. Л., Иванова Н. Е. NR2-антитела как диагностический и прогностический биомаркер при инсульте. *Артериальная гипертензия*. 2020;26(1):27–36. DOI: 10.18705/1607-419X-2020-26-1-27-36.
30. Дамбинова С. А., Алиев К. Т., Бондаренко Е. В., Пономарев Г. В., Скоромец А. А., Скоромец А. П., Скоромец Т. А., Смолко Д. Г., Шумилина М. В. Биомаркеры ишемии головного мозга как новый метод доказательства эффективности нейроцитопротекторов. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2017;117(5):62–67. DOI: 10.17116/jnevro20171175162-67.
31. Пономарев Г. В., Вознюк И. А., Идзуми М. А., Скоромец А. А. Глутаматные биомаркеры в комплексной диагностике острой и хронической ишемии головного мозга. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2020;14(4):15–22.
32. Simpkins K. L., Guttmann R. P., Dong Y., Chen Z., Sokol S., Neumar R. W., Lynch D. R. Selective activation induced cleavage of the NR_2B subunit by calpain. *The Journal of Neuroscience*. 2003;23(36):11322–11331. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-36-11322.2003.
33. Dolmans L. S., Rutten F., Bartelink M.-L. E. L., van Dijk E. J., Nederkoorn P. J., Kappelle J., Hoes A. W. Serum biomarkers in patients suspected of transient ischaemic attack in primary care: a diagnostic accuracy study. *BMJ Open*. 2019;9(10):e031774. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-031774.
34. Pantcheva P., Elias M., Duncan K., Borlongan C. V., Tajiri N., Kaneko Y. The role of DJ-1 in the oxidative stress cell death cascade after stroke. *Neural Regeneration Research*. 2014;9(15):1430–1433. DOI: 10.4103/1673-5374.139458.
35. Weissman J. D., Khunteev G. A., Heath R., Dambinova S. A. NR2 antibodies: risk assessment of transient ischemic attack (TIA)/stroke in patients with history of isolated and multiple cerebrovascular events. *Journal of the Neurological Sciences*. 2011;300(1–2):97–102. DOI: 10.1016/j.jns.2010.09.023.

36. Kaneko Y., Shojo H., Burns J., Staples M., Tajiri N., Borlongan C. V. DJ-1 ameliorates ischemic cell death in vitro possibly via mitochondrial pathway. *Neurobiology of Disease*. 2014;62:56–61. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.09.007.
37. Li D.-B., Liu J.-L., Wang W., Luo X.-M., Zhou X., Li J.-P., Cao X.-L., Long X.-H., Chen J.-G., Qin C. Plasma Exosomal miRNA-122-5p and miR-300-3p as Potential Markers for Transient Ischaemic Attack in Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018;10:24. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00024.
38. Hossmann K.-A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2006;26(7–8):1057–1083. DOI: 10.1007/s10571-006-9008-1.
39. Chinnery P. F., Elliott H. R., Syed A., Rothwell P. M. Mitochondrial DNA haplogroups and risk of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: a genetic association study. *The Lancet Neurology*. 2010;9(5):498–503. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70083-1.
40. Титов Б. В., Барсова Р. М., Мартынов М. Ю., Никонова А. А., Фаворов А. В., Гусев Е. И., Фаворова О. О. Полиморфные варианты генов, кодирующих интерлейкин-6 и фибриноген, риск ишемического инсульта и уровни фибриногена. *Молекулярная биология*. 2012;46(1):93–102.
41. Randi A. M., Laffan M. A. Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017;15(1):13–20. DOI: 10.1111/jth.13551.
42. Lang Q., Zhou M., Feng H., Guo J., Chen N., He L. Research on the relationship between fibrinogen level and subtypes of the TOAST criteria in the acute ischemic stroke. *BMC Neurology*. 2013;13:207. DOI: 10.1186/1471-2377-13-207.
43. Di Napoli M., Singh P. Is plasma fibrinogen useful in evaluating ischemic stroke patients? Why, how, and when. *Stroke*. 2009;40(5):1549–15452. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.537084.
44. Tobin W. O., Kinsella J. A., Kavanagh G. F., O'Donnell J. S., McGrath R. T., Tierney S., Egan B., Feeley T. M., Coughlan T., Collins D. R., O'Neill D., Murphy S. J. X., Lim S. J., Murphy R. P., McCabe D. J. H. Profile of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor propeptide in an overall TIA and ischaemic stroke population and amongst subtypes. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;375:404–410. DOI: 10.1016/j.jns.2017.02.045.
45. Menih M., Križmarić M., Hojs Fabjan T. Clinical role of von Willebrand factor in acute ischemic stroke. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2017;129(13–14):491–496. DOI: 10.1007/s00508-017-1200-4.
46. Schellinger P. D., Bryan R. N., Caplan L. R., Detre J. A., Edelman R. R., Jaigobin C., Kidwell C. S., Mohr J. P., Sloan M., Sorensen A. G., Warach S. Evidence-based guideline: The role of diffusion and perfusion MRI for the diagnosis of acute ischemic stroke: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2010;75(2):177–185. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181e7c9dd.
47. Noorbakhsh-Sabet N., Zand R., Zhang Y., Abedi V. Artificial Intelligence Transforms the Future of Health Care. *The American Journal of Medicine*. 2019;132(7):795–801. DOI: 10.1016/j.amjmed.2019.01.017.

REFERENCES

1. Feigin V. L., Stark B. A., Johnson C. O., Roth G. A., Bisignano C., Abady G. G., et al. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Neurology*. 2021;20(10):795–820. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0.
2. Holtkamp M., Beghi E., Benninger F., Kälviäinen R., Rocamora R., Christensen H. European Stroke Organisation guidelines for the management of post-stroke seizures and epilepsy. *European Stroke Journal*. 2017;2(2):103–15. DOI: 10.1177/2396987317705536.
3. Mikhalyuk R. A. Transient ischemic attack as a predictor of ischemic stroke. Prescription. 2021;24(6):858–864. (In Russ.) DOI: 10.34883/PI.2021.24.6.009.
4. Nurzhanova R. B., Zhakenova G. J., Srailova K. B., Sheriyazdan J. S., Tashmanova A. B., Raimkulov B. N. Transitorial ishemic atacks: differential diagnosis, treatment, prophilactics (Literature review). *Vestnik Kazahskogo Nacional'nogo medicinskogo universiteta*. 2021;(3):85–90. (In Russ.) DOI: 10.53065/kaznmu.2021.60.74.016.
5. Shirokov E. A., Glatko V. L., Sapronenkova O. A. Modern Algorithms of Diagnosis and Treatment of Transient Ischemic Attacks. A. Modern Algorithms of Diagnostics and Treatment of Transient Ischemic Attacks. *Clinical Medicine*. 2021;99(2):85–90. (In Russ.) DOI: 10.30629/0023-2149-2021-99-2-85-90.
6. Shahjouei S., Sadighi A., Chaudhary D., Li J., Abedi V., Holland N., Phipps M., Zand R. A 5-Decade Analysis of Incidence Trends of Ischemic Stroke After Transient Ischemic Attack: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2021;78(1):77–87. DOI: 10.1001/jamaneurol.2020.3627.
7. Coutts S. B., Moreau F., Asdaghi N., Boulanger J.-M., Camden M.-C., Campbell B. C. V., Demchuk A. M., Field T. S., Goyal M., Krause M., Mandzia J., Menon B. K., Mikulik R., Penn A. M., Swartz R. H., Hill M. D. Rate and Prognosis of Brain Ischemia in Patients With Lower-Risk Transient or Persistent Minor Neurologic Events. *JAMA Neurology*. 2019;76(12):1439–45. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.3063.
8. Bertens L. C. M., Broekhuizen B. D. L., Naaktgeboren C. A., Rutten F. H., Hoes A. W., van Mourik Y., Moons K. G. M., Reitsma J. B. Use of expert panels to define the reference standard in diagnostic research: a systematic review of published methods and reporting. *PLoS Medicine*. 2013;10(10):e1001531. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001531.
9. Fonseca A. C., Merwick Á., Dennis M., Ferrari J., Ferro J. M., Kelly P., Lal A., Ois A., Olivot J. M., Purroy F. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on management of transient ischaemic attack. *European Stroke Journal*. 2021;6(2):CLXIII–CLXXXVI. DOI: 10.1177/2396987321992905.
10. Mukhamadeeva N. R., Kachemaeva O. V., Buzaev I. V., Galimova R. M., Yusupova I. I., Zagidullin Sh. Z., Zagidullin N. Sh. Serum biomarkers in brain injury. *Nervnye bolezni*. 2022;1:3–10. (In Russ.) DOI: 10.24412/2226-0757-2022-12406.
11. Odinak M. M., Tsygan N. V., Ivanov A. M., Kamilova T. A., Nikitin V. Y., Meshkova M. E. Protein S100β – a biomarker of brain damage. *Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii*. 2011;1(33):210–214. (In Russ.)
12. González-Quevedo A., González-García S., Hernández-Díaz Z., Fernández Concepción O., Quevedo Sotolongo L., Peña-Sánchez M., Márquez Rosales B., Santiesteban Freixas R., Fernández-Almirall I., Caridad Menéndez-Sainz M., Fernández-Carriera R. Serum neuron specific enolase could predict subclinical brain damage and the subsequent occurrence of brain related vascular events during follow up in essential hypertension. *Journal of the Neurological Sciences*. 2016;363:158–163. DOI: 10.1016/j.jns.2016.02.052.
13. Retraction: Protective effects of transduced Tat-DJ-1 protein against oxidative stress and ischemic brain injury. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013;45:e24. DOI: 10.1038/emm.2013.54.
14. Nadarajan V., Perry R. J., Johnson J., Werring D. J. Transient ischaemic attacks: mimics and chameleons. *Practical Neurology*. 2014;14(1):23–31. DOI: 10.1136/practneurol-2013-000782.
15. Tsygan N. V., Trashkov A. P. Brain damage and neurotrophic mechanisms of its defense on the model of acute cerebral hypoxia. *Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii*. 2013;3(43):102–110. (In Russ.)
16. Mattila O. S., Ashton N. J., Blennow K., Zetterberg H., Harve-Rytsälä H., Pihlasviita S., Ritvonen J., Sibolt G., Nukarinen T., Curtze S., Strbian D., Pystynen M., Tatlisumak T., Kuisma M., Lindsberg P. J. Ultra-Early Differential Diagnosis of Acute Cerebral Ischemia and Hemorrhagic Stroke by Measuring the Prehospital Release Rate of GFAP. *Clinical Chemistry*. 2021;67(10):1361–72. DOI: 10.1093/clinchem/hvab128.
17. Mayer C. A., Brunkhorst R., Niessner M., Pfeilschifter W., Steinmetz H., Foerch C. Blood levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in patients with neurological diseases. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e62101. DOI: 10.1371/journal.pone.0062101.

18. Chaykovskaya A. D., Topuzova M. P., Makhanova A. M., Mikheeva A. G., Korotkova D. S., Pospelova M. L., Panina E. B., Vavilova T. V., Vasilieva E. Yu., Simakov K. V., Sergeeva T. V., Alekseeva T. M. Role of neuron-specific enolase, glial fibrillar acidic protein and NR2-antibodies in early diagnostic of ischemic stroke. *Translational Medicine*. 2021;8(5):5–20. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-5-20.
19. Sun Y., Qin Q., Shang Y.-J., Fang C.-P., Zhang W.-W., Gu M.-L., Chen Y., Hu Z.-D., Deng A.-M. The accuracy of glial fibrillary acidic protein in acute stroke differential diagnosis: A meta-analysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2013;73(8):601–606. DOI: 10.3109/00365513.2013.830326.
20. Herrmann M., Vos P., Wunderlich M. T., de Bruijn C. H., Lamers K. J. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke*. 2000;31(11):2670–2677. DOI: 10.1161/01.str.31.11.2670.
21. Lasek-Bal A., Jedrzejowska-Szypulka H., Student S., Warsz-Wianecka A., Zareba K., Puz P., Bal W., Pawletko K., Lewin-Kowalik J. The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2019;70(2). DOI: 10.26402/jpp.2019.2.04.
22. Tokshilykova A. B., Sarkulova Z. N., Kabdrakhmanova G. B., Utepkaliyeva A. P., Tleuova A. S., Satenov Z. K. Neuron-Specific Markers and their Correlation with Neurological Scales in Patients with Acute Neuropathologies. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2020;70(8):1267–1273. DOI: 10.1007/s12031-020-01536-5.
23. Tsygan N. V., Trashkov A. P. Pathogenetic variants of brain damage and pharmacologic cerebroprotection on the model of the brain state during cardiac surgery under conditions of artificial circulation. *Voenno-medicinskij zhurnal*. 2014;335(10):34–45. (In Russ.)
24. Onatsu J., Vanninen R., Jäkälä P., Mustonen P., Pulkki K., Korhonen M., Hedman M., Höglund K., Blennow K., Zetterberg H., Herukka S.-K., Taina M. Tau, S100B and NSE as Blood Biomarkers in Acute Cerebrovascular Events. *In Vivo*. 2020;34(5):2577–2586. DOI: 10.21873/invivo.12075.
25. Karimi S., Motamed H., Aliniagerdroudbari E., Babaniamansour S., Jami A., Baratloo A. The Prehospital Ambulance Stroke Test vs. the Cincinnati Prehospital Stroke Scale: a diagnostic accuracy study. *Australasian Journal of Paramedicine*. 2020;17. DOI: 10.33151/ajp.17.784.
26. Jensen M. B., Chacon M. R., Sattin J. A., Aleu A., Lyden P. D. The promise and potential pitfalls of serum biomarkers for ischemic stroke and transient ischemic attack. *The Neurologist*. 2008;14(4):243–246. DOI: 10.1097/NRL.0b013e31815a9945.
27. Dambinova S. A., Bettermann K., Glynn T., Tews M., Olson D., Weissman J. D., Sowell R. L. Diagnostic potential of the NMDA receptor peptide assay for acute ischemic stroke. PLoS ONE. 2012;7(7):e42362. DOI: 10.1371/journal.pone.0042362.
28. Maas M. B., Furie K. L. Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *Biomarkers in Medicine.* 2009;3(4):363–383. DOI: 10.2217/bmm.09.30.
29. Topuzova M. P., Alekseeva T. M., Panina E. B., Vavilova T. V., Pospelova M. L., Ivanova N. E. NR2-antibodies as a diagnostic and prognostic biomarker in stroke. *Arterial Hypertension*. 2020;26(1): 27–36. (In Russ.) DOI: 10.18705/1607-419X-2020-26-1-27-36.
30. Dambinova S. A., Aliev K. T., Bondarenko E. V., Ponomarev G. V., Skoromets A. A., Skoromets A. P., Skoromets T. A., Smolko D. G., Shumilina M. V. Biomarkers of cerebral ischemia as a new method of proving the effectiveness of neurocytoprotectors. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii imeni S. S. Korsakova*. 2017;117(5):62–67. (In Russ.) DOI: 10.17116/jnevro20171175162-67.
31. Ponomarev G. V., Voznyuk I. A., Izumi M. A., Skoromets A. A. Glutamate biomarkers in complex diagnostics of acute and chronic cerebral ischemia. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2020;14(4):15–22. (In Russ.)
32. Simpkins K. L., Guttmann R. P., Dong Y., Chen Z., Sokol S., Neumar R. W., Lynch D. R. Selective activation induced cleavage of the NR_2B subunit by calpain. *The Journal of Neuroscience*. 2003;23(36):11322–11331. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-36-11322.2003.
33. Dolmans L. S., Rutten F., Bartelink M.-L. E. L., van Dijk E. J., Nederkoorn P. J., Kappelle J., Hoes A. W. Serum biomarkers in patients suspected of transient ischaemic attack in primary care: a diagnostic accuracy study. *BMJ Open*. 2019;9(10):e031774. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-031774.
34. Pantcheva P., Elias M., Duncan K., Borlongan C. V., Tajiri N., Kaneko Y. The role of DJ-1 in the oxidative stress cell death cascade after stroke. *Neural Regeneration Research*. 2014;9(15):1430–1433. DOI: 10.4103/1673-5374.139458.
35. Weissman J. D., Khunteev G. A., Heath R., Dambinova S. A. NR2 antibodies: risk assessment of transient ischemic attack (TIA)/stroke in patients with history of isolated and multiple cerebrovascular events. *Journal of the Neurological Sciences*. 2011;300(1–2):97–102. DOI: 10.1016/j.jns.2010.09.023.
36. Kaneko Y., Shojo H., Burns J., Staples M., Tajiri N., Borlongan C. V. DJ-1 ameliorates ischemic cell death in vitro possibly via mitochondrial pathway. *Neurobiology of Disease*. 2014;62:56–61. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.09.007.
37. Li D.-B., Liu J.-L., Wang W., Luo X.-M., Zhou X., Li J.-P., Cao X.-L., Long X.-H., Chen J.-G., Qin C. Plasma Exosomal miRNA-122-5p and miR-300-3p as Potential Markers for Transient Ischaemic Attack in Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018;10:24. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00024.
38. Hossmann K.-A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2006;26(7–8):1057–1083. DOI: 10.1007/s10571-006-9008-1.
39. Chinnery P. F., Elliott H. R., Syed A., Rothwell P. M. Mitochondrial DNA haplogroups and risk of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: a genetic association study. *The Lancet Neurology*. 2010;9(5):498–503. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70083-1.
40. Titov B. V., Barsova R. M., Martynov M. Yu. V., Nikonova A. A., Favorov A. V., Gusev E. I., Favorova O. O. Polymorphic Variants of Genes Encoding Interleukin-6 and Fibrinogen, Ischemic Stroke Risk and Fibrinogen Levels. *Molecular biology*. 2012;46(1):93–102. (In Russ.)
41. Randi A. M., Laffan M. A. Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017;15(1):13–20. DOI: 10.1111/jth.13551.
42. Lang Q., Zhou M., Feng H., Guo J., Chen N., He L. Research on the relationship between fibrinogen level and subtypes of the TOAST criteria in the acute ischemic stroke. *BMC Neurology*. 2013;13:207. DOI: 10.1186/1471-2377-13-207.
43. Di Napoli M., Singh P. Is plasma fibrinogen useful in evaluating ischemic stroke patients? Why, how, and when. *Stroke*. 2009;40(5):1549–15452. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.537084.
44. Tobin W. O., Kinsella J. A., Kavanagh G. F., O'Donnell J. S., McGrath R. T., Tierney S., Egan B., Feeley T. M., Coughlan T., Collins D. R., O'Neill D., Murphy S. J. X., Lim S. J., Murphy R. P., McCabe D. J. H. Profile of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor propeptide in an overall TIA and ischaemic stroke population and amongst subtypes. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017;375:404–410. DOI: 10.1016/j.jns.2017.02.045.
45. Menih M., Križmarić M., Hojs Fabjan T. Clinical role of von Willebrand factor in acute ischemic stroke. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2017;129(13–14):491–496. DOI: 10.1007/s00508-017-1200-4.
46. Schellinger P. D., Bryan R. N., Caplan L. R., Detre J. A., Edelman R. R., Jaigobin C., Kidwell C. S., Mohr J. P., Sloan M., Sorensen A. G., Warach S. Evidence-based guideline: The role of diffusion and perfusion MRI for the diagnosis of acute ischemic stroke: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2010;75(2): 177–185. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181e7c9dd.
47. Noorbakhsh-Sabet N., Zand R., Zhang Y., Abedi V. Artificial Intelligence Transforms the Future of Health Care. *The American Journal of Medicine*. 2019;132(7):795–801. DOI: 10.1016/j.amjmed.2019.01.017.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1508
УДК 615.036; 615.061

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья / Review article

Роль доксорубицина в формировании кардиотоксичности – общепринятое утверждение. Часть I. Распространенность и механизмы формирования (обзор)

Д. А. Андреев, Е. И. Балакин✉, А. С. Самойлов, В. И. Пустовойт✉✉

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна ФМБА России». 123098, Россия, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23

✉ **Контактное лицо:** Балакин Евгений Игоревич. **E-mail:** evgbalakin@yandex.ru
✉✉ **Контактное лицо:** Пустовойт Василий Игоревич. **E-mail:** vipust@yandex.ru

ORCID: Д. А. Андреев – https://orcid.org/0009-0004-5936-827X; Е. И. Балакин – https://orcid.org/0000-0001-5545-135X;
А. С. Самойлов – https://orcid.org/0000-0002-9241-7238; В. И. Пустовойт – https://orcid.org/0000-0003-3396-5813.

Статья поступила: 21.06.2023 **Статья принята в печать:** 16.01.2024 **Статья опубликована:** 19.01.2024

Резюме

Введение. Длительное использование антрациклинов в химиотерапии рака сопровождается развитием потенциально опасной для жизни кардиотоксичности. Несмотря на продолжающиеся с середины прошлого столетия исследования, подходы к выбору терапии остаются ограниченными.

Текст. В настоящее время в качестве химиотерапии наиболее широко используется доксорубицин. Ведущим механизмом побочного действия данного препарата является образование активных форм кислорода в митохондриях с опосредованным развитием окислительного стресса, способствующего повреждению миокарда. Однако несмотря на огромное количество научных работ, посвященных различным аспектам кардиотоксичности доксорубицина, ее профилактики и лечения, данный вопрос требует подробного изучения для выработки более совершенных методов ранней диагностики и своевременной кардиопротективной терапии.

Заключение. В текущем обзоре рассматриваются патогенетические механизмы кардиотоксичности, связанные с применением химиотерапии доксорубицином. Патогенез механизма гибели кардиомиоцитов предоставит возможность разработать новые диагностические и терапевтические подходы в клинической практике врача.

Ключевые слова: антрациклиновый химиопрепарат, доксорубицин, кардиотоксичность, кардиомиоциты, митохондрии

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

Вклад авторов. Д. А. Андреев проводил поиск литературных данных. Е. И. Балакин систематизировал литературные данные. А. С. Самойлов систематизировал литературные данные, участвовал в формировании статьи. В. И. Пустовойт участвовал в оформлении статьи, формировал заключение.

Благодарность. Исследование проводилось на инициативной основе.

Для цитирования: Андреев Д. А., Балакин Е. И., Самойлов А. С., Пустовойт В. И. Роль доксорубицина в формировании кардиотоксичности – общепринятое утверждение. Часть I. Распространенность и механизмы формирования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):190–199. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1508

The Role of Doxorubicin in the Formation of Cardiotoxicity – Generally Accepted Statement. Part I. Prevalence and Mechanisms of Formation (Review)

Dmitry A. Andreev, Evgenii I. Balakin✉, Alexander S. Samoilov, Vasily I. Pustovoit✉✉

State Research Center – A. I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency. 23, Marshala Novikova str., Moscow, 123098, Russia

✉ **Corresponding author:** Evgenii I. Balakin. **E-mail:** evgbalakin@yandex.ru
✉✉ **Corresponding author:** Vasily I. Pustovoit. **E-mail:** vipust@yandex.ru

ORCID: Dmitry A. Andreev – https://orcid.org/0009-0004-5936-827X; Evgenii I. Balakin – https://orcid.org/0000-0001-5545-135X;
Alexander S. Samoilov – https://orcid.org/0000-0002-9241-7238; Vasily I. Pustovoit – https://orcid.org/0000-0003-3396-5813.

Received: 21.06.2023 **Revised:** 16.01.2024 **Published:** 19.01.2024

Abstract

Introduction. Long-term use of anthracyclines during cancer chemotherapy has been associated with the development of potentially life-threatening cardiotoxicity. Despite researches ongoing since the middle of the last century, approaches to the choice of therapy remain limited.

Text. Doxorubicin currently is the most widely used chemotherapy. The leading side effect mechanism of the drug is the formation of reactive oxygen species in mitochondria with the mediated development of oxidative stress, which contributes to myocardial damage. However, despite the huge number of scientific papers devoted to various aspects of doxorubicin cardiotoxicity, its prevention and treatment, this issue requires detailed investigation in order to develop more advanced methods for early diagnosis and timely cardioprotective therapy.

© Андреев Д. А., Балакин Е. И., Самойлов А. С., Пустовойт В. И., 2024
© Andreev D. A., Balakin E. I., Samoilov A. S., Pustovoit V. I., 2024

Conclusion. The current review discusses the pathogenetic mechanisms of cardiotoxicity associated with the use of doxorubicin chemotherapy. The pathogenesis of the cardiomyocytes death mechanism will provide an opportunity to develop new diagnostic and therapeutic approaches in the clinical practice.

Keywords: anthracycline chemotherapy drug, doxorubicin, cardiotoxicity, cardiomyocytes, mitochondria

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 A. Andreev conducted a search for literary data. Evgenii I. Balakin systematized literary data. Alexander S. Samoilov systematized literary data, participated in the formation of the article. Vasily I. Pustovoit participated in the design of the article, formed the conclusion.

Acknowledgment. The study was conducted on an initiative basis.

For citation: Andreev D. A., Balakin E. I., Samoilov A. S., Pustovoit V. I. The role of doxorubicin in the formation of cardiotoxicity – generally accepted statement. Part I. Prevalence and mechanisms of formation. *Drug development & registration*. 2024;13(1):190–199. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1508

ВВЕДЕНИЕ

Открытие первого антрациклинового химиопрепарата данорубицина, являющегося продуктом жизнедеятельности *Streptomyces peucetius*, в 50-е годы XX столетия стало огромным прорывом в лечении онкологических заболеваний [1]. Клинические исследования подтвердили его высокую эффективность в лечении острых лейкозов [2]. Поиски альтернативных препаратов антрациклинового ряда привели к открытию в 1963 году доксорубицина (14-гидроксиданомицина), являющегося не только более эффективным при лейкемии, но и обладающего высокой активностью при солидных опухолях [3]. В настоящее время в клинической практике широко используются такие антрациклины, как данорубицин, идарубицин, эпирубицин и наиболее востребованный доксорубицин. Перечень показаний для использования антрациклинов в современной онкологии включает: лимфомы, миелому, саркомы, рак молочной железы, рак легкого, детские лейкемии.

Противоопухолевые свойства доксорубицина объясняются его способностью интеркалировать ДНК (образовывать комплексы с ДНК, встраиваться между ее нитями и индуцировать разрыв) и нарушать ее репарацию, опосредованную топоизомеразой II, что в итоге приводит к разрушению ядра и клеточному апоптозу. Кроме того, доксорубицин генерирует активные формы кислорода (АФК) посредством окислительно-восстановительных реакций, обусловленных его хиноновой составляющей, с последующим образованием супероксидного аниона, перекиси водорода и гидроксильного радикала [4]. В дополнение существуют доказательства нарушения сборки нуклеосом в результате действия доксорубицина [5].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск источников литературы проводился в базах данных: eLIBRARY, PubMed, Google Scholar, MEDLINE и EMBASE. Для получения релевантных ответов в вышеперечисленных научных электронных библиотеках в поисковом режиме формировался запрос: «антрациклиновый химиопрепарат», «доксорубицин», «кардиотоксичность доксорубицина» и «механизмы повреждения кардиомиоцитов доксорубицином» – для материалов, опубликованных до 1 мая 2023 года. При анализе возможности включения публикаций для последующего изучения учитывалось название и аннотация к каждой отобранной статье. После этого в целевых статьях изучался список литературы всех охваченных исследований для получения дополнительной информации. По завершении системного обзора проводился полный анализ текста отобранных публикаций. Наиболее информативные данные извлекались для последующего формирования основы текущей статьи. В процессе системного анализа определены механизмы кардиотоксичности, связанные с применением доксорубицина.

Поиск в базах данных (eLIBRARY, PubMed, Google Scholar, MEDLINE, и EMBASE) сформировал пул из 153753 статей. После чего данные статьи сортировались по типу исследования. Для получения наиболее качественной информации использовались систематические обзоры и метаанализ, где собирались и анализировались данные из множества исследований по конкретной теме. Также учитывались рандомизированные контролируемые исследования (РКИ), эксперименты, когортные и случайные исследования.

Помимо этого, исключались статьи с низким качеством исследований и содержанием ошибок или публикации с низким уровнем доказательности, а также исследования с недостаточным обследованием пациентов.

Все статьи с недостаточной доказательной базой были исключены из анализа, а удаление дубликатов и нерелевантных публикаций снизило общее количество до 301, из которых 211 публикаций было исключено после полнотекстового анализа, а 90 работ соответствовало критериям включения для последующего анализа.

В результате анализа опубликованных статей сформировано два обзора, которые в себя включают: часть I (кардиотоксичность доксорубицина: распространенность и механизмы формирования) и часть II (кардиотоксичность доксорубицина, не связанная с миоцитами, и стратегия кардиопротекции).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кардиотоксичность антрациклинов представлена спектром различных сердечно-сосудистых осложнений без четко обозначенных универсальных определений, поэтому встречаемость варьирует в зависимости от того, какой критерий берется за основу. Впервые кардиотоксичность доксорубицина была описана в 70-е годы XX столетия как проявление застойной сердечной недостаточности в результате кумулятивного дозозависимого эффекта, возникающего в 3 % случаев при при использовании в дозе 400 мг/м^2; 7 % – при дозе 550 мг/м^2; 18 % – при дозе 700 мг/м^2 [6]. В другом исследовании, включавшем 630 пациентов с раком молочной железы и раком легкого, сердечная недостаточность была выявлена в большем количестве случаев: 4,7 % при дозе 400 мг/м^2; 26 % при дозе 550 мг/м^2; 48 % при дозе 700 мг/м^2 [7]. Однако снижение систолической функции левого желудочка может быть выявлено по данным ЭХОКГ без клинических проявлений застойной сердечной недостаточности. Встречаемость асимптоматической сердечной недостаточности может быть значительно выше, чем симптоматической. Снижение фракции выброса левого желудочка ниже 50 % или на 10 % от исходного значения по данным сцинтиграфии наблюдалось в 9 % случаев при дозе 250 мг/м^2; 18 % при дозе 350 мг/м^2; 38 % при дозе 450 мг/м^2; 65 % при дозе 550 мг/м^2 [7]. В проспективном исследовании 2625 пациентов, получающих терапию доксорубицином, кардиотоксичность (определена как снижение фракции выброса левого желудочка ниже 50 % или на 10 % от исходного значения по данным эхокардиографии) выявлена у 9 % во время терапии, а в 98 % случаев – в первый год после завершения лечения [8]. Использование сердечного тропонина I в качестве маркера повреждения миокарда и стрейн-эхокардиографии еще более понизило порог выявления кардиотоксичности до снижения фракции выброса левого желудочка. В одном из исследований среди пациентов, получающих высокодозную химиотерапию (большинство из них получали антрациклины), в 30 % случаев зафиксировано повышение уровня тропонина I в первые 72 часа каждого цикла химиотерапии, что соответствовало высокой предиктивной вероятности будущей дисфункции левого желудочка [9]. Антрациклины также снижали показатель глобальной продольной деформации миокарда левого желудочка в 9 % случаев на короткий период после инициации химиотерапии [10]. В настоящее время встречаемость кардиотоксичности в популяции возросла и связана с кумулятивной зависимостью от дозы антрациклинов. Индивидуальную восприимчивость в отношении кардиотоксических эффектов довольно сложно спрогнозировать, так как она определяется наличием сердечно-сосудистых факторов риска и генетической вариабельностью [11]. Не менее важно исключить альтернативные факторы, провоцирующие повреждение миокарда, такие как коронарная болезнь сердца и сепсис у пациентов, получающих химиотерапию доксорубицином [12]. В исследовании M. E. Billingham, J. W. Mason, M. R. Bristow и др. гистопатологические изменения при эндомиокардиальной биопсии были выявлены у пациентов, получивших доксорубицин в кумулятивной дозе до 240 мг/м^2 [13, 14].

Типы кардиотоксичности

Химиотерапевтическая кардиотоксичность делится на два типа в соответствии с влиянием химиотерапевтического агента на кардиомиоциты. Тип I кардиотоксичности характеризуется гибелью кардиомиоцитов через механизм некроза или апоптоза и, таким образом, является необратимым. Тип II кардиотоксичности вызывает дисфункцию кардиомиоцитов без их гибели и, таким образом, является обратимым. Отсроченная кардиотоксичность, порождаемая антрациклинами, в частности доксорубицином, вызывает гибель кардиомиоцитов и относится к кардиотоксичности первого типа [15].

Токсичность антрациклинов может быть острой или хронической, в зависимости от начала появления симптоматики [8]. Острая кардиотоксичность обычно появляется в первые дни введения доксорубицина и напоминает острый миокардит с повреждением кардиомиоцитов, воспалительным инфильтратом и интерстициальным отеком [16]. Клинически острая антрациклиновая кардиотоксичность проявляется различными изменениями на ЭКГ (20–30 %), нарушениями ритма сердца (3 %) и обратимой систолической и диастолической дисфункцией у некоторых пациентов [17]. Хроническая кардиотоксичность появляется спустя месяцы и годы после начала лечения и подразделяется на раннюю и позднюю. Ранняя хроническая антрациклиновая кардиотоксичность проявляется в течение первого года после завершения лечения. Поздняя хроническая антрациклиновая кардиотоксичность может дебютировать спустя деся-

тилетия после завершения лечения [8]. Хроническая доксорубициновая кардиотоксичность проявляется как кардиомиопатия, что на клеточном уровне выглядит как вакуолизация цитоплазмы кардиомиоцитов, отеком саркоплазмы и митохондрий, нарушением пространственного ориентирования миофибрил, повреждением органелл и некрозом кардиомиоцитов [18]. Описанные гистопатологические изменения приводят к необратимому снижению фракции выброса левого желудочка на 10 % от исходного значения у 26 % пациентов и развитию симптоматической сердечной недостаточности у 7 % пациентов, получивших кумулятивную дозу доксорубицина 550 мг/м^2 [7].

Следует отметить, что классификация антрациклиновой кардиотоксичности с подразделением на острую, хроническую раннюю и хроническую позднюю была одобрена в 2015 году после проведения длительного исследования по оценке систолической функции левого желудочка в когорте из 2625 пациентов, получавших антрациклины [8]. Cardinale совместно с коллегами [8] предположил, что хронической поздней сердечной недостаточности, ассоциированной с терапией антрациклинами, может предшествовать доклиническое повреждение клеток миокарда, эволюционирующее в хроническую раннюю асимптоматическую сердечную недостаточность, характеризующуюся снижением фракции выброса левого желудочка, которая прогрессивно ухудшается спустя годы после завершения химиотерапии. Эта модель поддерживает гипотезу стадирования антрациклиновой кардиотоксичности как единого процесса. Понимание этиологии этого процесса позволяет разработать стратегию борьбы и профилактики необратимого повреждения кардиомиоцитов [15].

Механизмы формирования доксорубициновой кардиотоксичности

Хотя точный механизм кардиотоксичности антрациклинов остается неясным, существует ряд гипотез, включающих: генерацию свободных радикалов, аккумуляцию железа в митохондриях, ингибирование топоизомеразы, нарушение митохондриального биогенеза, деградацию миофиламентов, влияние на механизмы гибели кардиомиоцитов.

Продукция активных форм кислорода («железная гипотеза»)

Традиционно наиболее распространенной гипотезой объяснения антрациклиновой кардиотоксичности является генерация активных форм кислорода. В присутствии железа антрациклины вызывают увеличение продукции внутриклеточных активных форм кислорода, что влечет за собой оксидативное повреждение миокарда [19, 20]. Обратимое восстановление хиноновой части антрациклинов NADPH-дегидрогеназой вызывает образование семихиноновогo радикала с последующим самоокислением в присутствии кислорода и образованием исходного антрациклина и супероксиданиона. Этот безферментный механизм делает возможным восстановительный цикл между хиноновой и семихиноновой частями, приводя к аккумуляции супероксиданиона [21]. Супероксид спонтанно или при помощи супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода, которая в присутствии железа трансформируется в высокотоксичный гидроксильный радикал через реакцию Фетона [22]. Также антрациклины непосредственно взаимодействуют с железом, создавая комплексы, формирующие цикл Fe(II) и Fe(III), вызывая существенный оксидативный стресс и митохондриальную дисфункцию [23, 24]. Доксорубицинол – производное доксорубицина – секвестрирует Fe-S-группу аконитазы 1, вызывая ее инактивацию. Эта инактивация приводит к нарушению гомеостаза железа, увеличивая синтез рецепторов трансферрина, снижая синтез ферритина, вызывая увеличение свободного захвата железа [25]. Увеличение свободного железа в кардиомиоците также приводит к увеличению внутриклеточных активных форм кислорода посредством реакции Фентона. Доксорубицин также снижает экспрессию протеинов 2 и 3, защищающих от митохондриальной продукции активных форм кислорода, таким образом усиливая оксидативный стресс [26]. Хотя в исследованиях *in vivo* и *in vitro* подтвердилось увеличение активных форм кислорода в кардиомиоцитах после лечения антрациклинами, данная «железная гипотеза» подверглась сомнению в связи с тем, что хелаты железа вызывали различные эффекты, снижающие антрациклиновую кардиотоксичность в клинических исследованиях [19]. В то время как применение утилизаторов активных форм кислорода и антиоксидантов ослабляло апоптоз *in vitro* или в коротких экспериментах на животных [27], применение коэнзима Q10, L-карнитина, витамина С оказалось неэффективным для снижения антрациклиновой кардиотоксичности [28, 29]. Хелатор железа – декстразоксан снижает антрациклиновую кардиотоксичность, хотя другие хелаторы (дефероксамин, деферипрон, деферасинокс) не продемонстрировали подобного эффекта [30–32].

Митохондриальное железо

Противоречивые сообщения по поводу хелатов железа и антрациклиновой кардиотоксичности могут быть обусловлены различными эффектами аккумуляции железа в субклеточных компартментах кардиомиоцитов и особенно в митохондриях. Клетки сердца богаты митохондриями в связи с их постоянными высокими метаболическими потребностями, кроме того, они очень чувствительны к оксидативному стрессу в связи с относительно низким содержанием ферментов в сравнении с клетками других тканей [33]. Более того, доксорубицин преимущественно аккумулируется в миокардиальных митохонд-

риях в связи с высоким аффинитетом к кардиолипину, важному компоненту внутренней мембраны митохондрии [34]. Доксорубицин, также локализуясь в митохондрии, стимулирует высвобождение цитохрома С, вызывающего ускорение апоптоза [35]. В 2014 году было выявлено, что доксорубицин даунрегулирует синтез митохондриального протеина, экспортирующего железо ABC протеин-B8 (ABCB8), вызывая увеличение накопления железа в митохондрии. Уменьшение митохондриального железа посредством апрегуляции синтеза ABCB8 или применения митохондриально-проницаемого хелатора декстразозина снижает токсичность доксорубицина на моделях животных *in vivo* и *in vitro* [36].

Ингибирование топоизомеразы

Дисрегуляция метаболизма железа и оксидативного стресса в кардиомиоцитах только частично объясняют кардиотоксичность доксорубицина. Цитотоксический эффект также реализован посредством интеркаляции ДНК и образования комплексов с ДНК-топоизомеразой, что, в свою очередь, приводит к ее расщеплению [37]. Топоизомеразы – это ферменты, вызывающие временное раскручивание одной (Top1) или двух (Top2) цепочек ДНК, регулируя такие процессы, как репликация, транскрипция, рекомбинация и ремоделирование хроматина. У человека Top2 экспрессируется как Top2α- и Top2β-изоформа. Экспрессия Top2α очень высокая в пролиферирующих клетках (например, опухолевых) и недифференцированных клетках с различным уровнем экспрессирования в процессе клеточного цикла. Экспрессия Top2β осуществляется в дифференцированных клетках (например, в кардиомиоцитах) с относительно постоянным уровнем экспрессии генов в их клеточном цикле [38]. Связывая Top2α, доксорубицин ингибирует репликацию ДНК, таким образом останавливая клеточный цикл в фазе G1/G2, приводя к запуску механизма апоптоза в злокачественных клетках. Однако связывание доксорубицина с Top2β ингибирует транскрипцию нескольких ключевых регуляторов метаболизма кардиомиоцитов, таких как гамма-коактиватор рецептора пролиферации пероксисом 1-α (PGC1α) и PGC1β, вызывая дисфункцию митохондрий. Проведенные исследования в поддержку данного факта показали, что разрушение Top2β у мышей ослабило развитие доксорубицининдуцированной сердечной недостаточности с небольшим количеством разрывов двуспиральной ДНК и уменьшением митохондриальной дисфункциии в сравнении с контрольной группой мышей [39]. Декстразазозин в дополнение к своему железохелатирующему эффекту катализирует ингибирование Top2β, что, в свою очередь, еще более усиливает его кардиопротективный эффект [40]. Анализ кристаллической структуры декстразозина показывает его возможность стабилизации АТФ в АТФазном домене Top2β у человека, предотвращая открытие этой субъединицы, таким образом блокируя 2 мономера Top2β в закрытой димерной конфигурации. В результате доксорубицин не в состоянии связаться с комплексом ДНК-топоизомераза, что предотвращает повреждение ДНК и последующую гибель кардиомиоцита [41]. В дополнение к нуклеарным Top2α и Top2β в кардиомиоцитах осуществляется экспрессия митохондриальной Top1mt, которая регулирует гомеостаз митохондриальной ДНК и защищает ее от повреждения. У мышей с заблокированной Top1mt выявлено много митохондриальных нарушений, таких как нарушение синтеза ферментов дыхательной цепи и дезорганизация митохондриальной ультраструктуры, что угнетает функцию кардиомиоцитов в сравнении с контрольной группой мышей [42]. Таким образом, Top1mt обладает кардиопротективным эффектом, поддерживая гомеостаз митохондриальной ДНК, и некоторые генетические варианты Top1mt могут оказывать влияние на индивидуальный ответ в отношении к кардиотоксичности доксорубицина.

Нарушение митохондриального биогенеза

Кардиотоксичность доксорубицина характеризуется дисфункцией митохондрий, вызванной нарушением синтеза различных ферментов, которые напрямую или опосредованно влияют на восстановление или транскрипцию митохондриальных генов и включают ядерные и митохондриальные топоизомеразы (Top2β и Top1mt соответственно), факторы транскрипции, протеин p53. И у пациентов, и на животных моделях применение доксорубицина было ассоциировано с большим количеством делеций в кардиальной митохондриальной ДНК и, как следствие, приобретенных мутаций [43, 44]. Ассоциированное с доксорубицином ингибирование Top2β вызывало разрывы молекулы ДНК и ингибирование факторов транскрипции, вовлекаемых в регуляцию митохондриальных генов [39], таких как PGC1α, PGC1β, нуклеарного респираторного фактора (NRF1) и митохондриального фактора транскрипции (TFAM) [45]. Протективный эффект гистондеацетилазы (сиртуина 1) в отношении доксорубициновой кардиотоксичности, вероятнее всего, обусловлен активностью в качестве активатора PGC1α [45]. PGC1α регулирует экспресию TFAM, который связывает нуклеарные и митохондриальные сигналы и индуцирует экспрессию генов, закодированных в митохондриальной ДНК [46]. В митохондриях TFAM также действует как фактор, связывающий митохондриальную ДНК и Top1mt, непосредственно контролируя гомеостаз митохондриальной ДНК, что было продемонстрировано в эксперименте с мышами, у которых была повреждена Top1mt [42]. Поддержание гомеостаза матричной ДНК в условиях использования доксорубицина также осуществляется с помощью p53 [47, 48]. В кардиомиоцитах активация p53 стимулирует регенерацию ДНК, но одновременно угнетает PGC1, что влечет за собой гибель кардиомиоцитов. В экспериментах на мышах было

показано, что дефицит p53 в митохондриях снижает гибель клеток после терапии доксорубицином [49]. Таким образом, p53 может быть рассмотрен как основной виновник острой миокардиальной дисфункции после лечения доксорубицином [50–52]. В противоположность этому ряд исследований показали что p53 может обладать отсроченным кардиопротективным эффектом [53], вероятно, за счет протекции митохондриального генома [54]. В 2019 году было показано, что различный уровень напряжения кислорода в кардиомиоцитах и в опухолевых клетках может различным образом регулировать транскрипционную активность p53, влияя на тетрамер мышечной пируваткиназы 2 (PKM2), непосредственно взаимодействующей с p53 [55]. Тетрамерная PKM2 угнетает транскрипционную активность p53 и апоптоз в высокооксигенированных кардиомиоцитах, в свою очередь, усиливая гибель клеток в низкооксигенированных опухолевых клетках. Поэтому компоненты, стабилизирующие тетрамерную PKM2 [55], обладают не только уникальной способностью предотвращать кардиотоксичность доксорубицина, но и ограничивать рост опухоли [56].

Деградация миофиламентов

Доксорубициновая кардиомиопатия ассоциирована с «износом» и дезориентацией миофибрилл в кардиомиоцитах [57]. В миофиламентах поперечнополосатой мускулатуры позвоночных титин играет ключевую роль в формировании саркомеров и их стабильности, выполняя роль каркаса при их сборке [58]. При повреждении клеток сердца титин становится чувствителен к протеолитической деградации, что, в свою очередь, приводит к дезориентации миофибрилл и гибели кардиомиоцитов [59]. Было показано, что повреждение кардиомиоцитов, запускаемое доксорубицином, вызывает протеолизис титина в самом начале терапии [60]. Кальпаин – первый идентифицированный фермент, ответственный за деградацию титина [60]. Кальпаин активируется уже в самом начале терапии доксорубицином, вероятно, как последствие дисбаланса внутриклеточного гомеостаза кальция, который прямо и опосредованно индуцируется доксорубицином [61]. Вместе с тем кальпаины неообходимы для поддержания протеинового гомеостаза в кардиомиоцитах [62] и защиты кардиомиоцитов в условиях гемодинамического стресса [63]. Кроме того, в одном исследовании было показано, что избыточная экспрессия кальпастатина, эндогенного ингибитора кальпаина, ухудшает течение миокардиальной дисфунции, вызванной доксорубицином [64]. Помимо активации Ca^{2+}-зависимых протеолитических ферментов, доксорубицин может активировать миокардиальную матриксную металлопротеазу 2 (MMP2), цинкзависимую протеазу, хорошо известную в качестве разрушителя экстрацеллюлярного матрикса [65]. Неожиданно выяснилось, что MMP2 вовлекается в несколько острых биологических процессов в большей степени внутри клетки [66–68]. В нормальном состоянии MMP2 находится в конкретных субклеточных компартментах, включающих саркомер и цитоскелет, однако в условиях оксидативного стресса происходит активация MMP2, что приводит к разрушению специфических протеинов, таких как тропонин I [68, 69], легкие цепи миозина 1 [69, 70], α-актин и титин [71]. Более того, у трансгенных мышей с повышенной экспрессией миокардиальной MMP2 была выявлена сниженная систолическая функция, дезорганизация саркомеров, протеолизис миофиламентов и сниженный уровень внутриклеточного тропонина I [72]. При использовании доксорубицина уровень и активность MMP2 повышается уже в самом начале, что приводит к разрушению внутриклеточного титина и ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса [73]. Этот побочный эффект доксорубицина может быть предотвращен приемом ингибиторов MMP [73]. В 2019 году была показана связь фрагментов титина в моче и скрытого повреждения миокарда [74], в связи с чем рассмотрение фрагментов титина в моче как маркера раннего повреждения миокарда доксорубицином выглядит достаточно перспективно.

Изменение путей выживания и гибели клетки

Индукция программной гибели клетки представляет основной механизм противоопухолевой активности доксорубицина, однако офф-таргетная токсичность в отношении клеток с ограниченной регенеративной способностью, таких как кардиомиоциты, представляет серьезную проблему. В дополнение к апоптозу доксорубицин индуцирует другие формы клеточной смерти, такие как некроптоз, связанный с активностью Ca^{2+}/кальмодулинзависимой протеинкиназы II (CaMKII) [75] и Bnip3 [50]. Однако ингибирование апоптоза или некроптоза только частично улучшает выживаемость кардиомиоцитов в условиях повреждения доксорубицином [75], наводя на мысль о наличии альтернативного процесса, запускающего гибель клеток, такого как пироптоз [76] – ассоциированная с инфламмасомами клеточная смерть, основанная на образовании пор в плазматической мембране. Ключевыми молекулярными медиаторами пироптоза являются каспазы и Bnip3 [77]. В то время как роль апоптоза и некроза в доксорубициновой кардиотоксичности достаточно хорошо исследована [75, 78], аутофагия кардиомиоцитов в генезе их гибели в условиях лечения доксорубицином остается предметом дискуссии [79–82]. В последние несколько лет ряд исследований продемонстрировали, что доксорубицин ослабляет аутофагический поток на нескольких этапах, включающих формирование аутофагосом и лизосомальную деградацию посредством Akt-зависимого и Akt-независимого механизма [83–85]. Доксорубицин блокирует аутофагический поток в кардиомиоцитах, нарушая процесс ацидификации лизосом [84]. Блокада PI3K/Akt/mTOR ослабляет торможение аутофагии ми-

тохондрий, вызывающее улучшение удаления поврежденных органелл кардиомиоцитов в условиях лечения доксорубицином и, таким образом, сохраняет функцию кардиомиоцитов [83–85]. Хотя ингибирование Akt может помочь в восстановлении аутофагии в ответ на повреждение доксорубицином, данный фермент является медиатором сигналов выживания клетки и может быть кардиопротектором при повреждениях, вызванных доксорубицином. В присутствии Akt происходит экспрессия двух основных кардиопротективных пептидов, таких как BDNF и NGF. Однако доксорубицин осуществляет ее даунрегуляцию, приводя к снижению активности рецепторов тропомиозинассоциированной киназы B (TrkB), тропомиозинассоциированной киназы A (TrkA) [86–88]. В подтверждение этого факта экзогенный BDNF, или фармакологический активатор TrkB, защищает кардиомиоциты от доксорубицининдуцированного апоптоза, активируя TrkB/Akt-ось [89, 90]. Также известно, что эритроцитсвязанный фактор 2 (NrF2) активируется в условиях лечения доксорубицином, что приводит к апрегуляции гемоксигеназы, что, в свою очередь, вызывает разрушение гема с высвобождением свободного железа, которое запускает механизм ферроптоза в кардиомиоцитах [51]. Таким образом, внутренняя сеть сигнальных путей (PI3Kγ/Akt, Bnip3, Nrf2) играет ключевую роль в контроле выживаемости кардиомиоцитов, стабильности их органелл и програмной гибели клеток в ответ на воздействие доксорубицина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие в шестидесятые годы двадцатого столетия доксорубицина явилось прорывом в химиотерапии онкологических заболеваний. Этот препарат оказался не только эффективнее в лечении острых лейкозов, но и продемонстрировал активность при солидных опухолях. В настоящее время в клинической практике доксорубицин широко используются при лечении лимфом, множественной миеломы, сарком, рака молочной железы, рака легкого, детских лейкемий.

Однако уже через 10 лет после начала применения впервые была описана кардиотоксичность доксорубицина как проявление застойной сердечной недостаточности в результате кумулятивного дозозависимого эффекта. В настоящее время химиотерапевтическая кардиотоксичность делится на два типа в соответствии с влиянием химиотерапевтического агента на кардиомиоциты. Тип I кардиотоксичности характеризуется гибелью кардиомиоцитов через механизм некроза или апоптоза и, таким образом, является необратимым. Тип II кардиотоксичности вызывает дисфункцию кардиомиоцитов без их гибели и, таким образом, является обратимым. Отсроченная кардиотоксичность, вызываемая доксорубицином, приводит к гибели кардиомиоцитов и представляет собой кардиотоксичность первого типа.

Клинические проявления доксорубициновой кардиотоксичности весьма разнообразны, однако ведущим компонентом является сердечная недостаточность, которая часто сопровождается изменением геометрии камер сердца и снижением глобальной сократительной функции левого желудочка.

Хотя точный механизм кардиотоксичности доксорубицина остается до конца неясным, существует ряд гипотез, включающих генерацию свободных радикалов, аккумуляцию железа в митохондриях, ингибирование топоизомеразы, нарушение митохондриального биогенеза, деградацию миофиламентов, влияние на механизмы апоптоза кардиомиоцитов.

Однако несмотря на огромное количество научных работ, посвященных различным аспектам кардиотоксичности доксорубицина, данный вопрос требует более тщательного изучения и выработки более совершенных методов ранней диагностики, профилактики и более эффективной терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Di Marco A., Cassinelli G., Arcamone F. The discovery of daunorubicin. *Cancer treatment reports*. 1981;65(4):3–8.
2. Tan C., Tasaka H., Yu K. P., Murphy M. L., Karnofsky D. A. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*. 1967;20(3):333–353. DOI: 10.1002/1097-0142(1967)20:3<333::aid-cncr2820200302>3.0.co;2-k.
3. Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C., Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetius var. caesius. *Biotechnology and Bioengineering*. 1969;11(6):1101–1110. DOI: 10.1002/bit.260110607.
4. Chaulin A. M., Duplyakov D. V. Arrhythmogenic effects of doxorubicin. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2020;9(3):69–80. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-3-69-80.
5. Yang F., Kemp C. J., Henikoff S. Doxorubicin Enhances Nucleosome Turnover around Promoters. *Current Biology*. 2013;23(9):782–787. DOI: 10.1016/j.cub.2013.03.043.
6. Von Hoff D. D. Risk Factors for Doxorubicin-Induced Congestive Heart Failure. *Annals of Internal Medicine*. 1979;91(5):710. DOI: 10.7326/0003-4819-91-5-710.
7. Swain S. M., Whaley F. S., Ewer M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 2003;97(11):2869–2879. DOI: 10.1002/cncr.11407.
8. Cardinale D., Colombo A., Bacchiani G., Tedeschi I., Meroni C. A., Veglia F., Civelli M., Lamantia G., Colombo N., Curigliano G., Fiorentini C., Cipolla C. M. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*. 2015;131(22):1981–1988. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777.
9. Cardinale D., Sandri M. T., Martinoni A., Borghini E., Civelli M., Lamantia G., Cinieri S., Martinelli G., Fiorentini C., Cipolla C. M. Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *Annals of Oncology*. 2002;13(5):710–715. DOI: 10.1093/annonc/mdf170.
10. Thavendiranathan P., Poulin F., Lim K. D., Plana J. C., Woo A., Marwick T. H. Use of myocardial strain imaging by echocardiography for the early detection of cardiotoxicity in patients during and after cancer chemotherapy: a systematic review. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(25 Pt. A):2751–2768. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.01.073.
11. Linschoten M., Teske A. J., Cramer M. J., van der Wall E., Asselbergs F. W. Chemotherapy-Related Cardiac Dysfunction: A Systematic Review of Genetic Variants Modulating Individual Risk. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. 2018;11(1):e001753. DOI: 10.1161/CIRCGEN.117.001753.

12. Miller K. D., Nogueira L., Mariotto A. B., Rowland J. H., Yabroff K. R., Alfano C. M., Jemal A., Kramer J. L., Siegel R. L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019;69(5):363–385. DOI: 10.3322/caac.21565.
13. Billingham M. E., Mason J. W., Bristow M. R., Daniels J. R. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer treatment reports*. 1978;62(6):865–872.
14. Bristow M. R., Mason J. W., Billingham M. E., Daniels J. R. Doxorubicin cardiomyopathy: evaluation by phonocardiography, endomyocardial biopsy, and cardiac catheterization. *Annals of Internal Medicine*. 1978;88(2):168–175. DOI: 10.7326/0003-4819-88-2-168.
15. Ewer S. M., Ewer M. S. Cardiotoxicity profile of trastuzumab. *Drug Safety*. 2008;31(6):459–467. DOI: 10.2165/00002018-200831060-00002.
16. Ferrans V. J. Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. *Cancer treatment reports*. 1978;62(6):955–961.
17. Shan K., Lincoff A. M., Young J. B. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Annals of Internal Medicine*. 1996;125(1):47–58. DOI: 10.7326/0003-4819-125-1-199607010-00008.
18. Berry G. J., Jorden M. Pathology of radiation and anthracycline cardiotoxicity. *Pediatric Blood & Cancer*. 2005;44(7):630–637. DOI: 10.1002/pbc.20346.
19. Šimůnek T., Štěrba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*. 2009;61(1):154–171. DOI: 10.1016/S1734-1140(09)70018-0.
20. Xu X., Persson H. L., Richardson D. R. Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron. *Molecular Pharmacology*. 2005;68(2):261–271. DOI: 10.1124/mol.105.013383.
21. Doroshow J. H., Davies K. J. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261(7):3068–3074. DOI: 10.1016/s0021-9258(17)35747-2.
22. Winterbourn C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*. 1995;82–83:969–974. DOI: 10.1016/0378-4274(95)03532-X.
23. Keizer H. G., Pinedo H. M., Schuurhuis G. J., Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 1990;47(2):219–231. DOI: 10.1016/0163-7258(90)90088-j.
24. Myers C. E., Gianni L., Simone C. B., Klecker R., Greene R. Oxidative destruction of erythrocyte ghost membranes catalyzed by the doxorubicin-iron complex. *Biochemistry*. 1982;21(8):1707–1712. DOI: 10.1021/bi00537a001.
25. Minotti G., Recalcati S., Mordente A., Liberi G., Calafiore A. M., Mancuso C., Preziosi P., Cairo G. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *The FASEB Journal*. 1998;12(7):541–552. DOI: 10.1096/fasebj.12.7.541.
26. Bugger H., Guzman C., Zechner C., Palmeri M., Russell K. S., Russell R. R. Uncoupling protein downregulation in doxorubicin-induced heart failure improves mitochondrial coupling but increases reactive oxygen species generation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2011;67(6):1381–1388. DOI: 10.1007/s00280-010-1441-7.
27. Wu X.-Y., Luo A.-Y., Zhou Y.-R., Ren J.-H. N-acetylcysteine reduces oxidative stress, nuclear factor-κB activity and cardiomyocyte apoptosis in heart failure. *Molecular Medicine Reports*. 2014;10(2):615–624. DOI: 10.3892/mmr.2014.2292.
28. Van Dalen E. C., Caron H. N., Dickinson H. O., Kremer L. C. M. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011. DOI: 10.1002/14651858.CD003917.pub4.
29. Jo S.-H., Kim L. S., Kim S.-A., Kim H.-S., Han S.-J., Park W. J., Choi Y. J. Evaluation of Short-Term Use of N-Acetylcysteine as a Strategy for Prevention of Anthracycline-Induced Cardiomyopathy: EPOCH Trial – A Prospective Randomized Study. *Korean Circulation Journal*. 2013;43(3):174–181. DOI: 10.4070/kcj.2013.43.3.174.
30. Hasinoff B. B., Patel D., Wu X. The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;35(11):1469–1479. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.005.
31. Popelová O., Sterba M., Simůnek T., Mazurová Y., Guncová I., Hroch M., Adamcová M., Geršl V. Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;326(1):259–269. DOI: 10.1124/jpet.108.137604.
32. Elihu N., Anandasbapathy S., Frishman W. H. Chelation therapy in cardiovascular disease: ethylenediaminetetraacetic acid, deferoxamine, and dexrazoxane. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 1998;38(2):101–105. DOI: 10.1002/j.1552-4604.1998.tb04397.x.
33. Giordano F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(3):500–508. DOI: 10.1172/JCI200524408.
34. Goormaghtigh E., Chatelain P., Caspers J., Ruysschaert J. M. Evidence of a complex between adriamycin derivatives and cardiolipin: Possible role in cardiotoxicity. *Biochemical Pharmacology*. 1980;29(21):3003–3010. DOI: 10.1016/0006-2952(80)90050-7.
35. Childs A. C., Phaneuf S. L., Dirks A. J., Phillips T., Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Research*. 2002;62(16):4592–4598.
36. Ichikawa Y., Ghanefar M., Bayeva M., Wu R., Khechaduri A., Naga Prasad S. V., Mutharasan R. K., Naik T. J., Ardehali H. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(2):617–630. DOI: 10.1172/JCI72931.
37. Tewey K. M., Rowe T. C., Yang L., Halligan B. D., Liu L. F. Adriamycin-Induced DNA Damage Mediated by Mammalian DNA Topoisomerase II. *Science*. 1984;226(4673):466–468. DOI: 10.1126/science.6093249.
38. Wang J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002;3(6):430–440. DOI: 10.1038/nrm831.
39. Zhang S., Liu X., Bawa-Khalfe T., Lu L.-S., Lyu Y. L., Liu L. F., Yeh E. T. H. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*. 2012;18(11):1639–1642. DOI: 10.1038/nm.2919.
40. Vavrova A., Jansova H., Mackova E., Machacek M., Haskova P., Tichotova L., Sterba M., Simunek T. Catalytic inhibitors of topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. *PloS One*. 2013;8(10):e76676. DOI: 10.1371/journal.pone.0076676.
41. Classen S., Olland S., Berger J. M. Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(19):10629–10634. DOI: 10.1073/pnas.1832879100.
42. Khiati S., Dalla Rosa I., Sourbier C., Ma X., Rao V. A., Neckers L. M., Zhang H., Pommier Y. Mitochondrial Topoisomerase I (Top1mt) Is a Novel Limiting Factor of Doxorubicin Cardiotoxicity. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(18):4873–4881. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3373.
43. Lebrecht D., Kokkori A., Ketelsen U. P., Setzer B., Walker U. A. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *The Journal of Pathology*. 2005;207(4):436–444. DOI: 10.1002/path.1863.
44. Lebrecht D., Setzer B., Ketelsen U. P., Haberstroh J., Walker U. A. Time-Dependent and Tissue-Specific Accumulation of mtDNA and Respiratory Chain Defects in Chronic Doxorubicin Cardiomyopathy. *Circulation*. 2003;108(19):2423–2429. DOI: 10.1161/01.CIR.0000093196.59829.DF.
45. Yin J., Guo J., Zhang Q., Cui L., Zhang L., Zhang T., Zhao J., Li J., Middleton A., Carmichael P. L., Peng S. Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway. *Toxicology in Vitro*. 2018;51:1–10. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.05.001.

46. Vega R. B., Horton J. L., Kelly D. P. Maintaining ancient organelles. Mitochondrial biogenesis and maturation. *Circulation Research*. 2015;116(11):1820–1834. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305420.
47. Kruiswijk F., Labuschagne C. F., Vousden K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015;16(7):393–405. DOI: 10.1038/nrm4007.
48. Zhuang J., Ma W., Lago C. U., Hwang P. M. Metabolic regulation of oxygen and redox homeostasis by p53: lessons from evolutionary biology? *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;53(6):1279–1285. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.026.
49. Hoshino A., Mita Y., Okawa Y., Ariyoshi M., Iwai-Kanai E., Ueyama T., Ikeda K., Ogata T., Matoba S. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nature Communications*. 2013;4(1):2308. DOI: 10.1038/ncomms3308.
50. Dhingra R., Margulets V., Chowdhury S. R., Thliveris J., Jassal D., Fernyhough P., Dorn G. W., Kirshenbaum L. A. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(51):E5537–E5544. DOI: 10.1073/pnas.1414665111.
51. Fang X., Wang H., Han D., Xie E., Yang X., Wei J., Gu S., Gao F., Zhu N., Yin X., Cheng Q., Zhang P., Dai W., Chen J., Yang F., Yang H.-T., Linkermann A., Gu W., Min J., Wang F. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(7):2672–2680. DOI: 10.1073/pnas.1821022116.
52. Zhu W., Soonpaa M. H., Chen H., Shen W., Payne R. M., Liechty E. A., Caldwell R. L., Shou W., Field L. J. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation*. 2009;119(1):99–106. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.799700.
53. Zhu W., Zhang W., Shou W., Field L. J. P53 inhibition exacerbates late-stage anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular Research*. 2014;103(1):81–89. DOI: 10.1093/cvr/cvu118.
54. Nithipongvanitch R., Ittarat W., Velez J. M., Zhao R., St. Clair D. K., Oberley T. D. Evidence for p53 as Guardian of the Cardiomyocyte Mitochondrial Genome Following Acute Adriamycin Treatment. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2007;55(6):629–639. DOI: 10.1369/jhc.6A7146.2007.
55. Saleme B., Gurtu V., Zhang Y., Kinnaird A., Boukouris A. E., Gopal K., Ussher J. R., Sutendra G. Tissue-specific regulation of p53 by PKM2 is redox dependent and provides a therapeutic target for anthracycline-induced cardiotoxicity. *Science Translational Medicine*. 2019;11(478):eaau8866. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau8866.
56. Sala V., Li M., Ghigo A. New avenues in cardio-oncology. *Aging*. 2019;11(4):1075–1076. DOI: 10.18632/aging.101817.
57. Sawyer D. B., Zuppinger C., Miller T. A., Eppenberger H. M., Suter T. M. Modulation of Anthracycline-Induced Myofibrillar Disarray in Rat Ventricular Myocytes by Neuregulin-1β and Anti-erbB2: Potential Mechanism for Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity. *Circulation*. 2002;105(13):1551–1554. DOI: 10.1161/01.CIR.0000013839.41224.1C.
58. Granzier H. L., Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circulation Research*. 2004;94(3):284–295. DOI: 10.1161/01.RES.0000117769.88862.F8.
59. Ali M. A. M., Cho W. J., Hudson B., Kassiri Z., Granzier H., Schulz R. Titin is a Target of Matrix Metalloproteinase-2: Implications in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*. 2010;122(20):2039–2047. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930222.
60. Lim C. C., Zuppinger C., Guo X., Kuster G. M., Helmes M., Eppenberger H. M., Suter T. M., Liao R., Sawyer D. B. Anthracyclines Induce Calpain-dependent Titin Proteolysis and Necrosis in Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(9):8290–8299. DOI: 10.1074/jbc.M308033200.
61. Sala V., Della Sala A., Hirsch E., Ghigo A. Signaling Pathways Underlying Anthracycline Cardiotoxicity. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2020;32(15):1098–1114. DOI: 10.1089/ars.2020.8019.
62. Galvez A. S., Diwan A., Odley A. M., Hahn H. S., Osinska H., Melendez J. G., Robbins J., Lynch R. A., Marreez Y., Dorn G. W. Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circulation Research*. 2007;100(7):1071–1078. DOI: 10.1161/01.RES.0000261938.28365.11.
63. Taneike M., Mizote I., Morita T., Watanabe T., Hikoso S., Yamaguchi O., Takeda T. , Oka T., Tamai T., Oyabu J., Murakawa T., Nakayama H., Nishida K., Takeda J., Mochizuki N., Komuro I., Otsu K. Calpain protects the heart from hemodynamic stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(37):32170–32177. DOI: 10.1074/jbc.M111.248088.
64. Wang Y., Zheng D., Wei M., Ma J., Yu Y., Chen R., Lacefield J. C., Xu H., Peng T. Over-expression of calpastatin aggravates cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Cardiovascular Research*. 2013;98(3):381–390. DOI: 10.1093/cvr/cvt048.
65. Chan B. Y. H., Roczkowsky A., Moser N., Poirier M., Hughes B. G., Ilarraza R., Schulz R. Doxorubicin induces de novo expression of N-terminal-truncated matrix metalloproteinase-2 in cardiac myocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2018;96(12):1238–1245. DOI: 10.1139/cjpp-2018-0275.
66. Doucet A., Overall C. Protease proteomics: Revealing protease in vivo functions using systems biology approaches. *Molecular Aspects of Medicine*. 2008;29(5):339–358. DOI: 10.1016/j.mam.2008.04.003.
67. McCawley L. J., Matrisian L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology*. 2001;13(5):534–540. DOI: 10.1016/s0955-0674(00)00248-9.
68. Gao C. Q., Sawicki G., Suarez-Pinzon W. L., Csont T., Wozniak M., Ferdinandy P., Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovascular Research*. 2003;57(2):426–433. DOI: 10.1016/s0008-6363(02)00719-8.
69. Wang W., Schulze C. J., Suarez-Pinzon W. L., Dyck J. R. B., Sawicki G., Schulz R. Intracellular Action of Matrix Metalloproteinase-2 Accounts for Acute Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Circulation*. 2002;106(12):1543–1549. DOI: 10.1161/01.CIR.0000028818.33488.7B.
70. Sawicki G., Leon H., Sawicka J., Sariahmetoglu M., Schulze C. J., Scott P. G., Szczesna-Cordary D., Schulz R. Degradation of Myosin Light Chain in Isolated Rat Hearts Subjected to Ischemia-Reperfusion Injury: A New Intracellular Target for Matrix Metalloproteinase-2. *Circulation*. 2005;112(4):544–552. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.531616.
71. Sung M. M., Schulz C. G., Wang W., Sawicki G., Bautista-López N. L., Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein α-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007;43(4):429–436. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2007.07.055.
72. Bergman M. R., Teerlink J. R., Mahimkar R., Li L., Zhu B. Q., Nguyen A., Dahi S., Karliner J. S., Lovett D. H. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2007;292(4):H1847–H1860. DOI: 10.1152/ajpheart.00434.2006.
73. Chan B. Y. H., Roczkowsky A., Cho W. J., Poirier M., Sergi C., Keschrumrus V., Churko J. M., Granzier H., Schulz R. MMP inhibitors attenuate doxorubicin cardiotoxicity by preventing intracellular and extracellular matrix remodelling. *Cardiovascular Research*. 2021;117(1):188–200. DOI: 10.1093/cvr/cvaa017.
74. Tanihata J., Nishioka N., Inoue T., Bando K., Minamisawa S. Urinary Titin Is Increased in Patients After Cardiac Surgery. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2019;6. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00007.
75. Zhang T., Zhang Y., Cui M., Jin L., Wang Y., Lv F., Liu Y., Zheng W., Shang H., Zhang J., Zhang M., Wu H., Guo J., Zhang X., Hu X., Cao C.-M., Xiao R.-P. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nature Medicine*. 2016;22(2):175–182. DOI: 10.1038/nm.4017.

76. Meng L., Lin H., Zhang J., Lin N., Sun Z., Gao F., Luo H., Ni T., Luo W., Chi J., Guo H. Doxorubicin induces cardiomyocyte pyroptosis via the TINCR-mediated posttranscriptional stabilization of NLR family pyrin domain containing 3. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2019;136:15–26. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.08.009.
77. Zheng X., Zhong T., Ma Y., Wan X., Qin A., Yao B., Zou H., Song Y., Yin D. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis via caspase-3/GSDME. *Life Sciences*. 2020;242:117186. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117186.
78. Arola O. J., Saraste A., Pulkki K., Kallajoki M., Parvinen M., Voipio-Pulkki L. M. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Research*. 2000;60(7):1789–1792.
79. Bartlett J. J., Trivedi P. C., Pulinilkunnil T. Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2017;104:1–8. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.01.007.
80. Koleini N., Kardami E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget*. 2017;8(28):46663–46680. DOI: 10.18632/oncotarget.16944.
81. Li M., Russo M., Pirozzi F., Tocchetti C. G., Ghigo A. Autophagy and cancer therapy cardiotoxicity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2020;1867(3):118493. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.06.007.
82. Xiao B., Hong L., Cai X., Mei S., Zhang P., Shao L. The true colors of autophagy in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncology Letters*. 2019;18(3):2165–2172. DOI: 10.3892/ol.2019.10576.
83. Bartlett J. J., Trivedi P. C., Yeung P., Kienesberger P. C., Pulinilkunnil T. Doxorubicin impairs cardiomyocyte viability by suppressing transcription factor EB expression and disrupting autophagy. *Biochemical Journal*. 2016;473(21):3769–3789. DOI: 10.1042/BCJ20160385.
84. Li D. L., Wang Z. V., Ding G., Tan W., Luo X., Criollo A., Xie M., Jiang N., May H., Kyrychenko V., Schneider J. W., Gillette T. G., Hill J. A. Doxorubicin Blocks Cardiomyocyte Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Acidification. *Circulation*. 2016;133(17):1668–1687. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017443.
85. Li M., Sala V., De Santis M. C., Cimino J., Cappello P., Pianca N., Di Bona A., Margaria J. P., Martini M., Lazzarini E., Pirozzi F., Rossi L., Franco I., Bornbaum J., Heger J., Rohrbach S., Perino A., Tocchetti C. G., Lima B. H. F., Teixeira M. M., Porporato P. E., Schulz R., Angelini A., Sandri M., Ameri P., Sciarretta S., Lima-Júnior R. C. P., Mongillo M., Zaglia T., Morello F., Novelli F., Hirsch E., Ghigo A. Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Inhibition Protects From Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth. *Circulation*. 2018;138(7):696–711. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030352.
86. Ejiri J., Inoue N., Kobayashi S., Shiraki R., Otsui K., Honjo T., Takahashi M., Ohashi Y., Ichikawa S., Terashima M., Mori T., Awano K., Shinke T., Shite J., Hirata K.-I., Yokozaki H., Kawashima S., Yokoyama M. Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;112(14):2114–2120. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.476903.
87. Meloni M., Caporali A., Graiani G., Lagrasta C., Katare R., Van Linthout S., Spillmann F., Campesi I., Madeddu P., Quaini F., Emanueli C. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circulation Research*. 2010;106(7):1275–1284. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.210088.
88. Liao D., Zhang C., Liu N., Cao L., Wang C., Feng Q., Yao D., Long M., Jiang P. Involvement of neurotrophic signaling in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020;19(2):1129–1135. DOI: 10.3892/etm.2019.8276.
89. Hang P., Zhao J., Sun L., Li M., Han Y., Du Z., Li Y. Brain-derived neurotrophic factor attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction through activating Akt signalling in rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017;21(4):685–696. DOI: 10.1111/jcmm.13012.
90. Zhao J., Du J., Pan Y., Chen T., Zhao L., Zhu Y., Chen Y., Zheng Y., Liu Y., Sun L., Hang P., Du Z. Activation of cardiac TrkB receptor by its small molecular agonist 7,8-dihydroxyflavone inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing mitochondrial oxidative phosphorylation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;130:557–567. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.024.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1461
УДК 615.038

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Сравнительная оценка диуретической активности настоев четырех видов рода астрагал (*Astragalus* L.) в эксперименте

У. А. Матвиенко[1]✉, А. Ю. Каретникова[1], Н. А. Дурнова[1, 2]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ имени В. И. Разумовского» Минздрава России). 410012, Россия, Саратовская область, г. Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112
[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:** Матвиенко Ульяна Андреевна. **E-mail:** matvienko.ulia2104@gmail.com

ORCID: У. А. Матвиенко – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165; А. Ю. Каретникова – https://orcid.org/0000-0002-8043-3142;
Н.А. Дурнова – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519.

Статья поступила: 03.04.2023 **Статья принята в печать:** 08.02.2024 **Статья опубликована:** 09.02.2024

Резюме

Введение. *Astragalus* L. – самый крупный род семейства *Fabaceae* и один из крупнейших родов сосудистых растений на Земле. Официнальным видом сырья, вошедшим в 7-е издание Европейской фармакопеи, является *Radix Astragali* – высушенный корень *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge и *Astragalus mongholicus* Bunge. Экстракты, полученные из корня астрагала, обладают противовоспалительным, иммуностимулирующим, антиоксидантным, диуретическим действием. В традиционной медицине активно применяется трава астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.). Настой травы *Astragali dasyanthi* обладает успокаивающим, гипотензивным и мочегонным действием. Однако сырье не является официнальным и не входит в перечень растительного сырья Государственной фармакопеи РФ XIV издания. Перспективными видами рода *Astragalus* L. могут являться не только астрагал перепончатый и астрагал шерстистоцветковый, но и другие виды, например астрагал изменчивый (*Astragalus varius* S.G. Gmel.), астрагал яйцеплодный (*Astragalus testiculatus* Pall.), астрагал Хеннинга (*Astragalus henningii* (Stev.) Klok.), которые широко распространены на территории Саратовской области. Ввиду имеющихся данных о наличии у травы *Astragalus dasyanthus* Pall. и *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge диуретического эффекта интерес представляет изучение диуреза извлечений из травы других видов рода *Astragalus* L.

Цель. Изучить диуретическую активность настоев из травы четырех видов астрагала: а. шерстистоцветкового, а. изменчивого, а. яйцеплодного и а. Хеннинга в 4- и 24-часовых экспериментах на крысах-самцах.

Материалы и методы. Изучение диуретической активности водных извлечений из травы четырех видов астрагала было выполнено на 42 белых крысах-самцах, которые были разделены на 6 опытных и контрольную группы по 6 животных. Водные извлечения из травы астрагалов готовили в соотношении сырье – экстрагент 1 : 10, все полученные настои соответствовали требованиям, предъявляемым к данным лекарственным формам согласно ОФС ГФ РФ XIV издания. Водные извлечения вводились животным внутрижелудочно через зонд в дозе 100 мг/кг. Во время проведения эксперимента собирались 4-часовые и 24-часовые порции мочи. Препаратом сравнения в 4-часовом эксперименте был фуросемид в дозе 1 мг/кг, а в 24-часовом опыте – гидрохлортиазид в дозе 20 мг/кг.

Результаты и обсуждение. В результате эксперимента подтвержден диуретический эффект настоя травы а. шерстистоцветкового как в 4-часовом эксперименте, так и в 24-часовом эксперименте. Также в обоих экспериментах наиболее выраженный диуретический эффект выявлен у настоя из травы а. Хеннинга в дозе 100 мг/кг по сравнению с настоями травы а. шерстистоцветкового, а. изменчивого. Диуретический эффект а. Хеннинга превышал диуретическую активность фуросемида в дозе 1 мг/кг, при этом наблюдали сопоставимый эффект с гидрохлортиазидом в дозе 20 мг/кг. Диуретический эффект настоя травы а. изменчивого в 4-часовом эксперименте превышал диуретический эффект настоя травы а. шерстистоцветкового и фуросемида в дозе 1 мг/кг, а в 24-часовом эксперименте был сопоставим с диуретическим эффектом настоя травы а. шерстистоцветкового, но ниже, чем у гидрохлортиазида в дозе 20 мг/кг и настоя травы а. Хеннинга. Диуретический эффект настоя травы а. яйцеплодного в дозе 100 мг/кг не выявлен как в 4-часовом, так и в 24-часовом эксперименте. Диуретическая активность группы, получавшей настой травы а. яйцеплодного, находилась на уровне контрольной группы, по сравнению с другими опытными группами наблюдалось статистически значимое снижение диуреза у животных.

Заключение. В эксперименте подтвержден диуретический эффект настоя травы астрагала шерстистоцветкового и впервые обнаружен диуретический эффект у настоя травы астрагала изменчивого и у настоя травы астрагала Хеннинга. Среди исследуемых настоев наиболее выраженный диуретический эффект наблюдался у настоя травы астрагала Хеннинга. Диуретический эффект настоя травы астрагала изменчивого выше диуретического эффекта настоя травы астрагала шерстистоцветкового в 4-часовом эксперименте и не отличался по эффективности от настоя травы астрагала шерстистоцветкового в 24-часовом эксперименте. Диуретический эффект настоя травы астрагала яйцеплодного не выявлен.

Ключевые слова: астрагал шерстистоцветковый, астрагал изменчивый, астрагал Хеннинга, астрагал яйцеплодный, диуретическая активность

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

Вклад авторов. У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова спланировали дизайн эксперимента. У. А. Матвиенко, А. Ю. Каретникова осуществляли проведение экспериментальных исследований и статистическую обработку результатов. У. А. Матвиенко, Н. А. Дурнова, А. Ю. Каретникова участвовали в написании текста статьи, в том числе заключения и обсуждения результатов.

© Матвиенко У. А., Каретникова А. Ю., Дурнова Н. А., 2024
© Matvienko U. A., Karetnikova A. Yu., Durnova N. A., 2024

Для цитирования: Матвиенко У. А., Каретникова А. Ю., Дурнова Н. А. Сравнительная оценка диуретической активности настоев четырех видов рода астрагал (*Astragalus* L.) в эксперименте. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):200–207. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1461

Comparative Evaluation of the Diuretic Activity of Infusions of Four Species of the Genus Astragalus (*Astragalus* L.) in the Experiment

Uliana A. Matvienko[1]✉, Alena Yu. Karetnikova[1], Natalya A. Durnova[1, 2]

[1] Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky (Razumovsky University). 112, st. B. Kazachya, Saratov, Saratov region, 410012, Russia
[2] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Uliana A. Matvienko. **E-mail:** matvienko.ulia2104@gmail.com

ORCID: Uliana A. Matvienko – https://orcid.org/0000-0002-1714-9165; Alena Yu. Karetnikova – https://orcid.org/0000-0002-8043-3142; Natalya A. Durnova – https://orcid.org/0000-0003-4628-9519.

Received: 03.04.2023 **Revised:** 08.02.2024 **Published:** 09.02.2024

Abstract

Introduction. *Astragalus* L. is the largest genus of the *Fabaceae* family and one of the largest genera of vascular plants on Earth. The official type of raw material included in the 7th edition of the European Pharmacopoeia is *Radix Astragali* – the dried root of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge and *Astragalus mongholicus* Bunge. Extracts obtained from astragalus root have anti-inflammatory, immunostimulatory, antioxidant, diuretic effects. In traditional medicine, the herb of *Astragalus dasyanthus* Pall. is actively used. An infusion of the herb of *Astragali dasyanthi* has sedative, hypotensive and diuretic effects. However, the raw material is not official and is not included in the list of plant raw materials of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation of the XIV edition. Promising species of the genus *Astragalus* L. can be not *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge and *Astragalus dasyanthus* Pall., but also other species, for example, *Astragalus varius* S.G. Gmel., *Astragalus testiculatus* Pall., *Astragalus henningii* (Stev.) Klok., which are widespread in the Saratov region. In view of the available data on the presence of the herb of *Astragalus dasyanthus* Pall. and *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge of the diuretic effect, it is of interest to study the diuresis of extracts from the herb of other species of the genus *Astragalus* L.

Aim. To study the diuretic activity of infusions from the herb of four types of astragalus: *Astragalus dasyanthus*, *Astragalus varius*, *Astragalus testiculatus*, *Astragalus henningii* in 4- and 24-hour experiments on male rats.

Materials and methods. The study of the diuretic activity of aqueous extracts from the herb of four types of *Astragalus* was performed on 42 white male rats, which were divided into 6 experimental and control groups of 6 animals. Aqueous extracts from *Astragalus* herb were prepared in the ratio of raw material-extractant 1:10, all obtained infusions met the requirements for these dosage forms according to the General Pharmacopoeia of the State Fund of the Russian Federation of the XIV edition. Aqueous extracts were administered to animals intragastrically through an umbrella at a dose of 100 mg/kg. During the experiment were collected 4-hour and 24-hour portions of urine. The comparison drug in the 4-hour experiment was furosemide at a dose of 1 mg/kg, and in the 24-hour experiment, hydrochlorothiazide at a dose of 20 mg/kg.

Results and discussion. As a result of the experiment, the diuretic effect of the infusion of the herb of *Astragalus dasyanthus* both in the 4-hour experiment and in the 24-hour experiment. Also in both experiments, the most pronounced diuretic effect was found in the infusion of the herb of *Astragalus henningii* at a dose of 100 mg/kg compared with herb infusions *Astragalus dasyanthus*, *Astragalus varius*. Diuretic effect *Astragalus henningii* exceeded the diuretic activity of furosemide at a dose of 1 mg/kg, while a comparable effect was observed with hydrochlorothiazide at a dose of 20 mg/kg. Diuretic effect of herbal infusion *Astragalus varius* in a 4-hour experiment exceeded the diuretic effect of herb infusion *Astragalus dasyanthus* and furosemide at a dose of 1 mg/kg, and in a 24-hour experiment comparable to the diuretic effect of herb infusion *Astragalus dasyanthus*, but lower than that of hydrochlorothiazide at a dose of 20 mg/kg and herb infusion *Astragalus henningii*. Diuretic effect of herbal infusion *Astragalus testiculatus* at a dose of 100 mg/kg was not detected both in the 4-hour and in the 24-hour period. The diuretic activity of the group that received the infusion of the herb of *Astragalus testiculatus* was at the level of the control group, compared with other experimental groups, a statistically significant decrease in diuresis was observed in animals.

Conclusion. The experiment confirmed the diuretic effect of the infusion of the herb of *Astragalus dasyanthus* and for the first time discovered the diuretic effect of the infusion of the herb of *Astragalus varius* and the infusion of the herb of *Astragalus henningii*. Among the studied infusions, the most pronounced diuretic effect was observed in *Astragalus henningii* herb infusion. The diuretic effect of *Astragalus varius* infusion is higher than that of *Astragalus dasyanthus* infusion. in a 4-hour experiment and did not differ in effectiveness from the infusion of the herb of *Astragalus dasyanthus* in a 24 hour experiment. The diuretic effect of the infusion of the herb astragalus oviparous was not revealed.

Keywords: *Astragalus dasyanthus* Pall., *Astragalus varius* S.G. Gmel., *Astragalus testiculatus* Pall., *Astragalus henningii* (Stev.) Klok., diuretic 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. Uliana A. Matvienko, Natalya A. Durnova planned the design of the experiment. Uliana A. Matvienko, Alena Yu. Karetnikova carried out experimental studies and statistical processing of the results. Uliana A. Matvienko, Natalya A. Durnova, Alena Yu. Karetnikova participated in writing the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

For citation: Matvienko U. A., Karetnikova A. Yu., Durnova N. A. Comparative evaluation of the diuretic activity of infusions of four species of the genus Astragalus (*Astragalus* L.) in the experiment. *Drug development & registration*. 2024;13(1):200–207. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1461

ВВЕДЕНИЕ

Astragalus L. – самый крупный род семейства *Fabaceae* и один из крупнейших родов сосудистых растений на Земле, включающий около 3000 видов [1], в средней полосе европейской части России насчитывается около 34 видов астрагалов, представленных различными жизненными формами [2].

Тритерпеноидный сапогенин и сапонины, выделенные из рода *Astragalus*, относятся в основном к

циклоартановому типу. Около 130 сапонинов описано у *Astragalus* spp. [1].

Распространенной и разнообразной группой биологически активных соединений являются флавоновые и флавоноловые гликозиды (последние наиболее распространены в *Astragalus* spp.). Кемпферол и кверцетин чаще встречаются среди флавонолов, тогда как астрагалин и рутин являются наиболее характерными гликозидами для представителей рода. Изофлавоны, изофлаваны и птерокарпаны также выделяют из *Astragalus* spp. [1].

Официнальным видом сырья, вошедшим в 7-е издание Европейской фармакопеи, является *Radix Astragali* – высушенный корень *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge и *Astragalus mongholicus* Bunge [3], основными их химическими составляющими являются тритерпеновые сапонины (астрагалозиды I–IV) [4]. Экстракты, полученные из корня астрагала, обладают противовоспалительным, иммуностимулирующим, антиоксидантным, диуретическим, противораковым, противодиабетическим, кардиозащитным, гепатопротекторным и противовирусным действием. На основе химических соединений этого вида выпущена серия препаратов (ТА-65, циклоастрагенол, астрагалозид VI и др.) [5–9]. Кроме этого, имеются данные об антивозрастном эффекте экстрактов и изолированных компонентов астрагала перепончатого [10]. В традиционной медицине активно применяется трава астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.). Настой травы *Astragali dasyanthi* обладает успокаивающим, гипотензивным и мочегонным действиями. Однако сырье не является официнальным и не входит в перечень растительного сырья Государственной фармакопеи РФ XIV издания.

На наш взгляд, перспективными видами рода *Astragalus* L. могут являться не только астрагал перепончатый и астрагал шерстистоцветковый, но и другие виды, например астрагал изменчивый (A*stragalus varius* S.G.Gmel.), астрагал яйцеплодный (*Astragalus testiculatus* Pall.), астрагал Хеннинга (*Astragalus henningii* (Stev.) Klok.), которые широко распространены на территории Саратовской области.

Фитохимические и токсикологические исследования экстрактов из травы этих видов показали наличие биологически активных соединений: флавоноидов, аминокислот, дубильных веществ, а также подтвердили безопасность как водных, так и водно-спиртовых экстрактов из травы в экспериментах *in vivo* [11–14].

Ввиду имеющихся данных о наличии у астрагала шерстистоцветкового и астрагала перепончатого диуретического эффекта интерес представляет исследование диуретической активности у других видов *Astragalus* L.

Целью данного исследования являлось сравнительное изучение диуретической активности настоев из травы четырех видов астрагала: а. шерстистоцветкового, а. изменчивого, а. яйцеплодного и а. Хеннинга в 4- и 24-часовых экспериментах на крысах-самцах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служила высушенная трава астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.), астрагала изменчивого (Astragalus *varius* S.G. Gmel.), астрагала яйцеплодного (*Astragalus testiculatus* Pall.), астрагала Хеннинга (*Astragalus henningii* (Stev.) Klok.), заготовленная на территории Саратовской области в период массового цветения в 2022 году.

Изучение диуретической активности водных извлечений из травы четырех видов астрагала было выполнено на 42 белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 200–220 г (в каждой группе по 6 животных). Экспериментальные животные были разделены на 7 опытных групп: 1-я – контроль (К), 2-я – фуросемид 1 мг/кг (Ф), 3-я – гидрохлортиазид 20 мг/кг (Г), 4-я – настой а. шерстистоцветкового (АШ), 5-я – настой а. Хеннинга (АХ), 6-я – настой а. яйцеплодного (АЯ), 7-я – настой а. изменчивого (АИ). Исследования были выполнены в соответствии с Женевской конвенцией (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, Geneva, 1990), Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным (2000 г.), а также рекомендациями комитета по этике Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского (протокол № 4 от. 01.12.2020). Водные извлечения (настои) из травы анализируемых видов астрагалов готовили в соотношении сырье : экстрагент (1 : 10). Все полученные настои соответствовали требованиям, предъявляемым к данным лекарственным формам согласно ОФС ГФ РФ XIV издания.

В день эксперимента животным однократно внутрижелудочно при помощи зонда вводили водную нагрузку в объеме 3 % от массы тела и исследуемый настой в дозе 100 мг/кг в пересчете на сухой остаток. Группа контроля получала водную нагрузку в объеме 3 % от массы тела. После чего опытных животных помещали в метаболические клетки для сбора мочи. Собирались 4-часовые и 24-часовые порции мочи (таблица 1). Препаратом сравнения в 4-часовом эксперименте был выбран фуросемид (ООО «ОЗОН ФАРМ», Россия) в пороговой дозе 1 мг/кг [15], а в 24-часовом опыте – гидрохлортиазид (ООО «ОЗОН ФАРМ», Россия) в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг [15].

Лабораторных животных из эксперимента выводили путем передозировки препаратов для наркоза. Для этих целей использовали внутрибрюшинное введение комбинации золетила (100 мг/мл) (Virbac, Франция) в дозе 10 мг/кг (0,1 мл/кг) веса животно-

го и ксиланита (20 мг/мл ксилазина гидрохлорида) (ООО «НИТА-ФАРМ», Россия) в дозе 20 мг/кг (1,0 мл/кг) веса крысы.

Таблица 1. Диурез лабораторных крыс-самцов в 4- и 24-часовом эксперименте

Table 1. Diuresis of laboratory male rats in the 4th and 24th experiment

Экспериментальные группы Experimental groups	Диурез, мл Diuresis, ml	
	4 часа Me (Q1, Q3) 4 hours Me (Q1, Q3)	24 часа Me (Q1, Q3) 24 hours Me (Q1, Q3)
Контроль (К) Control (K)	3,75 (2; 4,375)	8,5 (5,45; 8,875)
Фуросемид (Ф), 1 мг/кг Furosemide (F), 1 mg/kg	5,65 (4,75; 7,5)	–
Гидрохлортиазид (Г), 20 мг/кг Hydrochlorothiazide (G), 20 mg/kg	–	24,5 (20,05; 26,75)
Настой астрагала шерстистоцветкового (АШ), 100 мг/кг Infusion of *Astragalus dasyanthus* Pall., 100 mg/kg	6 (4,5; 7,375)	18,75 (14,75; 21,625)
Настой астрагала Хеннинга (АХ), 100 мг/кг Infusion of *Astragalus henningii* (Stev.) Klok., 100 mg/kg	12,6 (10,375; 12,925)	24,5 (23,025; 25,75)
Настой астрагала яйцеплодного (АЯ), 100 мг/кг Infusion of *Astragalus testiculatus* Pall., 100 mg/kg	2,75 (2,375; 3,375)	10,5 (9,125; 11,75)
Настой астрагала изменчивого (АИ), 100 мг/кг Infusion of *Astragalus varius* S.G.Gmel., 100 mg/kg	11 (9,875; 12,125)	19 (18,25; 20,625)

Полученные в результате эксперимента данные были обработаны в программе STATISTICA 6 (StatSoft Inc., США). Проверку выборок на нормальность распределения осуществляли при помощи критерия Шапиро – Уилка (распределение не соответствовало нормальному), гомогенность дисперсий определяли при помощи критерия Фишера. Для оценки значимости различий использовали метод непараметрической статистики для множественных сравнений – критерий Краскела – Уоллиса (применяли стандартный уровень значимости $p < 0,05$). Для попарного сравнения после первичного анализа использовали апостериорный критерий Ньюмена – Кейлса. Описательную статистику количественных признаков представляли в виде медианы (Me) и квартилей (25, 75 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ввиду уже имеющихся данных о наличии диуретической активности настоя травы а. шерстистоцветкового [16] группа животных, получавшая настой травы а. шерстистоцветкового, при статистической обработке результатов выступала как группа сравнения по отношению к другим экспериментальным группам животных, получавшим настои травы других видов астрагалов.

При сравнении 4 групп (К, Ф, АШ, АХ) по результатам 4-часового эксперимента с помощью критерия Краскела – Уоллиса было установлено статистически значимое различие между группами (16,77505, $p = 0,0008$). Для определения отличий между ними было проведено попарное сравнение всех групп (таблица 2). При сравнении группы животных, получавших фуросемид в дозе 1 мг/кг, с контрольной группой отмечалось статистически значимое увеличение диуреза на 50,67 %. При сравнении группы животных, получавших настой травы а. шерстистоцветкового, с контрольной группой отмечалось статистически значимое увеличение диуреза у животных на 60,00 %. У группы, получавшей настой травы а. Хеннинга, отмечалось статистически значимое увеличение диуреза по сравнению с группой контроля, опытной группой, получавшей фуросемид в дозе 1 мг/кг, и группой, получавшей настой травы а. шерстистоцветкового, на 236,00, 123,01 и 109,99 % соответственно.

При сравнении следующих 4 групп – К, Ф, АШ, АЯ с помощью критерия Краскела – Уоллиса также было установлено статистически значимое различие (14,62613, $p = 0,0022$). При попарном сравнении (таблица 2) у группы, получавшей настой травы а. яйцеплодного, наблюдалось статистически значимое снижение диуреза по сравнению с группой, получавшей фуросемид, на 51,33 %, а по сравнению с группой, получавшей настой травы а. шерстистоцветкового, – на 54,17 %.

При сравнении К, Ф, АШ, АИ с помощью критерии Краскела – Уоллиса также было отмечено статистически значимое различие между группами (17,39821, $p = 0,0006$). При попарном сравнении (таблица 2) у группы, получавшей настой травы а. изменчивого, наблюдалось статистически значимое увеличение диуреза по сравнению с контрольной группой, группой, получавшей фуросемид и настой травы а. шерстистоцветкового, на 193,33, 94,69, 83,33 % соответственно.

При сравнении 4 групп (АШ, АХ, АЯ, АИ) с помощью критерия Краскела – Уоллиса также установлено статистически значимое различие между группами (19,75731, $p = 0,0002$). При попарном сравнении (таблица 3) диурез у группы, получавшей настой травы а. шерстистоцветкового, оказался ниже, чем диурез у групп, получавших настой травы а. Хеннинга и а. яйцеплодного, на 52,38 и 45,45 % соответственно, но выше, чем у группы, получавшей настой а. изменчивого, на 118,18 %.

Таблица 2. Значения статистической значимости различий экспериментальных групп при определении диуретической активности (4 часа)

Table 2. Values of statistical significance of differences between experimental groups in determining diuretic activity (4 hours)

Post-hoc (Newman – Keuls)				
	Контроль (К) Control (K)	**Фуросемид (Ф)** Furosemide (F)	**АШ** AD	**АХ** AH
Контроль (К) Control (K)	–	0,015155*	0,031861*	0,000187*
Фуросемид (Ф) Furosemide (F)	0,015155*	–	0,930692	0,000209*
АШ AD	0,031861*	0,930692	–	0,000179*
АХ AH	0,000187*	0,000209*	0,000179*	–
АЯ AT	0,528523	0,008556*	0,012694*	–
АИ AV	0,000189*	0,000424*	0,000270*	–

Примечание. * Статистически значимые различия.

Note. * Statistically significant differences.

Диурез у группы, получавшей настой травы а. Хеннинга, статистически значимо выше, чем у групп, получавших настой травы а. шерстистоцветкового, а. яйцеплодного, на 109,99 и 14,55 % соответственно. Статистически значимых различий по сравнению с группой, получавшей настой травы а. изменчивого, обнаружено не было.

Таблица 3. Значения статистической значимости различий настоев астрагалов (шерстистоцветкового, Хеннинга, яйцеплодного, изменчивого) при определении диуретической активности (4 часа)

Table 3. Values of statistical significance of differences in astragalus infusions in determining diuretic activity (4 hours)

Post-hoc (Newman – Keuls)				
	АШ AD	**АХ** AH	**АЯ** AT	**АИ** AV
АШ AD	–	0,000181*	0,001011*	0,000175*
АХ AH	0,000181*	–	0,000186*	0,334687
АЯ AT	0,001011*	0,000186*	–	0,000178*
АИ AV	0,000175*	0,334687	0,000178*	–

Примечание. * Статистически значимые различия.

Note. * Statistically significant differences.

Диурез у группы, получавшей настой травы а. яйцеплодного, статистически значимо ниже, чем у групп, получавших настой травы а. шерстистоцветкового, а. Хеннинга и а. изменчивого, на 54,17, 78,17 и 75 % соответственно.

Диурез группы, получавшей настой травы а. изменчивого, статистически значимо выше, чем у групп, получавших настой травы а. шерстистоцветкового и а. яйцеплодного, на 83,33 и 300 % соответственно.

Далее был проведен следующий эксперимент: для исследования собирали 24-часовые порции мочи лабораторных животных. Препаратом сравнения выступал диуретик длительного действия гидрохлортиазид в дозе 20 мг/кг.

При сравнении 4 групп (К, Г, АШ, АХ) по результатам 24-часового эксперимента с помощью критерия Краскела – Уоллиса было установлено статистически значимое различие между группами (17,37099, $p = 0{,}0006$). Для определения отличий между ними было проведено попарное сравнение групп (таблица 4). При сравнении группы животных, получавших гидрохлортиазид в дозе 20 мг/кг, с контрольной группой отмечалось статистически значимое увеличение диуреза на 188,24 %. При сравнении экспериментальной группы, получавшей настой травы а. шерстистоцветкового, с контрольной группой отмечалось статистически значимое увеличение диуреза у животных на 120,59 %, а по сравнению с группой, получавшей гидрохлортиазид, статистически значимое уменьшение диуреза на 23,47 %. При сравнении экспериментальной группы, получавшей настой травы а. Хеннинга, с контрольной группой, с группой, получавшей настой травы а. шерстистоцветкового, наблюдалось статистически значимое увеличение диуреза у животных на 188,24 % и на 30,67 % соответственно.

При сравнении 4 групп (К, Г, АШ, АЯ) с помощью критерия Краскела – Уоллиса также установлено статистически значимое различие между группами

Таблица 4. Значения статистической значимости различий экспериментальных групп при определении диуретической активности (24 часа)

Table 4. Values of statistical significance of differences between experimental groups in determining diuretic activity (24 hours)

Post-hoc (Newman – Keuls)				
	Контроль Control	**Гидрохлортиазид** Hydrochlorothiazide	**АШ** AD	**АХ** AH
Контроль Control	–	0,000178*	0,000213*	0,000187*
Гидрохлортиазид Hydrochlorothiazide	0,000178*	–	0,007204*	0,806003
АШ AD	0,000213*	0,007204*	–	0,011205*
АХ AH	0,000187*	0,806003	0,011205*	–
АЯ AT	0,165761	0,000199*	0,002866*	–
АИ AV	0,000208*	0,046964*	0,398279	–

Примечание. * Статистически значимые различия..

Note. * Statistically significant differences.

(18,36123, $p = 0,0004$). При попарном сравнении (таблица 4) у группы, получавшей настой травы а. яйцеплодного, наблюдалось статистически значимое снижение диуреза по сравнению с группой, получавшей гидрохлортиазид, на 57,14 %, а по сравнению с группой, получавшей настой травы а. шерстистоцветкового, – на 44,00 %.

При сравнении 4 групп (К, Г, АШ, АИ) с помощью критерия Краскела – Уоллиса также установлено статистически значимое различие между группами (15,67270, $p = 0,0013$). При попарном сравнении (таблица 4) у группы, получавшей настой травы а. изменчивого, наблюдалось статистически значимое увеличение диуреза по сравнению с контрольной группой на 123,53 % и снижение диуреза по сравнению с группой, получавшей гидрохлортиазид, на 22,45 %.

При сравнении 4 групп (АШ, АХ, АЯ, АИ) с помощью критерия Краскела – Уоллиса также установлено статистически значимое различие между группами (17,45351, $p = 0,0006$). При попарном сравнении (таблица 5) диурез у группы, получавшей настой травы а. шерстистоцветкового, оказался статистически значимо ниже, чем диурез у групп, получавших настой травы а. Хеннинга, на 23,47 % и выше, чем у группы, получавшей настой травы а. яйцеплодного, на 78,57 %.

Диурез у группы, получавшей настой травы а. Хеннинга, статистически значимо выше, чем у групп, получавших настой травы а. шерстистоцветкового, а. яйцеплодного и а. изменчивого, на 30,67, 133,33 и 28,95 % соответственно.

Диурез у группы, получавшей настой травы а. яйцеплодного, статистически значимо ниже, чем у групп, получавших настой травы а. шерстистоцветкового, а. Хеннинга и а. изменчивого, на 44,00, 57,14 и 44,74 % соответственно.

Диурез у группы, получавшей настой травы а. изменчивого, статистически значимо выше, чем у группы, получавших настой травы а. Хеннинга, на 22,45 % и ниже, чем у группы, получавшей настой травы а. яйцеплодного, на 80,95 %.

Таблица 5. Значения статистической значимости различий настоев астрагалов (шерстистоцветкового, Хеннинга, яйцеплодного, изменчивого) при определении диуретической активности (24 часа)

Table 5. Values of statistical significance of differences in astragalus infusions in determining diuretic activity (24 hours)

Post-hoc (Newman – Keuls)				
	АШ AD	**АХ** AH	**АЯ** AT	**АИ** AV
АШ AD	–	0,012756*	0,001702*	0,395074
АХ AH	0,012756*	–	0,000197*	0,028464*
АЯ AT	0,001702*	0,000197*	–	0,000867*
АИ AV	0,395074	0,028464*	0,000867*	–

Примечание. * Статистически значимые различия.

Note. * Statistically significant differences.

В результате эксперимента подтвержден диуретический эффект настоя травы а. шерстистоцветкового как в 4-часовом эксперименте, так и в 24-часо-

вом эксперименте. Диуретический эффект настоя в дозе 100 мг/кг сопоставим с диуретическим эффектом фуросемида в дозе 1 мг/кг и несколько ниже, чем диуретический эффект гидрохлортиазида в дозе 20 мг/кг.

Как в 4-, так и 24-часовом экспериментах наиболее выраженный диуретический эффект выявлен у настоя из травы а. Хеннинга в дозе 100 мг/кг по сравнению с настоями травы а. шерстистоцветкового, а. изменчивого. Диуретический эффект а. Хеннинга превышал диуретическую активность фуросемида в дозе 1 мг/кг, при этом наблюдался сопоставимый эффект с гидрохлортиазидом в дозе 20 мг/кг.

Диуретический эффект настоя травы а. изменчивого в 4-часовом эксперименте превышал диуретический эффект настоя травы а. шерстистоцветкового и фуросемида в дозе 1 мг/кг, а в 24-часовом эксперименте был сопоставим с диуретическим эффектом настоя травы а. шерстистоцветкового, но ниже, чем у гидрохлортиазида в дозе 20 мг/кг и настоя травы а. Хеннинга.

Диуретический эффект настоя травы а. яйцеплодного в дозе 100 мг/кг не выявлен как в 4-часовом, так и в 24-часовом эксперименте. У группы животных, получавших настой а. яйцеплодного, диурез находился на уровне контрольной группы, по сравнению с опытными группами наблюдалось его статистически значимое снижение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эксперименте подтвержден диуретический эффект настоя астрагала шерстистоцветкового и впервые обнаружен диуретический эффект у настоя травы астрагала изменчивого и настоя травы астрагала Хеннинга. Самый выраженный диуретический эффект, превышающий значения фуросемида в дозе 1 мг/кг, настоя травы астрагала шерстистоцветкового, настоя травы астрагала изменчивого и сопоставимый с эффектом гидрохлортиазида в дозе 20 мг/кг, наблюдается у настоя травы астрагала Хеннинга. Диуретическая активность настоя травы астрагала изменчивого превышает показатели фуросемида в дозе 1 мг/кг и настоя травы астрагала шерстистоцветкового в 4-часовом эксперименте, сопоставима с показателями настоя травы астрагала шерстистоцветкового в 24-часовом эксперименте, но несколько ниже, чем у гидрохлортиазида в дозе 20 мг/кг и настоя астрагала Хеннинга, как в 4-, так и в 24-часовом экспериментах. Диуретический эффект настоя травы астрагала яйцеплодного не выявлен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rundel P. W., Huggins T. R., Prigge B. A., Sharifi M. R. Raritytin Astragalus: a California perspective. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany.* 2015;33(2):111–120. DOI: 10.5642/aliso.20153302.04.
2. Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е изд. М.: КМК; 2006. 600 с.
3. Tomoda M., Shimizu N., Ohara N., Gonda R., Ishii S., Otsuki H. A Reticuloendothelial System-Activating Glycan from the Roots of *Astragalus membranaceus*. *Phytochemistry.* 1992;(31):63–66.
4. Lysiuk R., Darmohray R. Pharmacology and ethnomedicine of the genus *Astragalus*. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine.* 2016;3:46–53. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ijppe.3.46.
5. Товчига О. В., Штыголь С. Ю. Влияние лекарственных растений на выделительную функцию почек. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2009;72(3):50–59.
6. Матвиенко У. А., Ходакова Н. Г., Дурнова Н. А. Скрининг антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений из травы четырех видов *Astragalus* L. *Традиционная медицина.* 2022;(1):51–55. DOI: 10.54296/18186173_2022_1_51
7. Березуцкий М. А., Дурнова Н. А., Матвиенко У. А. Нейробиологические эффекты химических соединений видов рода *Astragalus* L. и перспективы их применения в медицине (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(1):199–206. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-206.
8. Salehi B., Carneiro J. N. P., Rocha J. E., Coutinho H. D. M., Morais Braga M. F. B., Sharifi-Rad J., Semwal P., Painuli S., Moujir L. M., de Zarate Machado V., Janakiram, S., Anil Kumar N. V., Martorell M., Cruz-Martins N., El Beyrouthy M., Sadaka C. Astragalus species: Insights on its chemical composition toward pharmacological applications. *Phytotherapy Research.* 2021;35(5):2445–2476. DOI: 10.1002/ptr.6974.
9. Березуцкий М. А., Якубова Л. Р., Дурнова Н. А., Романтеева Ю. В., Белоногова Ю. В., Комарова Е. Э., Шереметьева А. С. Фармакологические свойства препаратов, созданных на основе экстракта астрагала (обзор). *Химико-фармацевтический журнал.* 2020;54(4):20–25. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-2069.
10. Березуцкий М. А., Дурнова Н. А., Власова Я. А. Экспериментальные и клинические исследования механизмов антивозрастных эффектов химических соединений *Astragalus membranaceus* (обзор литературы). *Успехи геронтологии.* 2019;32(5):702–710.
11. Матвиенко У. А., Дурнова Н. А., Караваева Л. В., Романтеева Ю. В. Аминокислотный состав травы некоторых видов рода *Astragalus* L. *Фармация.* 2021;70(4):20–25. DOI: 10.29296/25419218-2021-04-03.
12. Матвиенко У. А., Фомина Ю. А., Шестопалова Н. Б., Березуцкий М. А., Дурнова Н. А. Спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов некоторых видов рода астрагал. *Фармация.* 2021;70(3):11–16. DOI: 10.29296/25419218-2021-03-02.
13. Матвиенко У. А., Исаев Д. С., Чернышева Ю. Г., Дурнова Н. А. Токсикологическая характеристика экстрактов травы астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) и астрагала изменчивого (*Astragalus varius* S.G.Gmel.). *Альманах молодой науки.* 2021;2(41):7–9.
14. Матвиенко У. А., Дурнова Н. А., Полуянов А. М., Бобкова Н. В., Туренко В. Н., Смирнов В. В., Раменская Г. В. Выделение и идентификация агликонов флавоноидов некоторых видов рода *Astragalus* L. флоры Поволжья. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(1):106–113. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-106-113.
15. Куркин В. А., Волкова Н. А., Правдивцева О. Е., Зайцева Е. Н., Цибина А. С., Климова А. И. Влияние густых экстрактов боярышника на выделительную функцию почек. *Наука и инновации в медицине.* 2022;7(3):202–205.
16. Азатян С. Г., Мажитова М. В. Перспективы применения экстракта растений рода *Astragalus* при сердечно-сосудистых патологиях. *Прикаспийский вестник медицины и фармации.* 2022;3(1):6–14. DOI: 10.48612/agmu/2022.3.1.6.14.

REFERENS

1. Rundel P. W., Huggins T. R., Prigge B. A., Sharifi M. R. Raritytin Astragalus: a California perspective. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany.* 2015;33(2):111–120. DOI: 10.5642/aliso.20153302.04.

2. Mayevsky P. F. Flora of the middle zone of the European part of Russia. 10th ed. Moscow: KMK; 2006. 600 p. (In Russ.)
3. Tomoda M., Shimizu N., Ohara N., Gonda R., Ishii S., Otsuki H. A Reticuloendothelial System-Activating Glycan from the Roots of *Astragalus membranaceus*. *Phytochemistry.* 1992;(31):63–66.
4. Lysiuk R., Darmohray R. Pharmacology and ethnomedicine of the genus *Astragalus*. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine.* 2016;3:46–53. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ijppe.3.46.
5. Tovchiga O. V., Shtrygol S. Yu. The effect of medicinal plants on the excretory function of the kidneys. *Experimental and clinical pharmacology.* 2009;72(3):50–59. (In Russ.)
6. Matvienko U. A., Khodakova N. G., Durnova N. A. Screening of antimicrobial activity of water and water-alcohol extracts from the herb of four species of *Astragalus* L. *Traditional medicine.* 2022;(1):51–55. (In Russ.) DOI: 10.54296/18186173_2022_1_51.
7. Berezutsky M. A., Durnova N. A., Matvienko U. A. Neurobiological effects of chemical compounds of species of the genus *Astragalus* L. and prospects for their use in medicine (review). *Development and registration of medicines.* 2023;12(1):199–206. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-206.
8. Salehi B., Carneiro J. N. P., Rocha J. E., Coutinho H. D. M., Morais Braga M. F. B., Sharifi-Rad J., Semwal P., Painuli S., Moujir L. M., de Zarate Machado V., Janakiram, S., Anil Kumar N. V., Martorell M., Cruz-Martins N., El Beyrouthy M., Sadaka C. Astragalus species: Insights on its chemical composition toward pharmacological applications. *Phytotherapy Research.* 2021;35(5):2445–2476. DOI: 10.1002/ptr.6974.
9. Berezutsky M. A., Yakubova L. R., Durnova N. A., Romanteeva Yu. V., Belonogova Yu. V., Komarova E. E., Sheremetyeva A. S. Pharmacological properties of preparations based on astragalus extract (review). *Chemical Pharmaceutical Journal.* 2020;54(4):20–25. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-199-206.
10. Berezutsky M. A., Durnova N. A., Vlasova Ya. A. Experimental and clinical studies of the mechanisms of anti-aging effects of *Astragalus membranaceus* chemical compounds (literature review). *Advances in Gerontology.* 2019;32(5):702–710. (In Russ.)
11. Matvienko U. A., Durnova N. A., Karavaeva L. V., Romanteeva Yu. V. Amino acid composition of herbs of some species of the genus *Astragalus* L. *Pharmacy.* 2021;70(4):20–25. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-04-03
12. Matvienko U. A., Fomina Yu. A., Shestopalova N. B., Berezutsky M. A., Durnova N. A. Spectrophotometric determination of the sum of flavonoids of some species of the genus *Astragalus*. *Pharmacy.* 2021;70(3):11–16. (In Russ.) DOI: 10.29296/25419218-2021-03-02.
13. Matvienko U. A., Isaev D. S., Chernysheva Yu. G., Durnova N. A. Toxicological characteristics of extracts of the herb *Astragalus dasyanthus* Pall. and Varius Astragalus (*Astragalus varius* S.G.Gmel.). *Almanac of young science.* 2021;2(41):7–9. (In Russ.)
14. Matvienko U. A., Durnova N. A., Poluyanov A. M., Bobkova N. V., Turenko V. N., Smirnov V. V., Ramenskaya G. V. Isolation and identification of aglycones of flavonoids of some species of the genus *Astragalus* L. of the Volga region flora. *Drug development & registration.* 2023;12(1):106–113. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-106-113.
15. Kurkin V. A., Volkova N. A., Pravdivtseva O. E., Zaitceva E. N., Tsibina A. S., Klimova A. I. The effect of thick hawthorn extracts on kidney. *Science and innovations in medicine.* 2022;7(3):202–205. (In Russ.)
16. Azatyan S. G., Mazhitova M. V. Prospects for the use of an extract of plants of the genus *Astragalus* in cardiovascular pathologies. *Caspian Bulletin of Medicine and Pharmacy.* 2022;3(1):6–14. (In Russ.) DOI: 10.48612/agmu/2022.3.1.6.14.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1632
УДК 615.038

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики на основе функционального клеточного теста для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека

М. А. Никифорова[1]✉, И. А. Валуев[1], А. В. Петров[2, 1], Е. Е. Бекетов[1], И. Е. Шохин[3]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Мабскейл». 445043, Россия, Самарская область, г.о. Тольятти, территория ОЭЗ ППТ, шоссе № 4, здание 5А
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тольяттинский государственный университет». 445020, Россия, Самарская область, г. Тольятти, ул. Белорусская, д. 14
[3] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

✉ **Контактное лицо:** Никифорова Мария А. **E-mail:** m.nikiforova@mabscale.ru

ORCID: М. А. Никифорова – https://orcid.org/0000-0001-5823-6508; И. А. Валуев – https://orcid.org/0009-0004-2577-5766;
А. В. Петров – https://orcid.org/0009-0009-6214-8119; Е. Е. Бекетов – https://orcid.org/0000-0002-2485-6482;
И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 01.11.2023 **Статья принята в печать:** 20.02.2024 **Статья опубликована:** 20.02.2024

Резюме

Введение. Адалимумаб – рекомбинантное, полностью гуманизированное моноклональное антитело, которое связывается с высокой степенью сродства и специфичностью с растворимой и мембранной формами фактора некроза опухоли (TNFα) и используется для лечения ряда аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и другие наиболее распространенные воспалительные артропатии (анкилозирующий спондилит, псориатический артрит). Несмотря на доказанную эффективность лечения адалимумабом, у части пациентов с течением времени происходит снижение клинической эффективности и возникает риск нежелательных явлений. Одним из объяснений данного эффекта является образование антилекарственных антител (ADA) к препарату, в том числе и нейтрализующих антител (NAb). В настоящее время при разработке новых препаратов и препаратов-биоаналогов неотъемлемой частью клинических испытаний стала оценка и характеристика нейтрализующих антител.

Цель. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека.

Материалы и методы. Определение нейтрализующих антител к адалимумабу основано на использовании клеточной линии L-929, чувствительной к индукции апоптоза посредством TNFα; нейтрализующие антитела связываются с адалимумабом, блокируя его взаимодействие с TNFα, что приводит к TNFα-опосредованной цитотоксичности. Измерение цитотоксичности проводили с помощью резазурина, ароматического соединения, представляющего собой окислительно-восстановительный индикатор.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по показателям: пределу исключения, селективности, чувствительности, прецизионности, специфичности и стабильности (краткосрочной и долгосрочной). Важной частью разработки методики определения нейтрализующих антител является подбор концентраций TNFα (4 нг/мл) и адалимумаба (250 нг/мл), а также определение минимального необходимого разведения образца: данный параметр составил 1:20. По итогам валидации был выбран «плавающий» предел исключения с поправочным коэффициентом (фактор нормализации) равным 0,86. Чувствительность разработанной методики составила 108,9 нг/мл нейтрализующих антител к адалимумабу.

Заключение. Полученные при валидации методики результаты позволяют применять методику определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека в исследовании иммуногенности препаратов адалимумаба, в том числе при проведении клинических исследований биоэквивалентности.

Ключевые слова: адалимумаб, нейтрализующие антитела, антилекарственные антитела, иммуногенность, TNFα, клеточная линия L-929

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

Вклад авторов. М. А. Никифорова и И. А. Валуев участвовали в разработке и валидации методики. М. А. Никифорова, И. А. Валуев и Е. Е. Бекетов отвечали за написание текста статьи. А. В. Петров отвечал за общий дизайн исследования. И. Е. Шохин отвечал за рецензирование текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Никифорова М. А., Валуев И. А., Петров А. В., Бекетов Е. Е., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики на основе функционального клеточного теста для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):208–215. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1632

Development and Validation of the Cell-based Functional Method for Neutralizing Anti-adalimumab Antibodies Detection in Human Serum

Maria A. Nikiforova[1]✉, Igor A. Valouev[1], Alexander V. Petrov[2, 1], Evgeny E. Beketov[1], Igor E. Shokhin[3]

[1] LLC "Mabscale". Samara region, city. 5A, highway No. 4, territory of SEZ PPT, Togliatti, 445043, Russia
[2] Togliatti State University. 14, Belorusskaya str., Tolyatti, Samara region, 445020, Russia
[3] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia

✉ **Corresponding author:** Maria A. Nikiforova. **E-mail:** m.nikiforova@mabscale.ru

© Никифорова М. А., Валуев И. А., Петров А. В., Бекетов Е. Е., Шохин И. Е., 2024
© Nikiforova M. A., Valouev I. A., Petrov A. V., Beketov E. E., Shokhin I. E., 2024

ORCID: Maria A. Nikiforova – https://orcid.org/0000-0001-5823-6508; Igor A. Valouev – https://orcid.org/0009-0004-2577-5766;
Alexander V. Petrov – https://orcid.org/0009-0009-6214-8119; Evgeny E. Beketov – https://orcid.org/0000-0002-2485-6482;
Igor E. Shokhin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 01.11.2023 **Revised:** 20.02.2024 **Published:** 20.02.2024

Abstract

Introduction. Adalimumab, a fully humanized monoclonal antibody, is a tumor necrosis factor (TNFα) inactivator that is used against a number of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and other most common inflammatory arthropathies (ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis). Despite the proven efficacy of adalimumab treatment, there is a risk of adverse events, tied up with the formation of anti-drug antibodies, including neutralizing antibodies. Currently, the evaluation and characterization of neutralizing antibodies has become an important part of clinical trials in the development of new drugs and biosimilars.

Aim. The aim of this study is to develop and validate the cell-based functional method for neutralizing anti-adalimumab antibodies determination in human serum.

Materials and methods. For determination of neutralizing anti-adalimumab antibodies, the cell line L-929 has been employed. L-929 is a cell line sensitive to the TNFα-mediated apoptosis; the neutralizing antibodies interact with adalimumab that leads to TNFα-mediated cytotoxicity. Cytotoxicity was measured using resazurin, an aromatic compound that is a redox indicator.

Results and discussion. The developed method was validated for cut point, selectivity, sensitivity, precision, specificity and stability (short- and long-term). An important part of a method development for determining neutralizing antibodies is the selection of concentrations of TNFα (4 ng/ml) and adalimumab (250 ng/ml), as well as determining the minimum required dilution – this parameter is established as 1:20. Cut point was chosen as a «floating» cut point, and a correction factor (normalization factor) was determined equal to 0,86. The sensitivity of the developed method was estimated at 108,9 ng/ml of neutralizing anti-adalimumab antibodies.

Conclusion. The obtained results can be applied for determining anti-adalimumab neutralizing antibodies in the assessment of the adalimumab immunogenicity, including clinical trials.

Keywords: adalimumab, neutralizing antibodies, anti-drug antibodies, immunogenicity, TNFα, L-929 cell line

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

Contribution of the authors. Maria A. Nikiforova and Igor A. Valouev participated in the analytical method development and validation. Maria A. Nikiforova, Igor A. Valouev and Evgeny E. Beketov wrote the paper and are responsible for paper draft preparation. Alexander V. Petrov is responsible for the overall study design. Igor E. Shokhin was responsible for article text review. All authors participated in the discussion of the results and article review.

For citation: Nikiforova M. A., Valouev I. A., Petrov A. V., Beketov E. E., Shokhin I. E. Development and validation of the cell-based functional method for neutralizing anti-adalimumab antibodies detection in human serum. *Drug development & registration*. 2024;13(1):208–215. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1632

ВВЕДЕНИЕ

Адалимумаб – рекомбинантное, полностью гуманизированное моноклональное антитело (IgG1), связывается с высокой степенью сродства с TNFα и блокирует его взаимодействие с поверхностными клеточными рецепторами TNFα p55 и p75. Адалимумаб был одобрен FDA еще в 2002 году для лечения ревматоидного артрита (РА) [1]. РА является системным хроническим воспалительным аутоиммунным заболеванием, которое приводит к прогрессирующему повреждению суставов и затрагивает около 1 % европеоидной популяции [2, 3]. С течением заболевания у большинства пациентов развиваются характерные поражения мелких суставов рук и ног, возникает эрозия и деструкция суставных хрящей, костей. Адалимумаб доказал свою эффективность в лечении РА, особенно на ранних стадиях заболевания [4, 5].

В настоящее время адалимумаб также одобрен для лечения взрослых пациентов с хроническим бляшечным псориазом средней и тяжелой степени, которым показана системная терапия или фототерапия. Ряд исследований показывает высокую эффективность адалимумаба при лечении псориаза [6, 7].

Псориаз является распространенным хроническим неинфекционным заболеванием кожи, самой распространенной формой псориаза является бляшечный псориаз, и на его долю приходится более 80 % случаев [8]. До сих пор однозначно не выяснены причины возникновения бляшечного псориаза, одной из основных версий считается наследственный фактор [9]. Тем не менее данное заболевание представляет собой серьезную глобальную проблему, поскольку по всему миру не менее 100 миллионов человек страдают от него [10].

Несмотря на эффективность лечения адалимумабом, у части пациентов с течением времени происходит снижение или даже потеря клинической эффективности (клинического ответа) и возникает риск нежелательных явлений [11]. Одним из объяснений данного эффекта является образование антилекарственных антител (ADA) к терапевтическим

антителам, что и приводит к потере эффективности лечения [12]. По данным разных исследований, для адалимумаба частота появления ADA колеблется от 10 до 60 % [13].

Причина, по которой полностью гуманизированное антитело адалимумаб проявляет иммуногенность, объясняется структурой гипервариабельных регионов – определяющих комплементарность регионов (CDR – complementary determining regions). Длина петли CDR-H3 у иммуногенных АТ немного короче по сравнению с неиммуногенными АТ, и таким образом данная структура способствует связыванию антиидиотипических антител (ADA) с АТ [14].

Образующиеся ADA могут обладать нейтрализующей активностью (нейтрализующие антилекарственные антитела – NAb), они блокируют антигенсвязывающую способность терапевтической молекулы. NAb имеют большую клиническую значимость, поскольку их образование может поставить под угрозу продолжение терапии. В настоящее время при разработке новых препаратов и препаратов-биоаналогов, в том числе и адалимумаба, неотъемлемой частью клинических испытаний стала оценка и характеристика NAb. Для биотехнологических препаратов, для которых показан высокий риск развития иммуногенности, оценку NAb рекомендуют проводить с использованием методик на основе клеточных тестов [15].

Целью данной работы была разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека на основе функционального клеточного теста для оценки иммуногенности препарата-биоаналога адалимумаба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При разработке и валидации методики использовали оригинальный препарат Хумира® и его биоаналог:

- *исследуемый препарат*: адалимумаб; раствор для подкожного введения; 40 мг / 0,8 мл.
- *препарат сравнения*: Хумира®; раствор для подкожного введения; 40 мг / 0,8 мл.

Образцы исследуемого препарата и препарата сравнения хранили в холодильнике фармацевтическом, в защищенном от света месте при температуре 2–8 °C.

Для приготовления калибровочных и контрольных (положительных) образцов использовали антиидиотипические, нейтрализующие моноклональные антитела к адалимумабу подкласса IgG1 (human anti-adalimumab antibodies), с концентрацией белка 0,5 мг/мл (Bio-Rad, США).

Реактивы

При проведении валидации методики определения антител к адалимумабу в сыворотке крови человека использовали следующие реактивы: антитела к адалимумабу, обладающие нейтрализующей активностью (HCA204, Bio-Rad, США); среда RPMI-1640 (C363n, НПП «ПанЭко», Россия); фетальная телячья сыворотка (ФТС, SV3016003, HyClone, США); рекомбинантный TNFα человека (300-01A, PeproTech, США); актиномицин D (A9415, Sigma-Aldrich, США); ДМСО (D2650, Sigma-Aldrich, США) и натриевая соль резазурина (B21187, Thermo Fisher Scientific, США).

Оборудование

Для культивирования клеточной линии L-929 (ЦКП КККП, Институт цитологии РАН) и проведения анализа использовали: бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), микроскоп лабораторный инвертированный BI-200 (ООО «БиОптик», Россия) и CO_2-инкубатор MCO-170AC (PHCbi, Япония). Для определения флуоресценции в лунках планшета использовали спектрофотометр SpectraMax® M5 (Molecular Devices, США).

Методика определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека

В основе методики лежит определение специфической активности терапевтического антитела адалимумаб, которая основана на оценке ингибирования проапоптотического влияния цитокина TNFα на клетки линии L-929 под действием адалимумаба. Клетки данной линии экспрессируют на поверхности рецепторов к TNFα [16], активация которых инициирует апоптотическую гибель клеток. Для обнаружения нейтрализующих АТ против адалимумаба необходим дополнительный этап, при котором образец сыворотки человека предварительно инкубируют с добавлением адалимумаба в фиксированной концентрации. Нейтрализующие антитела, конкурируя с TNFα за адалимумаб, способствуют проявлению TNFα-опосредованной цитотоксичности.

Культивирование клеток L-929 проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % ФТС в CO_2-инкубаторе при температуре 37 °C и содержании CO_2 5 %. Для определения нейтрализующих антител в лунки 96-луночного планшета высевали клетки с плотностью 300 000 кл/мл за 18–24 часа до проведения анализа.

Образцы (контрольные/исследуемые) инкубировали в присутствии фиксированной концентрации адалимумаба (250 нг/мл) в течение 60–90 минут при 25 °C (500–600 rpm) с последующим добавлением раствора TNFα (4 нг/мл) и инкубацией в течение 60–90 минут при 25 °C (500–600 rpm) перед добавлением к подготовленным (добавляли актиномицин D) клеткам L-929 в 96-луночном планшете. Далее планшет инкубировали в течение 16–20 часов в CO_2-инкубаторе, для оценки цитотоксичности в лунки план-

шета добавляли раствор резазурина (0,15 мкг/мл). Параметры детекции флуоресценции: возбуждение при длине волны 545 нм, детекция при длине волны 600 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

На первом этапе разработки методики осуществляли подбор концентрации TNFα, которая приводит к гибели 90–95 % клеток. Далее проводили эксперимент с серийными разведениями адалимумаба в присутствии фиксированной концентрации TNFα, добавляя к TNFα-чувствительным клеткам L-929, и выбирали такую концентрацию, при которой будет наблюдаться клеточный ответ ≥50 % (ED_{50}). Важно использовать самую низкую концентрацию адалимумаба, которая не будет приводить к сильному клеточному ответу и будет обеспечивать адекватную чувствительность методики. По итогам экспериментов были выбраны следующие концентрации: для TNFα – 4 нг/мл, адалимумаба – 250 нг/мл.

Следующим этапом была оценка влияния матрицы (сыворотки) и соответственно определение минимального допустимого разведения (MRD, minimum required dilution) образца. Данный параметр должен быть подобран таким образом, чтобы сыворотка не влияла на клеточную линию и на результаты анализа. Для этого готовили положительные контроли в индивидуальных интактных образцах сыворотки человека, которые последовательно разводили в среде RPMI-1640. По результатам разработки в дальнейшей работе использовали 5%-й раствор сыворотки человека в среде RPMI-1640, следовательно, MRD составило 1 : 20.

Валидация методики

Валидацию методики определения нейтрализующих антител к адалимумабу проводили руководствуясь рекомендациями Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection (FDA)[1]; Immunogenicity Assays – Design and Validation of Immunoassays to Detect Anti-Drug Antibodies (USP)[2] и Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза[3, 4] по параметрам: пределу исключения, селективности, чувствительности, прецизионности, специфичности и стабильности.

Предел исключения (cut point)

Для определения предела исключения было исследовано 64 индивидуальных интактных образца сыворотки крови человека, которые были проанализированы двумя аналитиками, в 6 независимых аналитических циклах. В каждом аналитическом цикле анализировали 16 образцов в трех повторах. Расчет предела исключения проводили путем нормализации данных (пересчет на % жизнеспособных клеток) из относительных единиц флуоресценции (RFU – relative fluorescence units), формула приведена ниже:

$$V = \frac{S - \mathrm{TNF}}{\mathrm{NC} - \mathrm{TNF}} \cdot 100,$$

где V – жизнеспособность клеток, %; S – RFU образца; TNF – RFU контроля TNFα (минимальное значение RFU, в лунках только TNFα); NC – RFU отрицательного контроля NC (максимальное значение RFU, в лунках 5%-й раствор сыворотки человека в RPMI-1640).

Для выбора типа предела исключения (фиксированный, плавающий или динамический) провели дисперсионный анализ средних (ANOVA) и оценку однородности дисперсий (тест Брауна – Форсайта) для всех аналитических циклов, проведенных каждым аналитиком, и для всех аналитических циклов суммарно. Результаты представлены в таблице 1.

Для оценки однородности средних значений и дисперсий между аналитиками применяли t-критерий (критерий Стьюдента) и F-критерий соответственно. Результаты анализа данных представлены в таблице 2.

Статистическая обработка показала однородность дисперсий между аналитиками и отсутствие однородности средних значений. Результат проведенного анализа, показывающий неоднородность средних значений и однородность дисперсий между аналитическими циклами и аналитиками, позволяет выбрать «плавающий» тип предела исключения с поправочным коэффициентом – фактором нормализации, значение которого составило 0,86. Поправоч-

[1] Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). January 2019. Available at: https://www.fda.gov/media/119788/download. Accessed: 01.11.2023.

[2] Pharmacopeia US. United States Pharmacopeia. General Chapter, <1106> Immunogenicity assays–design and validation of immunoassays to detect anti-drug antibodies. Rockville, MD: United States Pharmacopeia 2022. Available at: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99825_02_01.html. Accessed: 01.11.2023.

[3] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd_21112016_89. Ссылка активна на 01.11.2023.

[4] 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.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd_21112016_85. Ссылка активна на 01.11.2023.

ный коэффициент определяли как 1 процентиль усредненных по всем 6 циклам нормализованных значений (% жизнеспособных клеток). При дальнейшем проведении анализа для каждого аналитического цикла предел исключения определяли по формуле:

$$CUTOFF = CPF \cdot \overline{RFU}_{NC},$$

где *CUTOFF* – плавающий предел исключения для данного аналитического цикла; $\overline{RFU}_{NC}$ – среднее значение RFU отрицательного контроля NC в аналитическом цикле; *CPF* – фактор нормализации.

Таблица 1. Оценка данных на однородность средних и дисперсий значений нормализованных данных между аналитическими циклами

Table 1. Data for means and variances homogeneity for normalized data values between analytical runs

Параметр Parameter	Аналитик 1 Analyst 1			Аналитик 2 Analyst 2		
	Цикл 1 Run 1	Цикл 2 Run 2	Цикл 3 Run 3	Цикл 1 Run 1	Цикл 2 Run 2	Цикл 3 Run 3
Дисперсионный анализ (ANOVA) **Analysis of variance (ANOVA)**						
F	6,274			8,643		
P-value	0,0023			0,0003		
Различия значимы ($P < 0,05$) Differences are significant ($P < 0,05$)	Да Yes			Да Yes		
F	24,37					
P-value	<0,0001					
Различия значимы ($P < 0,05$) Differences are significant ($P < 0,05$)	Да Yes					
Статистика критерия Брауна – Форсайта **Brown – Forsythe test statistics**						
F	0,6588			0,1017		
P-value (значимость) P-value (significance)	0,5186			0,9034		
Различия значимы ($P < 0,05$) Differences are significant ($P < 0,05$)	Нет No			Нет No		
F	0,4834					
P-value (значимость) P-value (significance)	0,7887					
Различия значимы ($P < 0,05$) Differences are significant ($P < 0,05$)	Нет No					

Образцы, у которых значения RFU ниже рассчитанного предела исключения, классифицируются как «положительные».

Чувствительность методики

Для определения чувствительности использовали калибровочные стандарты четырех уровней концентраций антител к адалимумабу: 200, 150, 125, 80 нг/мл. Анализ образцов проводили два аналитика в 12 аналитических циклах. Каждый цикл включал в себя три серии разведений, образцы положительных и отрицательного контролей. Чувствительность рассчитывали путем определения точки пересечения значения предела исключения для каждого аналитического цикла с кривой линейной регрессии зависимости RFU от логарифма концентрации антител. Среднее значение чувствительности получали усреднением по всем 12 аналитическим циклам. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 2. Оценка однородности средних и дисперсий значений нормализованных данных между аналитиками

Table 2. Data for means and variances homogeneity for normalized data values between analysts

Параметр Parameter	Оценка однородности средних Estimation of means homogeneity	Оценка однородности дисперсий Estimation of variances homogeneity
P-value (значимость) P-value (significance)	<0,0001	0,4446
Различия значимы ($P < 0,05$) Differences are significant ($P < 0,05$)	Да Yes	Нет No

Верхними граничными значениями чувствительности для методик определения нейтрализующих антител рекомендуется считать 0,5–2 мкг/мл[1]. Полученное значение чувствительности соответствует данному критерию. Для дальнейшей валидации были выбраны следующие концентрации контролей: HPC – 300 нг/мл, MPC – 200 нг/мл, LPC – 150 нг/мл.

Селективность

Селективность методики представляет собой способность методики определять нейтрализующие антитела к адалимумабу в сыворотке крови в присутствии неродственных соединений (компонентов матрицы, сыворотки) как сигнал, находящийся ниже предела исключения. Селективность исследовали на 14 индивидуальных (включая гемолизированные) образцах интактной сыворотки крови человека с добавлением контрольных антител к адалимумабу на уровне LPC, MPC и HPC. Для каждого образца оценивали уровень сигнала относительно предела исключения.

Согласно полученным данным, значения относительных единиц флуоресценции для более 80 % образцов, содержащих нейтрализующие антитела к адалимумабу на уровне концентраций HPC, MPC и LPC, находятся ниже предела исключения. Для HPC и MPC 100 % образцов (14/14) имели отклик ниже предела исключения, а для LPC – 92,9 % (13/14).

[1] Pharmacopeia US. United States Pharmacopeia. General Chapter. <1106> Immunogenicity assays—design and validation of immunoassays to detect anti-drug antibodies. Rockville, MD: United States Pharmacopeia; 2022. Available at: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99825_02_01.html. Accessed: 01.11.2023.

Таблица 3. **Оценка чувствительности методики**

Table 3. **Sensitivity calculations**

Калибровочные стандарты, нг/мл Calibration Standards, ng/ml	**Циклы, RFU** Run No, RFU											
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
200	12350	14086	11837	14978	14048	12314	5975	5042	5196	6642	6973	5584
150	13919	16071	13965	16263	14676	14181	8926	6600	8073	8817	8257	7592
125	14211	16828	14659	16258	15195	14158	9660	8381	7807	9147	9391	8891
80	14960	18115	15543	17637	15823	14271	11388	9345	9176	10951	9461	9331
NC	16378	18378	15609	19688	17627	16687	13286	11797	12288	10820	10878	9938
Предел исключения Exclusion limit	14085	15805	13424	16932	15159	14351	11426	10145	10568	9305	9355	8547
Чувствительность в каждом цикле, нг/мл Sensitivity in each cycle, ng/ml	128,26	152,76	157,40	108,19	123,87	99,71	84,10	63,79	43,55	126,88	100,71	117,18
Среднее значение чувствительности, нг/мл Average sensitivity value, ng/ml									108,87			

Прецизионность

Функциональные клеточные тесты определения нейтрализующей активности отличаются сложностью используемых тест-систем (клеточные культуры), различиями в методологии, наличием большого количества этапов в ходе постановки методики, полуколичественным представлением данных, в связи с этим отсутствуют обобщенные критерии приемлемости для оценки прецизионности, пригодные для всех клеточных тестов[1].

Соответственно для оценки прецизионности[2] рекомендуется использовать подход, основанный на оценке минимально значимого отношения (MSR, minimum significant ratio). Минимально значимое отношение представляет собой наименьшую разницу между значениями титра, которая является статистически значимой ($P < 0,05$). Критерий приемлемости для оценки прецизионности в этом случае формулируется таким образом: наибольшая разница между титрами внутри цикла и между циклами не должна превышать MSR.

Для расчета MSR использовали значения RFU калибровочных стандартов с концентрацией антител к адалимумабу 300, 200, 150 и 125 нг/мл. Проводили 12 аналитических циклов согласно методике в течение нескольких дней. Образцы наносили в трех повторах. Рассчитывали значения RFU для стандартов 300, 200 и 150 нг/мл, нормированные на значения RFU для стандарта 125 нг/мл (титры). Полученные титры переводили в логарифмическую шкалу (log 10) и рассчитывали стандартные отклонения для каждого цикла и между циклами. MSR рассчитывали по следующей формуле:

$$MSR = 10^{t\sqrt{2SD}},$$

где MSR – минимально значимое отношение; t – критическое значение распределения Стьюдента, соответствующее 5 % уровню значимости. Для числа степеней свободы 11 (количество циклов минус 1); SD – сумма стандартных отклонений для значений внутри цикла и между циклами в логарифмической шкале.

Полученные результаты для прецизионности приведены в таблице 4.

Таблица 4. **Прецизионность внутри цикла и между циклами**

Table 4. **Intra- and inter-day precision**

Калибровочные стандарты, нг/мл Calibration Standards, ng/ml	**Наибольшая разность между титрами внутри цикла (прецизионность внутри цикла)** Largest difference between titers within a run (intra-run precision)	**Наибольшая разность между усредненными титрами для каждого цикла (прецизионность между циклами)** Largest difference between average titers for each cycle (precision between cycles)	**Критерий приемлемости (≤ MSR)** Acceptance criteria (≤ MSR)
300	0,86	3,36	≤4,14
200	0,38	2,18	≤3,15
150	0,35	0,30	≤1,77

Согласно полученным данным, наибольшая разность между титрами нигде не превысила MSR, что соответствует критерию приемлемости [15, 17].

[1] Pharmacopeia US. United States Pharmacopeia. General Chapter. <1106> Immunogenicity assays—design and validation of immunoassays to detect anti-drug antibodies. Rockville, MD: United States Pharmacopeia; 2022. Available at: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99825_02_01.html. Accessed: 01.11.2023.

[2] Там же.

Специфичность

Специфичность характеризует способность биоаналитической методики однозначно определять анализируемое вещество в присутствии родственных соединений (эндогенных или экзогенных) в биологическом образце (отсутствие перекрестного связывания). Методика основана на связывании адалимумаба с нейтрализующими антителами, специфичными к данному терапевтическому белку. Для исследования возможности перекрестного связывания были выбраны антитела человека к бевацизумабу и деносумабу. Специфичность метода исследовали с использованием образцов HPC и LPC и добавлением антител к бевацизумабу или деносумабу на уровне HPC. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты исследования специфичности методики

Table 5. Method specificity

Образец, № Sample, №	**Состав образца** Sample composition	**RE (abs),%**
1	HPC + антибевацизумаб HPC + antibevacizumab	0,81
2	HPC + антиденосумаб HPC + antidenosumab	14,07
3	LPC + антибевацизумаб LPC + antibevacizumab	10,01
4	LPC + антиденосумаб LPC + antidenosumab	8,29
Критерии приемлемости Eligibility Criteria		≤25 %

Согласно полученным данным, абсолютная величина относительной погрешности значений относительных единиц флуоресценции, содержащих структурно родственные молекулы, не превышает 25 % от RFU контрольных образцов.

Стабильность

При исследовании стабильности нейтрализующих антител к адалимумабу в образцах была установлена краткосрочная стабильность при комнатной температуре исходных образцов, стабильность до пяти циклов замораживания – размораживания и долгосрочная стабильность в течение 101 суток при температуре –80 и –36 °C. Для изучения стабильности использовали образцы с концентрацией на уровне LPC, MPC и HPC.

Для изучения долгосрочной стабильности в условиях естественного хранения образцы хранили при –80 и –36 °C и затем для каждого образца определяли относительную погрешность (RE, %) RFU от контрольных свежеприготовленных образцов. Для оценки стабильности при замораживании – размораживании образцы размораживали и выдерживали 1 час при комнатной температуре, затем подвергали повторным замораживаниям при –80 °C, между циклами замораживания – размораживания проходило не менее 12 часов. Для изучения краткосрочной стабильности исходные образцы выдерживали при комнатной температуре не менее 6 часов. Каждый образец анализировали в трех повторах. Полученные результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты исследования стабильности в образцах сыворотки крови человека

Table 6. Results of stability study in samples human serum

Стабильность при замораживании – размораживании Sample freeze-thaw stability (F/T), RE (abs), %			
Образец Sample	**1**	**3**	**5**
HPC_F/T	24,79	7,96	11,74
MPC_F/T	10,36	7,07	3,09
LPC_F/T	3,60	2,23	7,65
Краткосрочная («настольная») стабильность Sample bench-top stability (BTS)			
Образец Sample	**RE (abs), %**		
HPC_BTS	12,40		
MPC_BTS	4,36		
LPC_BTS	7,74		
Долгосрочная стабильность Sample long-term stability (LTS), RE (abs), %			
Образец Sample	**–36 °C**	**–80 °C**	
HPC_LTS	9,43	20,74	
MPC_LTS	9,81	7,84	
LPC_LTS	10,81	9,28	
Критерии приемлемости Eligibility Criteria	≤25 %		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована методика определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека на основе функционального клеточного теста. Определение проводили с использованием TNFα-чувствительной клеточной линии L-929; нейтрализующие антитела связываются с адалимумабом, блокируя его взаимодействие с TNFα, что приводит к TNFα-опосредованной цитотоксичности. Цитотоксичность оцениваои с помощью резазурина. Чувствительность методики составила 108,9 нг/мл нейтрализующих антител к адалимумабу. Предел определения был выбран «плавающим» с поправочным коэффициентом (фактор нормализации) равным 0,86. Таким образом, доказана возможность использования методики для определения нейтрализующих антител к адалимумабу в сыворотке крови человека в том числе, в исследовании иммуногенности при проведении клинических исследований и исследований биоэквивалентности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lu R.-M., Hwang Y.-C., Liu I.-J., Lee C.-C., Tsai H.-Z., Li H.-J., Wu H.-C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of biomedical science*. 2020;27(1):1. DOI: 10.1186/s12929-019-0592-z.

2. Tobón G. J., Youinou P., Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2010;35(1):10–14. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.12.009.
3. Zen M., Salmaso L., Barbiellini Amidei C., Giollo A., Fedeli U., Bellio S., Arru F., Gennaio I., Saia M., Doria A. AB1628 the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Italy in the last decade. *Annals of the rheumatic diseases*. 2023;82(1):2048–2048. DOI: 10.1136/annrheumdis-2023-eular.1432.
4. Kukar M., Petryna O., Efthimiou P. Biological targets in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of current and in-development biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Biologics: targets & therapy*. 2009;3:443–457.
5. Rein P., Mueller R. B. Treatment with Biologicals in Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Rheumatology and therapy*. 2017;4:247–261. DOI: 10.1007/s40744-017-0073-3.
6. Leonardi C., Langley R. G., Papp K., Tyring S. K., Wasel N., Vender R., Unnebrink K., Gupta S. R., Valdecantos W. C., Bagel J. Adalimumab for treatment of moderate to severe chronic plaque psoriasis of the hands and feet: efficacy and safety results from REACH, a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Archives of dermatology*. 2011;147(4):429–436. DOI: 10.1001/archdermatol.2010.384.
7. Sator P. Safety and tolerability of adalimumab for the treatment of psoriasis: a review summarizing 15 years of real-life experience. *Therapeutic advances in chronic disease*. 2018;9(8):147–158. DOI: 10.1177/2040622318772705.
8. Mantovani L., Medaglia M., Piacentini P., Tricca M., Vena G. A., Vozza A., Castellino G., Roccia A. Burden of Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis and New Therapeutic Approaches (Secukinumab): An Italian Perspective. *Dermatology and therapy*. 2016;6:151–167. DOI: 10.1007/s13555-016-0114-9.
9. Badri T., Kumar P., Oakley A.M. Plaque Psoriasis. *StatPearls*. 2022. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430879/ Accessed: 01.11.2023.
10. Bu J., Ding R., Zhou L., Chen X., Shen E. Epidemiology of Psoriasis and Comorbid Diseases: A Narrative Review. *Frontiers in immunology*. 2022;13:880201. DOI: 10.3389/fimmu.2022.880201.
11. Mansouri Y., Goldenberg G. Biologic safety in psoriasis: review of long-term safety data. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*. 2015;8(2):30–42.
12. Doevendans E., Schellekens H. Immunogenicity of Innovative and Biosimilar Monoclonal Antibodies. *Antibodies*. 2019;8(1). DOI: 10.3390/antib8010021.
13. Gehin J. E., Goll G. L., Brun M. K., Jani M., Bolstad N., Syversen S. W. Assessing Immunogenicity of Biologic Drugs in Inflammatory Joint Diseases: Progress Towards Personalized Medicine. *BioDrugs*. 2022;36(6):731–748. DOI: 10.1007/s40259-022-00559-1.
14. Liang S., Zhang C. Prediction of immunogenicity for humanized and full human therapeutic antibodies. *PLOS ONE*. 2020;15(8):e0238150. DOI: 10.1371/journal.pone.0238150.
15. Myler H., Pedras-Vasconcelos J., Lester T., Civoli F., Xu W., Wu B., Vainshtein I., Luo L., Hassanein M., Liu S., Ramaswamy S. S., Mora J., Pennucci J., McCush F., Lavelle A., Jani D., Ambakhutwala A., Baltrukonis D., Barker B., Carmean R., Chung S., Dai S., DeWall S., Dholakiya S. L., Dodge R., Finco D., Yan H., Hays A., Hu Z., Inzano C., Kamen L., Lai C. H., Meyer E., Nelson R., Paudel A., Phillips K., Poupart M. E., Qu Q., Abhari M.R., Ryding J., Sheldon C., Spriggs F., Warrino D., Wu Y., Yang L., Pasas-Farmer S. Neutralizing Antibody Validation Testing and Reporting Harmonization. *The AAPS Journal*. 2023;25:69. DOI: 10.1208/s12248-023-00830-5.
16. Flick D. A., Gifford G. E. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *Journal of immunological methods*. 1984;68(1–2):167–175. DOI: 10.1016/0022-1759(84)90147-9.
17. Jani D., Marsden R., Gunsior M., Hay L. S., Ward B., Cowan K. J., Azadeh M., Barker B., Cao L., Closson K. R., Coble K., Dholakiya S. L., Dusseault J., Hays A., Herl C., Hodsdon M. E., Irvin S. C., Kirshner S., Kolaitis G., Kulagina N., Kumar S., Lai C. H., Lipari F., Liu S., Merdek K. D., Moldovan I. R., Mozaffari R., Pan L., Place C., Snoeck V., Manning M. S., Stocker D., Tary-Lehmann M., Turner A., Vainshtein I., Verthelyi D., Williams W. T., Yan H., Yan W., Yang L., Yang L., Zemo J., Zhong Z. D. Anti-drug Antibody Sample Testing and Reporting Harmonization. *The AAPS Journal*. 2022;24:113. DOI: 10.1208/s12248-022-00762-6.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1644
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение фармакокинетики препарата для перорального приема Эсперавир® (МНН: молнупиравир) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования

Т. Н. Комаров[1, 2], Н. С. Багаева[1]✉, К. К. Карнакова[1], К. Я. Заславская[3], П. А. Белый[3], И. Е. Шохин[1]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН). 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
[3] Общество с ограниченной ответственностью «ПРОМОМЕД РУС», 129090, Россия, г. Москва, Проспект Мира, д. 13 стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Багаева Наталья Сергеевна. **E-mail:** n.bagaeva@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; К. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231; К. Я. Заславская – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; П. А. Белый – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 08.11.2023 **Статья принята в печать:** 13.02.2024 **Статья опубликована:** 16.02.2024

Резюме

Введение. Пандемию новой коронавирусной инфекции COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) вызвал одноцепочечный РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Молнупиравир является противовирусным препаратом с известной активностью в отношении РНК-содержащих вирусов, в том числе SARS-CoV-2. Молнупиравир оказывает противовирусное действие за счет внесения ошибок копирования во время репликации вирусной РНК, тем самым ингибируя репликацию SARS-CoV-2. В России зарегистрирован препарат Эсперавир® для перорального приема с действующим веществом молнупиравир.

Цель. Целью исследования является изучение фармакокинетики препарата Эсперавир®, капсулы 200 мг (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) у здоровых добровольцев после однократного приема (доза 800 мг) и после многократного приема (800 мг двукратно с интервалом 12 ч) в рамках фазы I клинического исследования, а также сравнение полученных данных фармакокинетических параметров с литературными данными.

Материалы и методы. Клинический, аналитический этапы исследования, анализ фармакокинетических параметров проводился в рамках исследования препарата Эсперавир®, капсулы 200 мг (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия). Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR и тандемном масс-спектрометрическом детекторе LCMS-8040 с тройным квадруполем (Shimadzu Corporation, Япония). Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью программы Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США). Описательная статистика фармакокинетических параметров рассчитывалась с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США).

Результаты и обсуждение. Для 1 когорты (однократный прием препарата Эсперавир® в дозе 800 мг) и для 2 когорты (двукратный прием препарата Эсперавир® по 800 мг с интервалом 12 ч) рассчитаны фармакокинетические параметры. Построены фармакокинетические профили усредненных значений концентраций во времени в линейном и логлинейном преобразовании. Среднегеометрические значения фармакокинетических параметров C_{max} и $T_{1/2}$, а также медианы, минимальные и максимальные значения фармакокинетического параметра T_{max} позволяют сделать вывод о сопоставимости полученных данных после однократного приема препарата Эсперавир® в дозе 800 мг с имеющимися литературными данными.

Заключение. По полученным на аналитическом этапе исследования значениям концентраций были рассчитаны фармакокинетические параметры, построены усредненные фармакокинетические профили в линейных и логлинейных координатах после однократного и многократного приема препарата Эсперавир®, капсулы (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия). Анализ полученных фармакокинетических параметров в сравнении с литературными данными показал их сопоставимость. Полученные результаты определили возможность и целесообразность перехода к последующим фазам клинических исследований препарата Эсперавир®.

Ключевые слова: молнупиравир, COVID-19, фармакокинетика

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

Вклад авторов. Т. Н. Комаров участвовал в проведении аналитического этапа исследования. Н. С. Багаева, К. К. Карнакова проводили статистическую обработку данных и расчет фармакокинетических параметров. И. Е. Шохин, К. Я. Заславская, П. А. Белый отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Финансирование. Клиническое исследование спонсировалось ООО «ПРОМОМЕД РУС». К. Я. Заславская и П. А. Белый являются представителями данной компании.

© Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Заславская К. Я., Белый П. А., Шохин И. Е., 2024
© Komarov T. N., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Shohin I. E., 2024

Для цитирования: Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Заславская К. Я., Белый П. А., Шохин И. Е. Изучение фармакокинетики препарата для перорального приема Эсперавир® (МНН: молнупиравир) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):216–223. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1644

Phase I Pharmacokinetics Study of Oral Administration of Esperavir® (INN: Molnupiravir) (LLC "PROMOMED RUS", Russia)

Timofey N. Komarov[1, 2], Natalia S. Bagaeva[1] ✉, Kseniia K. Karnakova[1], Kira Ya. Zaslavskaya[3], Petr A. Bely[3], Igor E. Shohin[1]

[1] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
[2] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
[3] LLC «PROMOMED RUS». 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ **Corresponding author:** Natalia S. Bagaeva. **E-mail:** n.bagaeva@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Kseniia K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231; Kira Ya. Zaslavskaya – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; Petr A. Bely – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 08.11.2023 **Revised:** 13.02.2024 **Published:** 16.02.2024

Abstract

Introduction. The pandemic of the new coronavirus infection COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) was caused by a single-stranded RNA virus SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Molnupiravir is an antiviral drug with activity against RNA viruses including SARS-CoV-2. Molnupiravir exerts the antiviral effect by introducing copy errors during viral RNA replication – by that the replication of SARS-CoV-2 inhibits. For oral administration of molnupiravir the drug Esperavir® has been registered in Russia.

Aim. The aim is pharmacokinetics study of Esperavir®, capsules 200 mg (the manufacturer is JSC "Biokhimic", LLC "PROMOMED RUS", Russia, as registration certificate holder) by a single dose (800 mg) and multiple doses oral administration (800 mg twice a day with a gap of 12 hours between doses) in healthy volunteers in a phase I pharmacokinetics study, comparison the obtained data of pharmacokinetic parameters with the literature data.

Materials and methods. The clinical and analytical phases of the pharmacokinetic study as well as pharmacokinetic analyses have been performed as a part of a clinical trial of the drug Esperavir®, capsules 200 mg (the manufacturer is JSC "Biokhimic", LLC "PROMOMED RUS", Russia, as registration certificate holder). Chromatographic separation and detection by Nexera XR high-performance liquid chromatograph with triple quadrupole tandem mass spectrometry LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Japan). The pharmacokinetic parameters were calculated with the Boomer pharmacokinetic analysis add-in for Microsoft Excel (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, USA). Descriptive pharmacokinetic statistics were calculated with Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

Results and discussion. Pharmacokinetic parameters for cohort 1 (800 mg single dose of Esperavir®) and for cohort 2 (800 mg of Esperavir® twice a day with a gap of 12 hours between doses) were calculated. Averaged pharmacokinetic profiles of mean NHC concentrations over time in linear and log-linear scales were plotted. The geometric mean of C_{max} and $T_{1/2}$, the median, minimum and maximum of T_{max} showed the comparability of the obtained data after a single dose administration of 800 mg of Esperavir® and the available literature data.

Conclusion. According to the concentrations from the analytical phase of the pharmacokinetic study the pharmacokinetic parameters were calculated, averaged pharmacokinetic profiles in linear and log-linear scales were plotted after a single dose and multiple doses of the drug Esperavir®, capsules (the manufacturer is JSC "Biokhimic", LLC "PROMOMED RUS", Russia, as registration certificate holder). The comparability of the obtained data and the available literature data was shown. The results justified the study of the subsequent phases of clinical trials of Esperavir®.

Keywords: molnupiravir, COVID-19, pharmacokinetics

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

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov participated in the clinical phase of the study. Natalia S. Bagaeva and Kseniia K. Karnakova carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

Funding. A clinical study was sponsored by LLC "PROMOMED RUS". Authors Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely represent LLC "PROMOMED RUS".

For citation: Komarov T. N., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Shohin I. E. Phase I pharmacokinetics study of oral administration of Esperavir® (INN: molnupiravir) (LLC "PROMOMED RUS", Russia). *Drug development & registration*. 2024;13(1):216–223. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1644

ВВЕДЕНИЕ

В декабре 2019 года в Китае в городе Ухань произошла крупная вспышка инфекционного заболевания COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), вызванного ранее неизвестным вирусом SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) [1–3]. SARS-CoV-2 представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус, который относится к семейству *Coronaviridae* [4]. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 быстро распространилась по всему миру и вызвала беспрецедентно тяжелую вирусную пан-

демию [5]. Несмотря на снижение уровня заболеваемости, на сегодняшний день проблема новой коронавирусной инфекции остается актуальной [3].

Во временных методических рекомендациях[1] Министерства здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» представлен перечень лекарственных препаратов для этиотропного лечения COVID-19, одним из которых является молнупиравир. Молнупиравир – противовирусный препарат, представляющий собой низкомолекулярное рибонуклеозидное пролекарство N-гидроксицитидина (NHC) с известной активностью в отношении SARS-CoV-2 и других РНК-содержащих вирусов [6]. После приема молнупиравир быстро всасывается в кишечнике и гидролизуется до исходного нуклеозида NHC, который широко распределяется в различных тканях и затем фосфорилируется в трифосфатную форму (NHC-TP). Трифосфат NHC встраивается в вирусную РНК с помощью РНК-полимеразы, вызывая мутагенез в вирусном геноме. С каждым циклом репликации вируса мутации накапливаются, что в итоге приводит к ингибированию репликации SARS-CoV-2 [6–8].

В США Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) выдано разрешение на применение молнупиравира для лечения взрослых пациентов легкой и средней степени тяжести, которые подвержены высокому риску прогрессирования заболевания в тяжелую форму и для которых альтернативные варианты лечения недоступны или клинически неприемлемы [9, 10]. В Великобритании молнупиравир одобрен для использования у пациентов с легкой и средней степенью тяжести COVID-19, у которых есть по крайней мере один фактор риска развития тяжелого заболевания (сахарный диабет, ожирение, сердечно-сосудистые заболевания, возраст старше 60 лет) для предотвращения тяжелых исходов [11]. В Российской Федерации молнупиравир рекомендован для лечения COVID-19 в легкой или средней форме у взрослых, в том числе с повышенным риском прогрессирования заболевания до тяжелой формы и не требующих дополнительной оксигенотерапии. Лечение молнупиравиром должно быть начато как можно раньше после постановки диагноза новой коронавирусной инфекции и/или в течение 5 дней после появления первых симптомов заболевания.

Первым российским препаратом с молнупиравиром стал Эсперавир® в форме капсул 200 и 400 мг (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия), получивший регистрационное удостоверение Минздрава России 3 февраля 2022 года (РУ ЛП-007856)[2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический, аналитический этапы исследования, анализ фармакокинетических параметров и их сопоставление с имеющимися литературными данными для молнупиравира проводились в рамках I фазы клинического исследования препарата Эсперавир®, капсулы 200 мг (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) (далее – Эсперавир®) «Открытое двухэтапное многоцентровое исследование по оценке основных фармакокинетических параметров, безопасности, а также эффективности в отношении COVID-19 лекарственного препарата Эсперавир®, капсулы (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) у взрослой популяции». Исследование одобрено Министерством здравоохранения Российской Федерации РКИ № 805 от 1 декабря 2021 года, протокол № MOL-112021[3].

Клинический этап исследования

В исследовании принимали участие 12 здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 18 до 45 лет включительно. Добровольцы были разделены на 2 когорты по 6 здоровых добровольцев в каждой (1 когорта получала препарат однократно в дозе 800 мг; 2 когорта – двукратно по 800 мг с интервалом 12 ч). Исследование начиналось с применения препарата у добровольцев 1 когорты. Под наблюдением специалистов добровольцы 1 когорты принимали исследуемый препарат в разовой дозе 800 мг (4 капсулы по 200 мг), запивая 200 мл столовой воды (без газа). До приема исследуемого препарата добровольцам устанавливался кубитальный гепаринизированный катетер на 14,5 ч. После удаления катетера отбор крови у добровольцев проводился путем венепункции (через 24, 36, 48 и 72 ч после приема препарата). После установки катетера за 5–10 мин до приема препарата отбиралась исходная (0) проба крови. После приема препарата отбор проб крови проводился через 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 1 ч 45 мин, 2 ч, 2 ч 15 мин, 2 ч 30 мин, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 14 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 72 ч. Прием препарата добровольцами 2 когорты начинался после оценки безопасности применения препарата у добровольцев 1 когорты и принятия решения о возможности даль-

[1] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 18 (26.10.2023)» (утвержденные Министерством здравоохранения Российской Федерации). Доступен по: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/064/610/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V18.pdf. Ссылка активна на 01.11.2023.

[2] ГРЛС. Министерство здравоохранения Российской Федерации: Регистрационное удостоверение ЛП-007856. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/material/national/registration-certificate?guid=62a879e9-2c06-4028-8a58-5bac4e01d9ef. Ссылка активна на 02.05.2023.

[3] ГРЛС. Министерство здравоохранения Российской Федерации: Реестр разрешений на проведение клинических исследований 805. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/material/national/clinical-permission?guid=73a7debb-6bfb-4aca-9513-c1e8e453d9b4. Ссылка активна на 02.05.2023.

нейшей эскалации дозы исследуемого препарата. Решение о возможности эскалации дозы принималось экспертным советом по лекарственной безопасности на основании оценки нежелательных явлений. Добровольцы 2 когорты принимали исследуемый препарат двукратно с интервалом 12 ч в разовой дозе 800 мг (4 капсулы по 200 мг), запивая 200 мл столовой воды (без газа). Отбор крови у добровольцев проводился путем венепункции за 5–10 мин до первого приема препарата (исходная (0) проба крови) и через 24, 36, 48 и 72 ч после первого приема препарата.

Образцы крови отбирались в пробирки с K_2- или K_3ЭДТА, центрифугировались при 3000 об/мин при температуре +4 °С в течение 10 мин. Полученная плазма делилась на две аликвоты (пробы для анализа и контрольные пробы). Все образцы замораживались и хранились при температуре не выше минус 80 °С. Транспортировка основных проб крови в аналитическую лабораторию осуществлялась при контролируемом температурном режиме не выше минус 80 °С.

Аналитический этап исследования

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, устройством автоматической подачи образцов в автосамплер, краном переключения линии потока высокого давления и с тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 с тройным квадруполем (Shimadzu Corporation, Япония). Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 10,00–10 000,00 нг/мл в плазме крови [12].

Статистическая обработка данных и анализ фармакокинетики

Индивидуальные профили изменения значений концентраций NHC в плазме крови добровольцев во времени, зарегистрированные после однократного приема исследуемого препарата Эсперавир®, характеризовались максимальным значением концентраций NHC (C_{max}) и временем его достижения (T_{max}); площадью под кривой «плазменная концентрация – время» с момента приема препарата до последней определяемой концентрации во временной точке *t* (AUC_{0-t}), рассчитанной методом трапеций; площадью под кривой «плазменная концентрация – время» с момента приема препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$). Дополнительно определялись следующие фармакокинетические параметры: период полувыведения ($T_{1/2}$); константа скорости элиминации (K_{el}), оцениваемая по угловому коэффициенту линии регрессии, рассчитанному по методу наименьших квадратов, натурального логарифмического значения концентраций NHC по отношению ко времени получения последних значений концентраций NHC свыше нижнего предела количественного определения; объем распределения лекарственного средства (V_d); общий клиренс (Cl); среднее время удержания лекарственного вещества в плазме крови (MRT)[1].

Индивидуальные профили изменения значений концентраций NHC в плазме крови добровольцев во времени, зарегистрированные после многократного приема исследуемого препарата Эсперавир®, характеризовались максимальным ($C_{max, ma}$) и минимальным значениями концентрации NHC ($C_{min, ma}$), площадью под кривой «плазменная концентрация – время» с временной точки 24 ч до последнего определяемого значения плазменной концентрации во временной точке ($AUC_{24-\tau}$), рассчитанной методом трапеций.

Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью программы Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США). Распределение фармакокинетических параметров описано мерами центральной тенденции (среднее арифметическое, среднее геометрическое, медиана) и мерой разброса данных (стандартное отклонение, коэффициент вариации, минимальное значение, максимальное значение) [13, 14]. Описательная статистика фармакокинетических параметров рассчитывалась с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата Эсперавир® при однократном приеме, 1 когорта, доза 800 мг

Фармакокинетика оценивалась на выборке из 6 добровольцев. Максимальное значение концентрации NHC (C_{max}) составило 4405,10 ± 1505,58 нг/мл ($M \pm \sigma$, где M – среднее арифметическое, σ – стандартное квадратичное отклонение). Значение медианы времени достижения максимальной концентрации NHC составило 1,75 ч. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента приема препарата до последней определяемой концентрации во временной точке *t* (AUC_{0-t}) составило 15 478,78 ± 5639,67 нг · ч/мл. Значение площади под кривой «плазменная концентрация – время» с момента приема препарата до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$) – 15 579,67 ± 5694,36 нг · ч/мл. NHC элиминировались из плазмы крови со значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) 1,54 ± 0,17 ч. Общий клиренс (Cl) – 61,61 ± 35,64 л/ч. Объем распределения лекарственного средства (V_d) соответствует значению

[1] ГОСТ Р 57679-2017 Лекарственные средства для медицинского применения. Исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов. М.: Стандартинформ. 2019. Доступно по: https://internet-law.ru/gosts/gost/65227/. Ссылка активна на 02.11.2023.

132,34 ± 61,05 л. Значение среднего времени удержания NHC в плазме крови (MRT) составило 8,09 ± 4,49 ч (таблица 1).

Таблица 1. Фармакокинетические параметры после однократного и многократного приема препарата Эсперавир®

Table 1. Pharmacokinetic parameters after a single dose and multiple doses of Esperavir®

Фармакокинетические параметры после однократного приема препарата Эсперавир® Pharmacokinetic parameters after a single dose of Esperavir®	
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/mL	4405,10 ± 1505,58 [6]
AUC_{0-t}, нг · ч/мл AUC_{0-t}, ng · h/mL	15478,78 ± 5639,67 [6]
$AUC_{0-\infty}$, нг · ч/мл $AUC_{0-\infty}$, ng · h/mL	15579,67 ± 5694,36 [6]
T_{max}, ч T_{max}, h	1,75 (1,0–3,0) [6]
K_{el}, $ч^{-1}$ K_{el}, h^{-1}	0,454 ± 0,053 [6]
$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h	1,54 ± 0,17 [6]
Cl, л/ч Cl, L/h	61,61± 35,64 [6]
V_d, л V_d, L	132,34 ± 61,05 [6]
MRT, ч MRT, h	8,09 ± 4,49 [6]
Фармакокинетические параметры после многократного приема препарата Эсперавир® Pharmacokinetic parameters after multiple doses of Esperavir®	
$C_{max, ma}$, нг/мл $C_{min, ma}$, ng/mL	50,88 ± 21,46 [4]
$C_{min, ma}$, нг/мл $C_{min, ma}$, ng/mL	30,05 ± 8,59 [4]
$AUC_{24-\tau}$, нг · ч/мл $AUC_{24-\tau}$, ng · h/mL	1897,08 ± 737,46 [4]

Примечание. Для всех параметров, кроме T_{max}, приведены значения $M \pm \sigma$ [n] (M – среднее арифметическое; σ – стандартное отклонение; n – размер выборки). Для параметра T_{max} приведены значения Median (Min – Max) [n] (Median – медиана; Max – максимальное значение; Min – минимальное значение; n – размер выборки).

Note. For all parameters except T_{max}, the values $M \pm \sigma$ [n] are given (M – arithmetic mean; σ – standard deviation; n – sample size). For the T_{max} parameter, the values are Median (Min – Max) [n] (Median – median; Max – maximum value; Min – minimum value; n – sample size).

Рисунки 1–2 представляют фармакокинетические профили усредненных значений концентраций NHC во времени (в линейном и логлинейном преобразовании) после однократного приема исследуемого препарата Эсперавир® в дозе 800 мг.

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата Эсперавир® при двукратном приеме, 2 когорта, доза 800 мг

Фармакокинетика оценивалась у 4 из 6 добровольцев, так как у двух добровольцев значения всех концентраций NHC были ниже нижнего предела количественного определения. Значение максимальной концентрации NHC в плазме крови добровольцев ($C_{max, ma}$) составило 50,88 ± 21,46 нг/мл. Значение минимальной концентрации NHC в плазме крови добровольцев (Cmin,ma) составило 30,05 ± 8,59 нг/мл. Значение $AUC_{24-\tau}$ составило 1897,08 ± 737,46 нг · ч/мл (таблица 1).

Рисунки 3–4 представляют фармакокинетические профили усредненных значений концентраций NHC во времени (в линейном и логлинейном преобразовании) после приема исследуемого препарата Эсперавир®двукратно по 800 мг с интервалом 12 ч.

Среднегеометрические значения фармакокинетических параметров C_{max} и $T_{1/2}$, а также медианы, минимальные и максимальные значения фармакокинетического параметра Tmax позволяют сделать вывод о сопоставимости полученных данных с имеющимися литературными данными для молнупиравира [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках I фазы клинического исследования препарата Эсперавир®, капсулы (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) проводились клинический, аналитический этапы исследования, анализ фармакокинетических параметров и их сопоставление с имеющимися литературными данными. По полученным на аналитическом этапе исследования значениям концентраций NHC были рассчитаны фармакокинетические параметры, построены усредненные фармакокинетические профили в линейных и логлинейных координатах после однократного и многократного приема препарата Эсперавир® в дозе 800 мг. Сравнение фармакокинетических параметров C_{max}, T_{max} и $T_{1/2}$ после однократного приема препарата Эсперавир® с литературными данными показало их сопоставимость. Полученные результаты определили возможность и целесообразность перехода к последующим фазам клинических исследований препарата Эсперавир®.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–1062. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
2. Cheng Z. J., Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*. 2020;48(2):155–163. DOI: 10.1007/s15010-020-01401-y.
3. Вечорко В. И., Аверков О. В., Зимин А. А. Новый штамм SARS-CoV-2 Омикрон – клиника, лечение, профилактика (обзор литературы). *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(6):3228. DOI: 10.15829/1728-8800-2022-3228.
4. Шамшева О. В. Новый коронавирус COVID-19 (SARS-CoV-2). *Детские инфекции*. 2020;19(1):5–6. DOI: 10.22627/2072-8107-2020-19-1-5-6.
5. Conti P., Caraffa A., Gallenga C. E., Kritas S. K., Frydas I., Younes A., Di Emidio P, Tetè G., Pregliasco F., Ronconi G. The British variant of the new coronavirus-19 (Sars-Cov-2) should not create a vaccine problem. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2021;35(1):1–4. DOI: 10.23812/21-3-E.

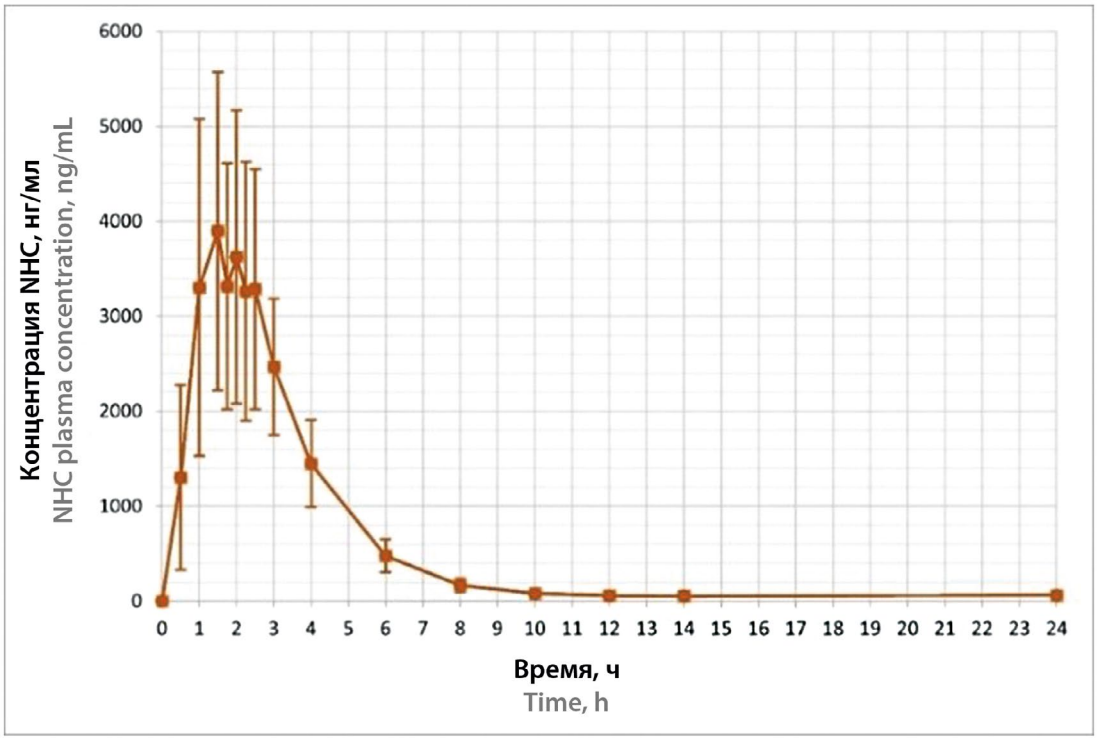


Рисунок 1. **Усредненный фармакокинетический профиль (в линейных координатах со стандартными отклонениями) NHC после однократного приема препарата Эсперавир®**

Figure 1. **Average pharmacokinetic profile (in linear scale with standard deviations) of NHC after a single dose of Esperavir®**

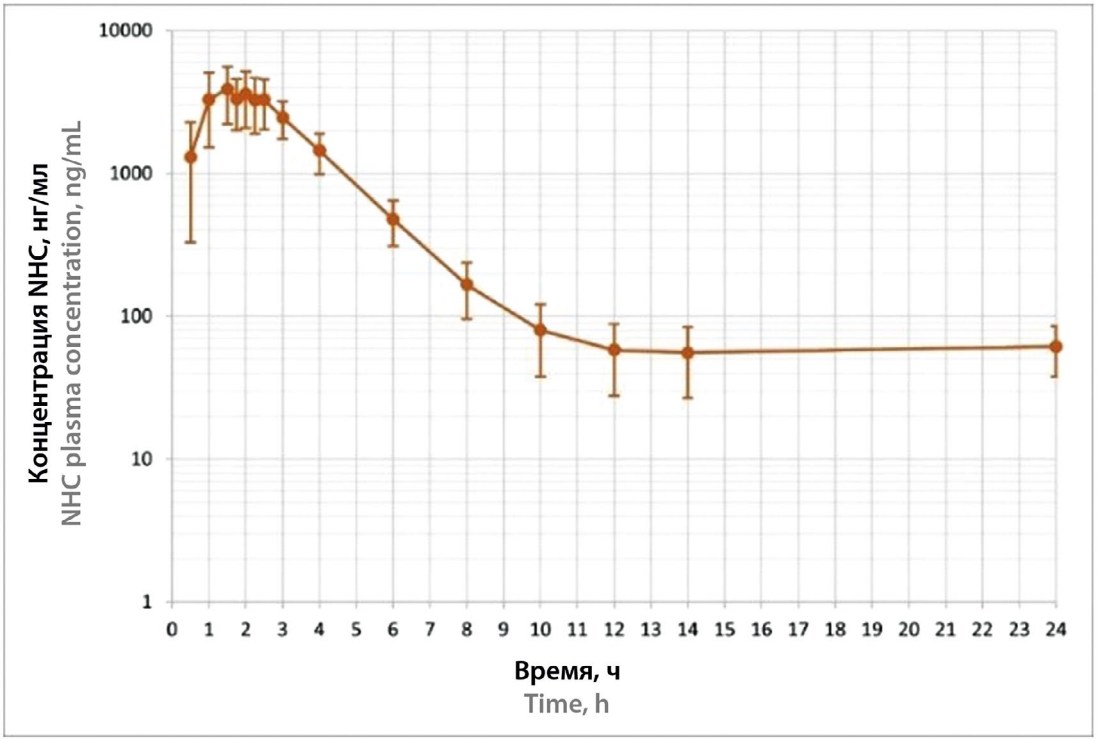


Рисунок 2. **Усредненный фармакокинетический профиль (в логлинейных координатах со стандартными отклонениями) NHC после однократного приема препарата Эсперавир®**

Figure 2. **Average pharmacokinetic profile (in log-linear scale with standard deviations) of NHC after a single dose of Esperavir®**

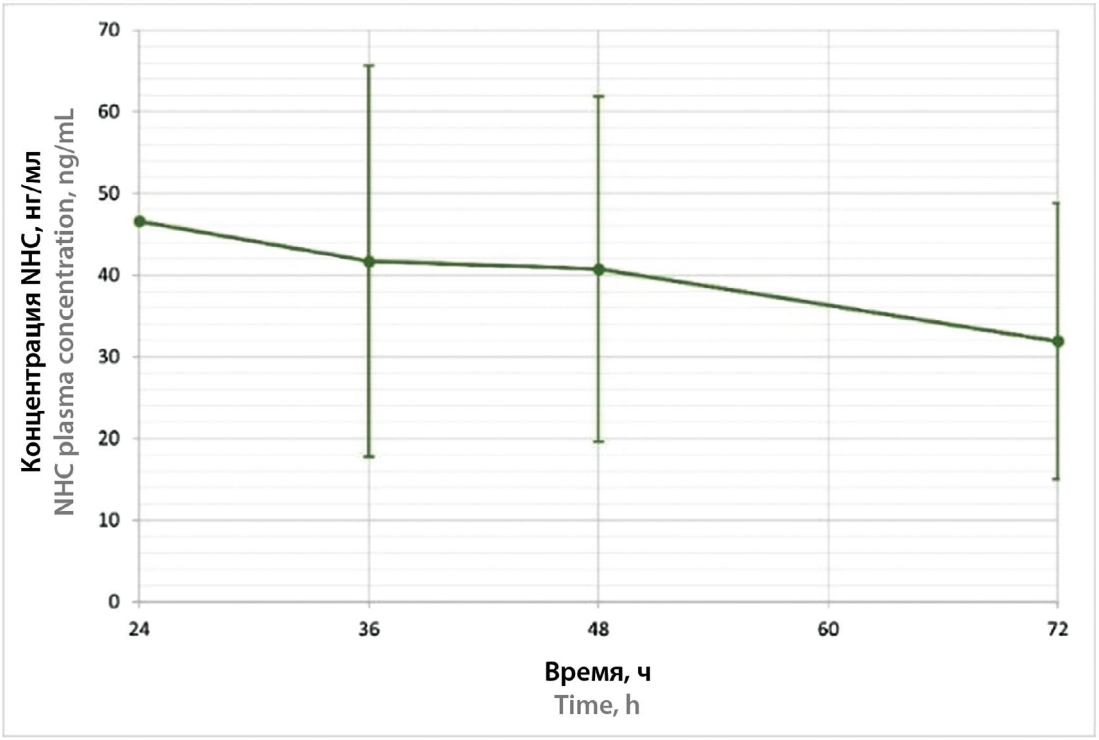


Рисунок 3. **Усредненный фармакокинетический профиль (в линейных координатах со стандартными отклонениями) NHC после многократного приема препарата Эсперавир®**

Figure 3. **Average pharmacokinetic profile (in linear scale with standard deviations) of NHC after multiple doses of Esperavir®**

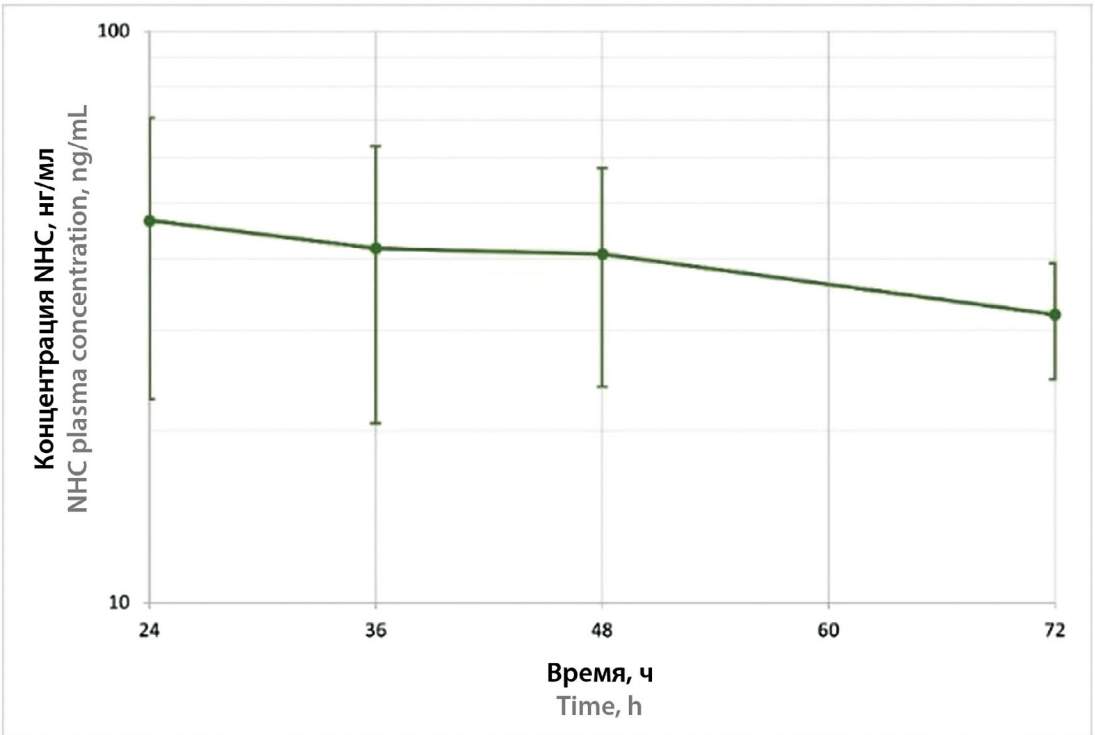


Рисунок 4. **Усредненный фармакокинетический профиль (в логлинейных координатах со стандартными отклонениями) NHC после многократного приема препарата Эсперавир®**

Figure 4. **Average pharmacokinetic profile (in log-linear scale with standard deviations) of NHC after multiple doses of Esperavir®**

6. Jayk Bernal A., Gomes da Silva M. M., Musungaie D. B., Kovalchuk E., Gonzalez A., Delos Reyes V., Martín-Quirós A., Caraco Y., Williams-Diaz A., Brown M. L., Du J., Pedley A., Assaid C., Strizki J., Grobler J. A., Shamsuddin H. H., Tipping R., Wan H., Paschke A., Butterton J. R., Johnson M. G., De Anda C., MOVe-OUT Study Group. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *The New England Journal of Medicine*. 2022;386(6):509–520. DOI: 10.1056/NEJMoa2116044.
7. Nakamura K., Fujimoto K., Hasegawa C., Aoki I., Yoshitsugu H., Ugai H., Yatsuzuka N., Tanaka Y., Furihata K., Maas B. M., Wickremasingha P. K., Duncan K. E., Iwamoto M., Stoch S. A., Uemura N. A phase I, randomized, placebo-controlled study of molnupiravir in healthy Japanese to support special approval in Japan to treat COVID-19. *Clinical and Translational Science.* 2022;15(11):2697–2708. DOI: 10.1111/cts.13395.
8. Шипаева Е. В., Филон О. В., Зинченко А. В., Шипунов Г. А., Дмитриева А. А., Лемак М. С., Гришин С. А., Трофимец Е. И., Крышень К. Л., Козловская Л. И., Лунин А. С., Аполохов В. Д., Барбашов С. Ф., Лавровский Я. В., Самсонов М. Ю. Доклинические исследования противовирусной активности гибридного белка RPH-137 и молнупиравира в отношении COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(4):414–434. DOI: 10.30895/2221-996X-2022-22-4-414-434.
9. Vangeela L., Chiu W., Jonghe S. D, Maes P., Slechten B., Raymenants J., André E., Leyssen P., Neytsa J., Jochmans D. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Research*. 2022;(198):105252. DOI:10.1016/j.antiviral.2022.105252.
10. Tian L., Pang Z., Li M., Lou F., An X., Zhu S., Song L., Tong Y., Fan H., Fan J. Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19. *Frontiers in Immunology.* 2022;13:855496. DOI: 10.3389/fimmu.2022.855496.
11. Shiraki K., Sato N., Sakai K., Matsumoto S., Kaszynski R. H., Takemoto M. Antiviral therapy for COVID-19: Derivation of optimal strategy based on past antiviral and favipiravir experiences. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;235:108121. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108121.
12. Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β-D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):215–226. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.
13. Смолянова Т. И., Багаева Н. С., Колганова М. А., Шохин И. Е., Николаева А. М., Вязникова Т. В., Панкратова А. А., Быкова Е. А. Изучение фармакокинетики препарата «КОВИД-глобулин» (специфический иммуноглобулин человека против COVID-19) (АО «Нацимбио», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(2):180–186. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186.
14. Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Изучение фармакокинетики препарата для инфузионного введения Арепливир® (МНН: фавипиравир) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):146–153. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-146-153.
15. Painter W. P., Holman W., Bush J. A., Almazedi F., Malik H., Eraut N. C. J. E., Morin M. J., Szewczyk L. J., Painter G. R. Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity Against SARS-CoV-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021;65(5):02428-20. DOI: 10.1128/AAC.02428-20.

REFERENCES

1. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395(10229):1054–1062. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
2. Cheng Z. J., Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*. 2020;48(2):155–163. DOI: 10.1007/s15010-020-01401-y.
3. Vechorko V. I., Averkov O. V., Zimin A. A. New SARS-CoV-2 Omicron variant – clinical picture, treatment, prevention (literature review). *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(6):3228. (In Russ.) DOI: 10.15829/1728-8800-2022-3228.
4. Shamsheva O. V. New Coronavirus COVID-19 (SARS-CoV-2). *Children infections*. 2020;19(1):5–6. (In Russ.) DOI: 10.22627/2072-8107-2020-19-1-5-6.
5. Conti P., Caraffa A., Gallenga C. E., Kritas S. K., Frydas I., Younes A., Di Emidio P, Tetè G., Pregliasco F., Ronconi G. The British variant of the new coronavirus-19 (Sars-Cov-2) should not create a vaccine problem. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2021;35(1):1–4. DOI: 10.23812/21-3-E.
6. Jayk Bernal A., Gomes da Silva M. M., Musungaie D. B., Kovalchuk E., Gonzalez A., Delos Reyes V., Martín-Quirós A., Caraco Y., Williams-Diaz A., Brown M. L., Du J., Pedley A., Assaid C., Strizki J., Grobler J. A., Shamsuddin H. H., Tipping R., Wan H., Paschke A., Butterton J. R., Johnson M. G., De Anda C., MOVe-OUT Study Group. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *The New England Journal of Medicine*. 2022;386(6):509–520. DOI: 10.1056/NEJMoa2116044.
7. Nakamura K., Fujimoto K., Hasegawa C., Aoki I., Yoshitsugu H., Ugai H., Yatsuzuka N., Tanaka Y., Furihata K., Maas B. M., Wickremasingha P. K., Duncan K. E., Iwamoto M., Stoch S. A., Uemura N. A phase I, randomized, placebo-controlled study of molnupiravir in healthy Japanese to support special approval in Japan to treat COVID-19. *Clinical and Translational Science.* 2022;15(11):2697–2708. DOI: 10.1111/cts.13395.
8. Shipaeva E. V., Filon O. V., Zintchenko A. V., Shipunov G. A., Dmitrieva A. A., Lemak M. S., Grishin S. A., Trofimets E. I., Kryshen K. L., Kozlovskaya L. I., Lunin A. S., Apolokhov V. D., Barbashov S. F., Lavrovsky Y. V., Samsonov M. Yu. Preclinical studies of antiviral activity of the RPH-137 fusion protein and molnupiravir against COVID-19. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):414–434. (In Russ.) DOI: 10.30895/2221-996X-2022-22-4-414-434.
9. Vangeela L., Chiu W., Jonghe S. D, Maes P., Slechten B., Raymenants J., André E., Leyssen P., Neytsa J., Jochmans D. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *Antiviral Research*. 2022;(198):105252. DOI:10.1016/j.antiviral.2022.105252.
10. Tian L., Pang Z., Li M., Lou F., An X., Zhu S., Song L., Tong Y., Fan H., Fan J. Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19. *Frontiers in Immunology.* 2022;13:855496. DOI: 10.3389/fimmu.2022.855496.
11. Shiraki K., Sato N., Sakai K., Matsumoto S., Kaszynski R. H., Takemoto M. Antiviral therapy for COVID-19: Derivation of optimal strategy based on past antiviral and favipiravir experiences. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;235:108121. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108121.
12. Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Y., Bely P. A. Simultaneous Determination of Major Molnupiravir Metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) and Favipiravir in Human Plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration.* 2023;12(1):215–226. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.
13. Smolyanova T. I., Bagaeva N. S., Kolganova M. A., Shohin I. E., Nikolaeva A. M., Vyaznikova T. V., Pankratova A. A., Bykova E. A. Phase I Pharmacokinetics Study of Drug «COVID-globulin» (Specific Human Immunoglobulin Against COVID-19). *Drug development & registration*. 2022;11(2):180–186. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-180-186.
14. Komarov T. N., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Y., Bely P. A. Phase I Pharmacokinetics Study of Drug for Infusion «Areplivir» (INN: Favipiravir) (LLC «PROMOMED RUS», Russia). *Drug development & registration*. 2023;12(2):146–153. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-146-153.
15. Painter W. P., Holman W., Bush J. A., Almazedi F., Malik H., Eraut N. C. J. E., Morin M. J., Szewczyk L. J., Painter G. R. Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity Against SARS-CoV-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021;65(5):02428-20. DOI: 10.1128/AAC.02428-20.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1684
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики количественного определения апиксабана в плазме крови с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС

У. Д. Филонова[1, 2]✉, П. К. Карнакова[1], К. К. Карнакова[1], М. О. Попова[1], А. А. Попова[1], О. А. Арчакова[1], Т. Н. Комаров[1, 3], И. Е. Шохин[1, 2]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31
[3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН), 117198,Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ **Контактное лицо:** Филонова Ульяна Денисовна. **E-mail:** u.filonova@cpha.ru

ORCID: У. Д. Филонова – https://orcid.org/0009-0009-7266-3296; П. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777;
К. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231; М. О. Попова – https://orcid.org/0009-0008-1688-1902;
А. А. Попова – https://orcid.org/0000-0002-3874-8626; О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060;
Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 22.12.2023 **Статья принята в печать:** 19.02.2024 **Статья опубликована:** 20.02.2024

Резюме

Введение. Апиксабан – антикоагулянт, применяющийся при ряде тромбоэмболических заболеваний и обладающий улучшенным соотношением пользы от приема препарата и рисков развития кровотечения согласно многочисленным клиническим исследованиям. В связи с назначением апиксабана в качестве антитромботической терапии пациентам с COVID-19 наблюдается рост его применения. Таким образом, из-за большого распространения апиксабана и необходимости проведения фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности препаратов апиксабана важно разработать и валидировать простую и чувствительную методику количественного определения апиксабана в плазме крови.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения апиксабана в плазме крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для последующего проведения фармакокинетического исследования.

Материалы и методы. Определение апиксабана в плазме крови человека проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС, используя ривароксабан как внутренний стандарт. Пробоподготовка проводилась путем осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А); 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Время анализа: 3,00 мин. Колонка: Shim-pack Velox Biphenyl; 2,7 мкм; 50 × 2,1 мм. Источник ионизации: электроспрей с положительным режимом ионизации. MRM-переходы: 460,15 → 443,10 m/z (апиксабан); 436,05 → 144,95 m/z (ривароксабан).

Результаты и обсуждение. Валидация проводилась согласно действующим требованиям ЕАЭС по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность и прецизионность, нижний предел количественного определения, пригодность стандартных образцов, эффект матрицы, степень извлечения, стабильность, перенос пробы, отсутствие влияния разбавления образцов. Результаты оценки всех параметров соответствовали установленным критериям приемлемости.

Заключение. Подтвержденный аналитический диапазон разработанной и валидированной методики составил 1,00–300,00 нг/мл в плазме крови. Методика определения апиксабана в плазме крови является простой и чувствительной. Данная методика была апробирована во время аналитической части исследования биоэквивалентности и может применяться для других фармакокинетических исследований препаратов апиксабана.

Ключевые слова: антикоагулянты, НОАК, апиксабан, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, COVID-19, фармакокинетика

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

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, П. К. Карнакова, У. Д. Филонова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики, а также в проведении аналитической части исследования. К. К. Карнакова проводила статистическую обработку данных. М. О. Попова, А. А. Попова отвечали за качество данных и организацию системы менеджмента качества. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Филонова У. Д., Карнакова П. К., Карнакова К. К., Попова М. О., Попова А. А., Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики количественного определения апиксабана в плазме крови с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):224–240. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1684

Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for Quantification of Apixaban in Human Plasma

Ulyana D. Filonova[1, 2]✉, Polina K. Karnakova[1], Kseniia K. Karnakova[1], Mariia O. Popova[1], Anna A. Popova[1], Olga A. Archakova[1], Timofey N. Komarov[1, 3], Igor E. Shohin[1, 2]

© Филонова У. Д., Карнакова П. К., Карнакова К. К., Попова М. О., Попова А. А., Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Шохин И. Е., 2024
© Filonova U. D., Karnakova P. K., Karnakova K. K., Popova M. O., Popova A. A., Archakova O. A., Komarov T. N., Shohin I. E., 2024

[1] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
[2] National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute). 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia
[3] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Ulyana D. Filonova. **E-mail:** u.filonova@cpha.ru

ORCID: Ulyana D. Filonova – https://orcid.org/0009-0009-7266-3296; Polina K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Kseniia K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231; Mariia O. Popova– https://orcid.org/0009-0008-1688-1902; Anna A. Popova – https://orcid.org/0000-0002-3874-8626; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 22.12.2023 **Revised:** 19.02.2024 **Published:** 20.02.2024

Abstract

Introduction. Apixaban is an anticoagulant used in a number of thromboembolic diseases with an improved benefit-to-risk ratio, according to multiple clinical studies. Due to the prescription of apixaban as antithrombotic therapy in patients with COVID-19, an increase in its use has been observed. Thus, due to the widespread use of apixaban and the need to conduct pharmacokinetic and bioequivalence studies of the drug, it is important to develop and validate a simple and sensitive method for the quantitative determination of apixaban in human blood plasma.

Aim. The aim of the study is to develop and validate a method for the determination of apixaban in human blood plasma using high-performance liquid chromatography with tandem mass selective detection (HPLC-MS/MS) for the subsequent bioanalytical study.

Materials and methods. The determination of apixaban in human plasma was carried out by HPLC-MS/MS with rivaroxaban as an internal standard. The method of protein precipitation with acetonitrile was used as sample preparation. Mobile phase: 0.1 % solution of formic acid in water (eluent A); 0.1 % solution of formic acid in acetonitrile (eluent B). The total run time was 3.00 min. Column: Shim-pack Velox Biphenyl; 2.7 μm; 50 × 2.1 mm. Ionization source: electrospray with positive ionization mode. MRM transitions: 460.15 → 443.10 m/z (apixaban); 436.05 → 144.95 m/z (rivaroxaban).

Results and discussion. The developed method was validated in accordance with the EAEU requirements for the following parameters: selectivity, calibration curve, accuracy and precision, lower limit of quantitation, suitability of standard samples, matrix effect, recovery, stability, carry-over, dilution effects. The parameters met the acceptance criteria.

Conclusion. The confirmed analytical range of the developed and validated method was 1.00–300.00 ng/mL in blood plasma. The method for determining apixaban in blood plasma is simple and sensitive. This method was tested during the analytical part of the bioanalytical study and can be used to conduct other pharmacokinetic studies of apixaban drugs.

Keywords: anticoagulants, DOAC, apixaban, HPLC-MS/MS, validation, COVID-19, pharmacokinetics

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

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Polina K. Karnakova, Ulyana D. Filonova have participated in the development and validation of the bioanalytical method, as well as in conducting the analytical part of the study. Kseniia K. Karnakova carried out statistical processing of the data. Maria O. Popova, Anna A. Popova were responsible for data quality and organization of the quality management system. Igor E. Shohin was responsible for the organizational part of the study. All of the above authors participated in the discussion of the results obtained in the form of a scientific discussion.

For citation: Filonova U. D., Karnakova P. K., Karnakova K. K., Popova M. O., Popova A. A., Archakova O. A., Komarov T. N., Shohin I. E. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for quantification of apixaban in human plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(1):224–240. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1684

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в клинической практике широко используются *антикоагулянты* – препараты, блокирующие реакции плазменного гемостаза. Варфарин и другие антагонисты витамина К являются высокоэффективными оральными антикоагулянтами, но их применение ограничено узким терапевтическим окном, взаимодействием с другими лекарственными средствами и пищей, а также необходимостью постоянного лабораторного контроля и мониторинга расчетного показателя международного нормализованного отношения [1, 2]. Для преодоления данных ограничений с 2004 года началась разработка новых оральных антикоагулянтов (НОАК): апиксабана, ривароксабана, дабигатрана этексилата и эдоксабана [3]. Данные препараты не уступают по эффективности варфарину, снижают общую смертность, обладают высокой безопасностью, а также позволяют пациентам принимать фиксированные дозы без рутинного терапевтического мониторинга [2, 4, 5].

Несмотря на то что варфарин, зарегистрированный в Российской Федерации в 2001 году, до сих пор остается наиболее часто используемым антикоагулянтом и достаточно широко представлен на фармацевтическом рынке [6], в последнее время НОАК также получили большое распространение в РФ, наблюдается рост их назначений пациентам. На отечественном фармацевтическом рынке по итогам 2018 года лидирующее положение среди НОАК занял ривароксабан, тем не менее, учитывая динамику роста продаж апиксабана, ожидается, что в ближайшее время данный препарат может подняться на первое место [7].

Согласно данным фармакоэкономического анализа, проведенного в 2022 году, применение апиксабана для профилактики развития ишемического инсульта или системной эмболии у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий по сравнению с другими НОАК является экономически более выгодным и требует меньших затрат от системы здравоохранения [8]. Применение апиксабана также имеет большую актуальность в связи с его назначением пациентам с диагностированной коронавирусной инфекцией [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)], вызываемой вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) [9]. Несмотря на то что вирус SARS-CoV-2 в первую очередь поражает дыхательную систему, у многих пациентов данный вирус вызывает сердечно-сосудистые повреждения и гиперкоагуляцию, проявляющуюся в большинстве случаев венозной тромбоэмболией, включая легочную эмболию (ЛЭ) и тромбоз глубоких вен (ТГВ) [10]. НОАК включены в руководство ВОЗ «Клиническое ведение COVID-19: Руководящие рекомендации» («Clinical management of COVID-19: Living guideline»)[1], а также в методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции[2] в качестве антитромботической терапии. Согласно имеющимся данным, назначение антикоагулянтной терапии пациентам с COVID-19 улучшает клинические исходы и благоприятно влияет на течение болезни [11–13].

Апиксабан (1-(4-метоксифенил)-7-оксо-6-(4-(2-оксопиперидин-1-ил)фенил)-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-пиразоло[3,4-с]пиридин-3-карбоксамид) представляет собой структурно новый нейтральный бициклический пиразол. Он является прямым ингибитором фактора Ха, который ингибирует как свободный, так и связанный фактор Ха и не требует наличия антитромбина III для проявления антитромботической активности. Ингибируя фактор Ха, апиксабан снижает образование тромбина и развитие тромбов, не оказывая прямого влияния на агрегацию тромбоцитов, но косвенно ингибируя агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином [14, 15].

Апиксабан одобрен во многих странах для клинического применения при ряде тромбоэмболических заболеваний, применяется для снижения риска инсульта при неклапанной фибрилляции предсердий, тромбопрофилактики после замены тазобедренного или коленного сустава, лечения ТГВ или ЛЭ [16]. Результаты ключевых клинических исследований продемонстрировали, что апиксабан является важной альтернативой существующим антикоагулянтным препаратам, таким как антагонисты витамина К, к которым относится варфарин, и низкомолекулярные гепарины, с улучшенным соотношением пользы от приема препарата и рисков развития кровотечения [16–18].

Таким образом, апиксабан является современным препаратом с высокой эффективностью и доказанной безопасностью [19–23]. В связи с этим для проведения аналитической части фармакокинетических исследований и исследований биоэквивалентности препаратов апиксабана важно разработать и валидировать такую методику количественного определения апиксабана в плазме крови, которая соответствовала бы всем нашим требованиям.

В данной статье приводится разработка и валидация новой чувствительной и быстрой методики количественного определения апиксабана в плазме крови человека с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС с использованием градиентного режима элюирования. Данная методика отличается не только короткой продолжительностью анализа и высокой чувствительностью, но также имеет наиболее простой способ пробоподготовки, обеспечивающий оптимальное извлечение действующего вещества, и легкодоступный внутренний стандарт.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В ходе проведения исследования были использованы следующие реактивы: метанол (класс «HPLC gradient grade», ООО ТД «ХИММЕД», Россия), ацетонитрил (класс «HPLC-S Gradient Grade», Biosolve Chimie, Франция; класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия), муравьиная кислота (класс «99–100 %», VWR Chemicals, Франция), вода деминерализованная I класса (система очистки воды (деминерализатор), Hydrolab R5, Польша).

Исходные и рабочие растворы

Исходный стандартный раствор (ИСР) апиксабана готовили, растворяя навеску субстанции стандартного образца (СО) апиксабана (SynZeal Research Private Limited, Индия, количественное содержание 100,00 %) в метаноле до получения в растворе концентрации, составляющей 100 000,00 нг/мл. Рабочие стандартные растворы (РСР) апиксабана готовили разведением ИСР метанолом, достигая необходимых концентраций, соответствующих калибровочным уровням № 1–8 и уровням контроля качества (таблица 1). РСР внутреннего стандарта (ВС [internal standard, IS]) ривароксабана готовили, растворяя навеску субстанции СО ривароксабана (KINSY, S.L., Испания, количествен-

[1] Clinical management of COVID-19: living guideline, 18 August 2023. Geneva: World Health Organization; 2023 (WHO/2019-nCoV/clinical/2023.2). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Доступно по: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2023.2. Ссылка активна на 20.12.2023.

[2] Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 18 (26.10.2023). Доступно по: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/064/610/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V18.pdf. Ссылка активна на 20.12.2023.

ное содержание 100,00 %) в ацетонитриле до достижения в растворе концентрации 100 000,00 нг/мл. ИСР и РСР апиксабана и ривароксабана, а также образцы интактной плазмы крови хранились в морозильной камере при температуре – 42,5 ± 7,5 °С.

Таблица 1. Концентрации апиксабана и ривароксабана в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 1. Concentrations of apixaban at calibration levels and quality control samples

Калибровочные образцы Calibration levels		Концентрация апиксабана, нг/мл Apixaban concentration, ng/mL	Концентрация ривароксабана, нг/мл Rivaroxaban concentration, ng/mL
1		1,00	7500,00
2		10,00	7500,00
3		50,00	7500,00
4		100,00	7500,00
5		150,00	7500,00
6		200,00	7500,00
7		250,00	7500,00
8		300,00	7500,00
Образцы контроля качества Quality control samples			
LLOQ	Нижний предел количественного определения (НПКО) Lower limit of quantification (LLOQ)	1,00	7500,00
L	Низкий Low	3,00	7500,00
M1	Средний 1 Middle 1	75,00	7500,00
M2	Средний 2 Middle 2	180,00	7500,00
H	Высокий High	240,00	7500,00

Пробоподготовка

Схема пробоподготовки представлена на рисунке 1. При ее проведении использовались центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, хроматографические виалы, которые по окончании пробоподготовки помещались в автосамплер хроматографа.

Хроматографическое разделение и детектирование

Для хроматографического разделения был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera XR (Shimadzu Corporation, Япония). Для масс-спектрометрического детектирования использовался тандемный масс-селективный детектор с тройным квадруполем LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Хроматограф был оборудован градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, устройством автоматической подачи образцов в автосамплер, краном переключения линии потока высокого давления. Первичные данные были обработаны с помощью программного обеспечения LabSolutions ver. 5.91 (Shimadzu Corporation, Япония).

Для хроматографического разделения использовалась колонка Shim-pack Velox Biphenyl, 2,7 мкм, 50 × 2,1 мм и предколонка Velox EXP Guard Biphenyl, 2,7 мкм, 2,1 × 5,0 мм. В термостате колонок поддерживалась температура на уровне 40 °С. Был выбран градиентный режим элюирования. В качестве подвижной фазы были использованы следующие элюенты:

- Элюент А: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему).
- Элюент В: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).

Градиент по составу подвижной фазы и скорость ее потока приведены в таблице 2.

Таблица 2. Состав подвижной фазы и скорость потока

Table 2. Mobile phase composition and flow rate

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока, мл/мин Flow rate, mL/min
0,00	80,00	20,00	1,00
0,45	20,00	80,00	
1,10	13,00	87,00	
1,20	0,00	100,00	
1,60	0,00	100,00	
1,61	80,00	20,00	
3,00	80,00	20,00	

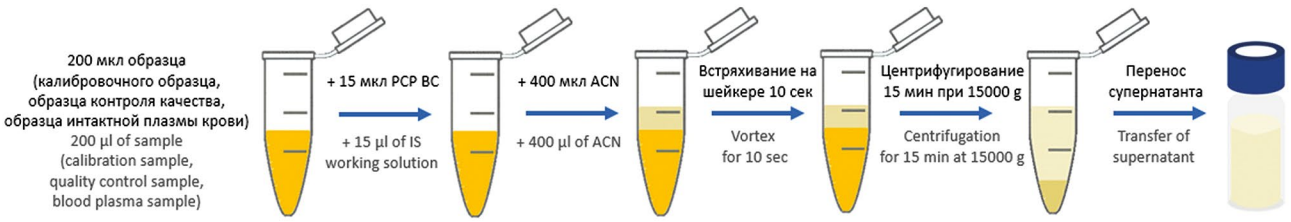


Рисунок 1. Схема пробоподготовки

Figure 1. Sample preparation

Объем вводимой пробы составил 10 мкл. Общее время регистрации хроматограммы: 0,00–3,00 мин. Время удерживания апиксабана составило около 0,9 мин, время удерживания ривароксабана – около 0,9 мин.

Для масс-спектрометрического детектирования был выбран источник ионизации электроспрей (electrospray ionization, ESI). Ионизация проводилась в положительном режиме. Детектирование проводилось путем мониторинга MRM-переходов (Multiple-Reaction Monitoring). Были подобраны следующие MRM-переходы: 460,15 → 443,10 m/z (апиксабан), 436,05 → 144,95 m/z (ривароксабан). Параметры источника ионизации: осушающий газ 20 л/мин, распыляющий газ 3 л/мин, линия десольватации 250 °C, блок нагрева 400 °C, напряжение на игле ESI +4,9 кВ.

Валидация аналитической методики

Для валидации биоаналитической методики за основу были взяты правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза[1], а также руководств EMA[2] и FDA[3], которые включали рассмотренные далее валидационные параметры.

Селективность

Было проанализировано по шесть образцов интактной плазмы крови (ИПК), гиперлипидемической интактной плазмы крови (ГЛИПК), гемолизной интактной плазмы крови (ГИПК). Также были проанализированы образцы на уровне LLOQ для ИПК, ГЛИПК и ГИПК. Сигнал аналита и ВС не должен превышать 20 % от сигнала аналита на уровне LLOQ и 5 % от сигнала ВС.

Калибровочная кривая

Калибровочная кривая включала уровни № 1–8 в аналитическом диапазоне концентраций 1,00–300,00 нг/мл (см. таблицу 1). Величины относительной погрешности (E, %) для оценки точности должны находиться в диапазоне значений от –20 до 20 % для концентрации на уровне LLOQ и от –15 до 15 % для остальных точек. Данному критерию приемлемости должны соответствовать не менее 75 % калибровочных образцов в не менее чем шести различных концентрациях.

Точность и прецизионность

Был проведен анализ образцов плазмы крови, соответствующих уровням LLOQ, L, M1, M2, H (см. таблицу 1). Анализ проводился в рамках пяти последовательных циклов по пять вводов образца для каждого уровня концентраций аналита. Исследование проводилось в течение первой – пятой последовательностей, как внутри, так и между циклами.

Рассчитанные значения относительной погрешности (E, %) для оценки точности должны находиться в пределах от –20 до 20 % для концентрации на уровне LLOQ и от –15 до 15 % для остальных точек. Для оценки прецизионности RSD не должно превышать 20 % для концентрации на уровне LLOQ, 15 % для концентраций остальных точек.

Нижний предел количественного определения

На основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности оценивался нижний предел количественного определения методики как минимальная концентрация аналита в плазме крови, которую можно количественно определить в аналитическом диапазоне со значениями RSD и E, не превышающими 20%.

Пригодность СО

Проводили анализ образцов ИПК с добавлением раствора ВС без аналита, для которых сигнал аналита не должен превышать 20 % от сигнала LLOQ, и образца ИПК с добавлением рабочего раствора аналита № 8 без ВС, для которого сигнал ВС не должен превышать 5 % от сигнала ВС. Также были проанализированы образцы на уровне LLOQ.

Эффект матрицы

Анализировали по шесть образцов с добавлением рабочих стандартных растворов аналита и стандартного раствора ВС без влияния биологической матрицы и по шесть образцов, приготовленных на ИПК, ГЛИПК и ГИПК, не учитывая влияние степени извлечения анализируемых веществ и ВС.

Степень извлечения

Было проанализировано по три образца для уровней L, M1, M2 и H, приготовленных из ИПК, ГИПК и ГЛИПК без влияния степени извлечения и по три соответствующих образца с учетом влияния степени извлечения. RSD степени извлечения аналита из биологических матриц не должно превышать 15 %.

[1] Совет Евразийской экономической комиссии решение от 3 ноября 2016 года № 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 20.12.2023.

[2] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/ Accessed: 20.12.2023.

[3] Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/ Accessed: 20.12.2023.

Стабильность

Было проанализировано по пять образцов для оценки каждого вида стабильности на уровнях L и H. Полученные величины относительной погрешности должны укладываться в диапазон значений от –15 до 15 %.

Перенос пробы

Последовательно анализировались калибровочный образец № 8 с максимальной концентрацией и образцы интактной плазмы крови. Сигнал аналита в образцах интактной плазмы крови не должен превышать 20 % от сигнала на уровне LLOQ, сигнал ВС образца не должен превышать 5 % от сигнала ВС.

Отсутствие влияния разбавления образцов

Были проанализированы образцы плазмы крови с разбавлением в два раза интактной плазмой крови до получения концентраций, соответствующих уровням L и H. Для полученных значений концентраций величины RSD и E не должны превышать 15 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Обзор литературных данных показывает, что существует несколько методов определения апиксабана с использованием предпочтительно высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], а также с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-ДМД) [high performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD)], высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography with UV-detection (HPLC-UV)] и сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS)] (таблица 3).

В качестве пробоподготовки для улучшения экстракции аналита из биологических матриц часто использовали трудозатратные способы, такие как твердофазная экстракция (ТФЭ) [26, 29] и жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) [27], при этом данные методики обладали достаточно низкой чувствительностью. В некоторых методиках использовали более быстрый и простой способ пробоподготовки с помощью осаждения белков плазмы крови различными органическими растворителями, метанолом или ацетонитрилом (см. таблицу 3) [9, 24, 25, 28].

По результатам проведенного анализа методик количественного определения апиксабана, представленных в литературных источниках, мы не обнаружили методик одновременно с простым способом пробоподготовки с помощью осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом и высокой чувствительностью, а также коротким временем анализа и доступным внутренним стандартом. На основании этого был сделан вывод о необходимости самостоятельной разработки и валидации методики, отвечающей данным требованиям.

Предпочтительным методом исследования был выбран ВЭЖХ-МС/МС, как один из наиболее чувствительных и селективных методов количественного определения апиксабана в плазме крови человека. В качестве ВС для апиксабана был выбран ривароксабан. Данное вещество имеет схожую с апиксабаном химическую структуру (рисунок 2) и близкие физико-химические характеристики (таблица 4).

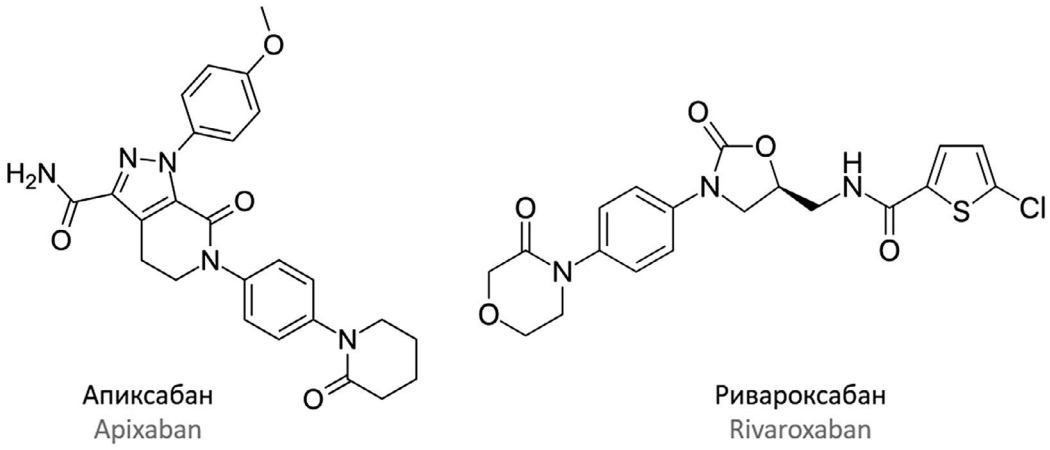


Рисунок 2. Молекулярная формула апиксабана и ривароксабана

Figure 2. Molecular formulas of apixaban and rivaroxaban

Таблица 3. **Биоаналитические методики количественного определения апиксабана**

Table 3. **Bioanalytical methods of quantitative determination of apixaban**

Аналитический метод Analytical method	**Источник ионизации; ионизация (+/-), если применимо** Ionization source; ionization (+/-) if applicable	**Анализируемый образец** Analysed sample	**Пробоподготовка** Sample preparation	**Внутренний стандарт** Internal standard	**Аналитический диапазон** Analytical range	**Время анализа, мин** Time of analysis, min	**Ссылка** Reference
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	Карбамазепин Carbamazepine	3,00–1000,00 нг/мл 3.00–1000.00 ng/mL	5,5	[9]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков метанолом Protein precipitation with methanol	Апиксабан-d3 Apixaban-d3	1,00–500,00 нг/мл 1.00–500.00 ng/mL	3	[24]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Сыворотка крови человека Human serum	Осаждение белков метанолом Protein precipitation with methanol	Прометазин Promethazine	1,00–1000,00 нг/мл 1.00–1000.00 ng/mL	4,5	[25]
ВЭЖХ-ДМД HPLC-DAD	–	Плазма человека Human plasma	ТФЭ Solid phase extraction	Хлорамфеникол Chloramphenicol	17,00–5280,00 нг/мл 17.00–5280.00 ng/mL	6	[26]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	–	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	Ривароксабан Rivaroxaban	10,00–500,00 нг/мл 10.00–500.00 ng/mL	7,6	[27]
СВЭЖХ-МС/МС UHPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков ацетонитрилом с 1%-й муравьиной кислотой Protein precipitation with acetonitrile with 1 % formic acid	Apixaban-$^{13}Cd_7$	5,00–800,00 нмоль/л 5.00–800.00 nmol/L	3	[28]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Электроспрей; + Electrospray; +	Плазма человека Human plasma	ТФЭ Solid phase extraction	Apixaban-$^{13}CD_3$	1,00–500,00 нг/мл 1.00–500.00 ng/mL	70	[29]

Таблица 4. Физико-химические свойства апиксабана и ривароксабана

Table 4. Chemical and physical characteristics of apixaban and rivaroxaban

	pKa	logP	Молекулярная масса Molecular weight
Апиксабан[1] Apixaban[1]	13,07	2,22	459,497
Ривароксабан[2] Rivaroxaban[2]	13,60	1,74	435,881

Примечание. [1] Apixaban. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB06605. Accessed: 20.12.2023.
[2] Rivaroxaban. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB06228. Accessed: 20.12.2023.

Note. [1] Apixaban. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB06605. Accessed: 20.12.2023.
[2] Rivaroxaban. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB06228. Accessed: 20.12.2023.

При разработке методики были подобраны такие условия масс-спектрометрического детектирования, которые позволяют получить пики апиксабана и ривароксабана с наибольшей интенсивностью. Был проведен анализ дочерних ионов, получаемых при различных энергиях соударения. Для каждого из веществ было получено несколько MRM-переходов, далее были выбраны наиболее интенсивные MRM-переходы: 460,15 → 443,10 m/z (апиксабан); 436,05 → 144,95 m/z (ривароксабан). Наибольшая интенсивность была получена при напряжении на игле ESI +4,9 кВ. Автооптимизация и подбор напряжений на линии десольватации и предварительном квадруполе Q-array помогли повысить интенсивность сигналов в несколько раз.

Использовались условия хроматографического разделения, позволяющие получить пики апиксабана и ривароксабана с оптимальными хроматографическими параметрами. Для хроматографического разделения была выбрана колонка Shim-pack Velox Biphenyl (2,7 мкм; 50 × 2,1 мм). В качестве элюентов подвижной фазы были выбраны 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А, по объему) и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В, по объему). Благодаря выбранному градиенту подвижной фазы и скорости потока удалось добиться формы пиков, приближенной к форме гауссовой кривой.

Для экстракции апиксабана из плазмы крови был выбран наиболее простой способ пробоподготовки: осаждение белков плазмы крови ацетонитрилом в соотношении 1:2. Выбор ацетонитрила в качестве осадителя обоснован тем, что при его использовании удается достичь наиболее полного осаждения белков плазмы крови и получить оптимальную форму хроматографических пиков. Также ацетонитрил в качестве осадителя имеет преимущество перед метанолом, так как при его использовании не требуются особенные условия хранения проб в автосамплере хроматографа, что позволяет увеличить срок «постпрепаративной» стабильности.

Валидация методики

Селективность

Сигналы апиксабана и ривароксабана на образцах плазмы крови не превышали 20 % от сигнала LLOQ и 5 % от сигнала ВС, что соответствует критериям приемлемости. На рисунке 3 представлена хроматограмма образца интактной плазмы крови человека.

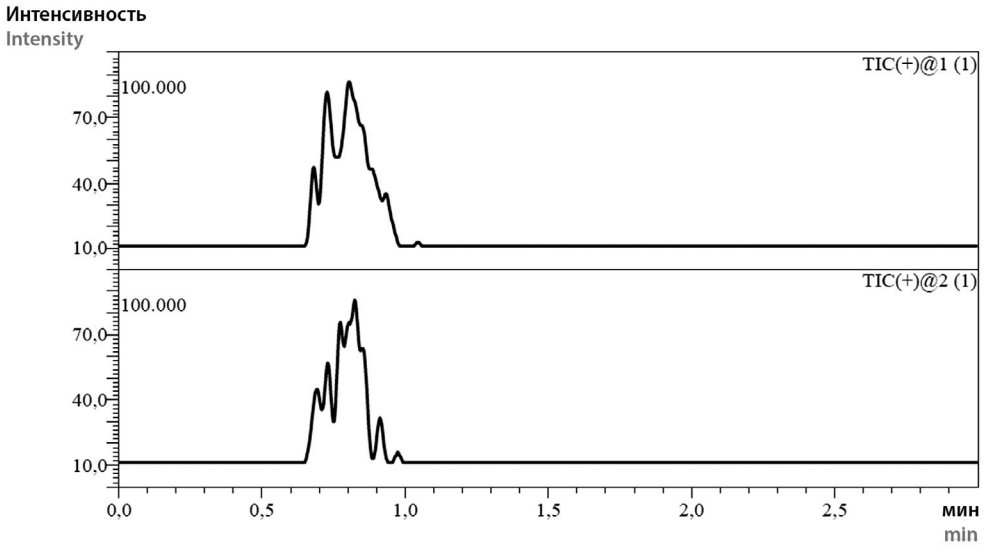


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 3. Chromatogram of blank human plasma sample

Калибровочная кривая

На основе полученных данных были построены графики калибровочных кривых в координатах «отношение площади пика апиксабана к площади пика ривароксабана» и «отношение концентрации апиксабана к концентрации ривароксабана в плазме крови». Все калибровочные графики имели линейный вид. Калибровочный график одного из циклов приведен на рисунке 4. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции (*r*) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–5 приведены в таблице 5. Полученные коэффициенты корреляции соответствовали критериям приемлемости и составляли более 0,99. Хроматограмма калибровочного образца на уровне 8 (см. таблицу 1) представлена на рисунке 5.

Таблица 5. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции

Table 5. Calibration equation and correlation coefficients

Цикл Cycle	**Уравнение калибровочной кривой** Calibration equation	**Коэффициент корреляции (*r*)** Correlation coefficient (*r*)
1	$y = 54{,}0977 \cdot x + 0{,}00293715$	0,9983996
2	$y = 54{,}0349 \cdot x + 0{,}00257416$	0,9990636
3	$y = 53{,}3817 \cdot x + 0{,}00257242$	0,9985084
4	$y = 44{,}1182 \cdot x + 0{,}000185783$	0,9978233
5	$y = 39{,}1754 \cdot x + 0{,}00152476$	0,9966636

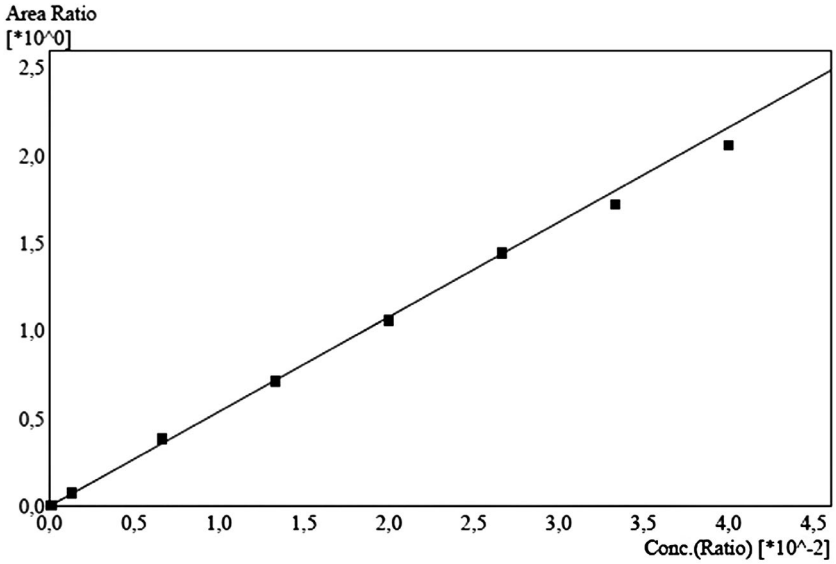


Рисунок 4. Калибровочный график

Figure 4. Calibration curve

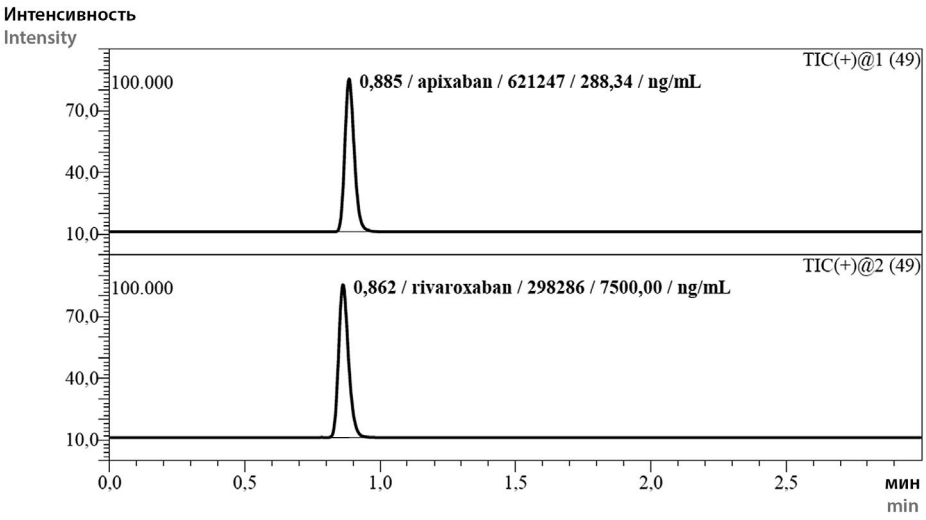


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови на уровне 8

Figure 5. Chromatogram of plasma sample at level 8

Точность и прецизионность

Рассчитанные значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности для оценки прецизионности и точности соответствуют критериям приемлемости. Данные о точности и прецизионности между валидационными циклами № 1–5 представлены в таблице 6.

Таблица 6. Точность и прецизионность между циклами № 1–5 (*n* = 25)

Table 6. Intra-day accuracy and precision in cycles № 1–5 (*n* = 25)

Образец Sample	**Введено (нг/мл)** Injected (ng/mL)	**Среднее** Average	**RSD, %**	**E, %**
LLOQ	1,00	0,97	12,39	–3,44
L	3,00	2,96	7,02	–1,31
M1	75,00	75,78	5,33	1,05
M2	180,00	185,02	8,61	2,79
H	240,00	240,20	6,99	0,08

Нижний предел количественного определения

На рисунке 6 приведена хроматограмма плазмы крови с содержанием апиксабана на уровне нижнего предела количественного определения, который составил 1,00 нг/мл.

Пригодность СО

На проанализированном образце, приготовленном без добавления раствора аналита, сигнал апиксабана не превышал 20 % от сигнала LLOQ. На образце, приготовленном без ВС, сигнал ривароксабана не превышал 5 % от сигнала ВС. Подтверждено отсутствие влияния внутреннего стандарта и его примесей на анализируемое вещество.

Эффект матрицы

Была проведена оценка эффекта матрицы на уровнях L и H. Результаты этой оценки приведены в таблице 7. Для ВС ривароксабана влияние матрицы

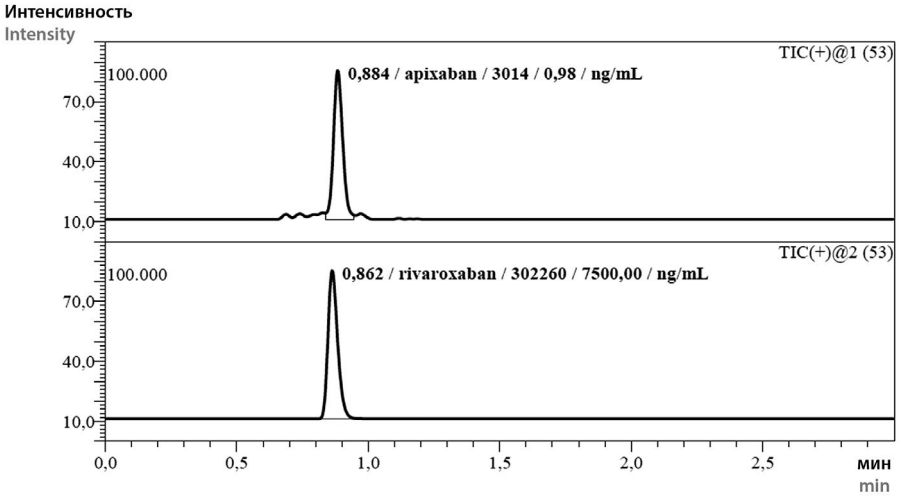


Рисунок 6. Хроматограмма образца плазмы крови на уровне НПКО

Figure 6. Chromatogram of LLOQ plasma sample

Таблица 7. Расчет фактора матрицы, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 7. Calculation of IS-normalized matrix factors

Уровень Level	**L**			**H**		
Биологическая матрица Biological matrix	**ИПК** Blank blood plasma	**ГИПК** Hemolyzed blank blood plasma	**ГЛИПК** Hyperlipidemic blank blood plasma	**ИПК** Blank blood plasma	**ГИПК** Hemolyzed blank blood plasma	**ГЛИПК** Hyperlipidemic blank blood plasma
Нормализованный Mf Normalized Mf	0,90	0,86	0,91	0,87	0,79	0,83
	0,76	0,82	0,80	0,88	0,82	0,79
	0,85	1,01	0,94	0,84	0,84	0,83
	0,75	0,77	0,75	0,76	0,82	0,81
	0,74	0,71	0,80	0,82	0,82	0,81
	0,82	0,83	0,78	0,78	0,90	0,87
Среднее Average	0,82			0,83		
RSD, %	9,53			4,44		

было определено на уровне 7500,00 нг/мл. Для рассчитанных значений фактора матрицы, нормализованного по ВС, было определено RSD, величина которого не превысила 15 %.

Степень извлечения

Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения апиксабана составило 8,14 %, что не превышает 15 % и соответствует критериям приемлемости. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8. Оценка степени извлечения апиксабана

Table 8. Calculation of apixaban recovery

Образец Sample		Биологическая матрица Biological matrix		
		ИПК Blank blood plasma	ГИПК Hemolyzed blank blood plasma	ГЛИПК Hyperlipidemic blank blood plasma
Степень извлечения апиксабана, % Recovery of apixaban, %	L	108,38	99,19	90,80
		108,92	86,24	100,89
		102,84	82,13	89,64
	M1	73,05	91,58	92,09
		79,31	82,85	93,30
		83,68	80,99	96,79
	M2	90,54	86,92	96,79
		88,99	95,55	91,43
		91,68	94,44	94,38
	H	87,53	90,01	91,08
		87,54	89,04	95,25
		87,20	89,42	95,45
Среднее Average		91,28		
RSD, %		8,14		

Стабильность

Стабильность апиксабана оценивалась в различных условиях, результаты этой оценки представлены в таблице 9. Полученные величины относительной погрешности соответствуют критериям приемлемости.

Перенос пробы

На образцах интактной плазмы крови сигнал апиксабана не превышал 20 % от сигнала LLOQ, сигнал ВС не превышал 5 % от сигнала ВС. Результаты оценки переноса пробы представлены в таблице 10.

Отсутствие влияния разбавления образцов

Полученные величины RSD для оценки прецизионности и E для оценки точности соответствовали критериям приемлемости. При получении в рамках аналитического этапа концентраций апиксабана, превышающих значения высшего предела количественного определения, есть возможность разбавления образцов в 2 раза. Данные приведены в таблице 11.

Применение разработанной методики

Данная разработанная и валидированная методика может применяться для фармакокинетических исследований препаратов апиксабана. На основе данной методики был успешно проведен аналитический этап исследования биоэквивалентности нового отечественного препарата апиксабана. Пример хроматограммы образца плазмы крови добровольца, участвующего в данном исследовании, представлен на рисунке 7.

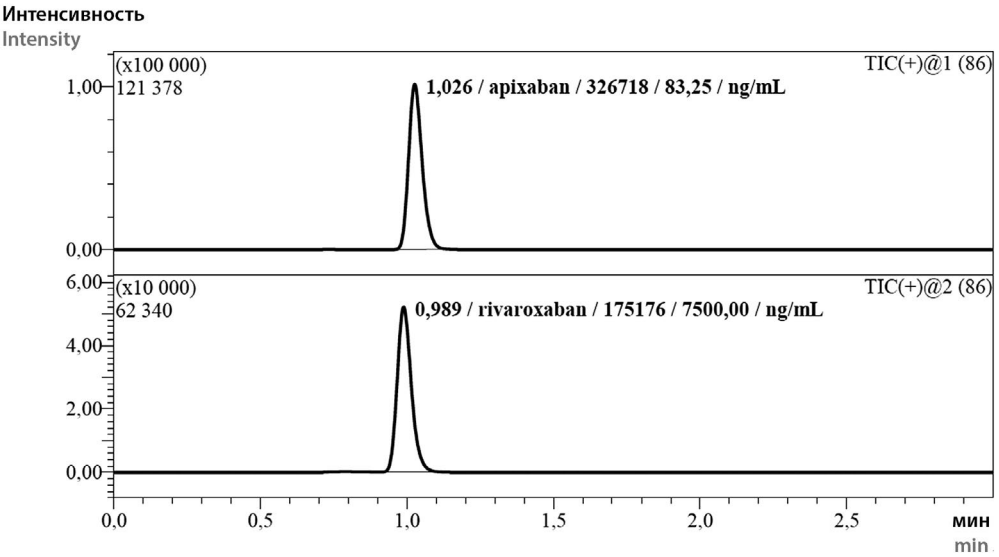


Рисунок 7. Хроматограмма образца плазмы крови добровольца

Figure 7. Chromatogram of volunteer plasma sample

Таблица 9. **Оценка стабильности апиксабана**

Table 9. **Stability assessment of apixaban**

Вид стабильности Type of stability		**«Настольная»** Bench-top	**«Постпрепаративная»** Postpreparative	**При пятикратной заморозке – разморозке** Freeze-thaw	**ИСР** Stock solution	**РСР** Work solution	**Долгосрочная 1** Long-term 1		**Долгосрочная 2** Long-term 2	
Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions		Анализируются свежеприготовленными; хранение при 20 ± 5 °C Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °C	Анализируются при хранении в автосамплере хроматографа не менее 31 часа при 5 ± 3 °C Analyzed stored in a chromatograph autosampler for at least 31 hours at 5 ± 3 °C	Анализируются после 5 циклов заморозки – разморозки: не менее 60 часов при –42,5 ± 7,5 °C (заморозка) и не менее 10 часов при 20 ± 5 °C (разморозка) Analyzed after 5 freeze-thaw cycles: at least 60 hours at –42,5 ± 7,5 °C (freeze) and at least 10 hours at 20 ± 5 °C (thaw)	Анализируются после хранения в течение 67 дней при –42,5 ± 7,5 °C Analyzed after storage for 67 days at –42,5 ± 7,5 °C		Анализируются на уровнях L и H при хранении в течение 67 дней Analyzed at levels L and H when stored for 67 days		Анализируются на уровнях L и H при хранении в течение 95 дней Analyzed at levels L and H when stored for 95 days	
							при –20 ± 5 °C at –20 ± 5 °C	при –75 ± 10 °C at –75 ± 10 °C	при –20 ± 5 °C at –20 ± 5 °C	при –75 ± 10 °C at –75 ± 10 °C
Среднее Average	L	2,74	2,79	3,22	3,41	3,40	3,40	3,41	3,07	2,70
	H	233,39	222,17	258,46	262,63	271,64	269,61	269,55	230,17	249,81
E, %	L	–8,60	–7,00	7,47	13,80	13,47	13,20	13,60	2,20	–9,87
	H	–2,75	–7,43	7,69	9,43	13,19	12,34	12,31	–4,10	4,09

Таблица 10. **Оценка переноса пробы**

Table 10. **Assessment of carry-over effect**

№	Образец Sample	Значение площади Area value		Отношение площадей, % Area ratio, %	
		Апиксабан Apixaban	Ривароксабан Rivaroxaban	Апиксабан Apixaban	Ривароксабан Rivaroxaban
1	НПКО LLOQ	2733	285441	–	–
	Интактная плазма крови Blank blood plasma	0	270	0,00	0,09
2	НПКО LLOQ	2356	252589	–	–
	Интактная плазма крови Blank blood plasma	0	0	0,00	0,00
3	НПКО LLOQ	2431	276251	–	–
	Интактная плазма крови Blank blood plasma	0	0	0,00	0,00

Таблица 11. **Оценка точности и прецизионности при разбавлении образцов**

Table 11. **Inter-day accuracy and precision of sample dilution**

Образец Sample	Введено (нг/мл) Injected (ng/mL)	Разведение Dilution	Среднее Average	SD, %	RSD, %	E, %
L	3,00	1:1	2,85	0,33	0,11	–5,19
H	240,00	1:1	212,93	2,59	0,01	–12,72

После приема исследуемого препарата и препарата сравнения были зарегистрированы индивидуальные профили изменения значений концентраций апиксабана в плазме крови человека во времени. Данные профили характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max}), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке *t* ($AUC_{(0-t)}$), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$).

Значения фармакокинетических параметров, включающие среднее арифметическое (Mean) и среднее геометрическое значения (Geom Mean), а также значения стандартных отклонений (SD) и коэффициентов вариации (CV, %) приведены в таблице 12.

Усредненные фармакокинетические профили во времени исследуемого препарата (Test) и препарата сравнения (Ref.) приведены на рисунках 8 и 9. Данные профили представлены в линейном и логлинейном преобразовании: на рисунке 8 без стандартных отклонений, на рисунке 9 со стандартными отклонениями.

Таблица 12. **Значения фармакокинетических параметров апиксабана**

Table 12. **Values of pharmacokinetic parameters of apixaban**

Фармакокинетические параметры Pharmacokinetic parameters	Исследуемый препарат Test drug				Препарат сравнения Reference drug			
	Mean	Geom Mean	SD	CV, %	Mean	Geom Mean	SD	CV, %
$AUC_{(0-t)}$, нг · ч/мл $AUC_{(0-t)}$, ng · h/mL	2190,19	2097,50	592,65	27,06	2065,97	1976,97	563,69	27,28
$AUC_{(0-\infty)}$, нг · ч/мл $AUC_{(0-\infty)}$, ng · h/mL	2220,23	2129,65	589,84	26,57	2107,05	2021,57	561,91	26,67
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/mL	265,35	254,48	71,82	27,07	235,82	226,40	63,40	26,89

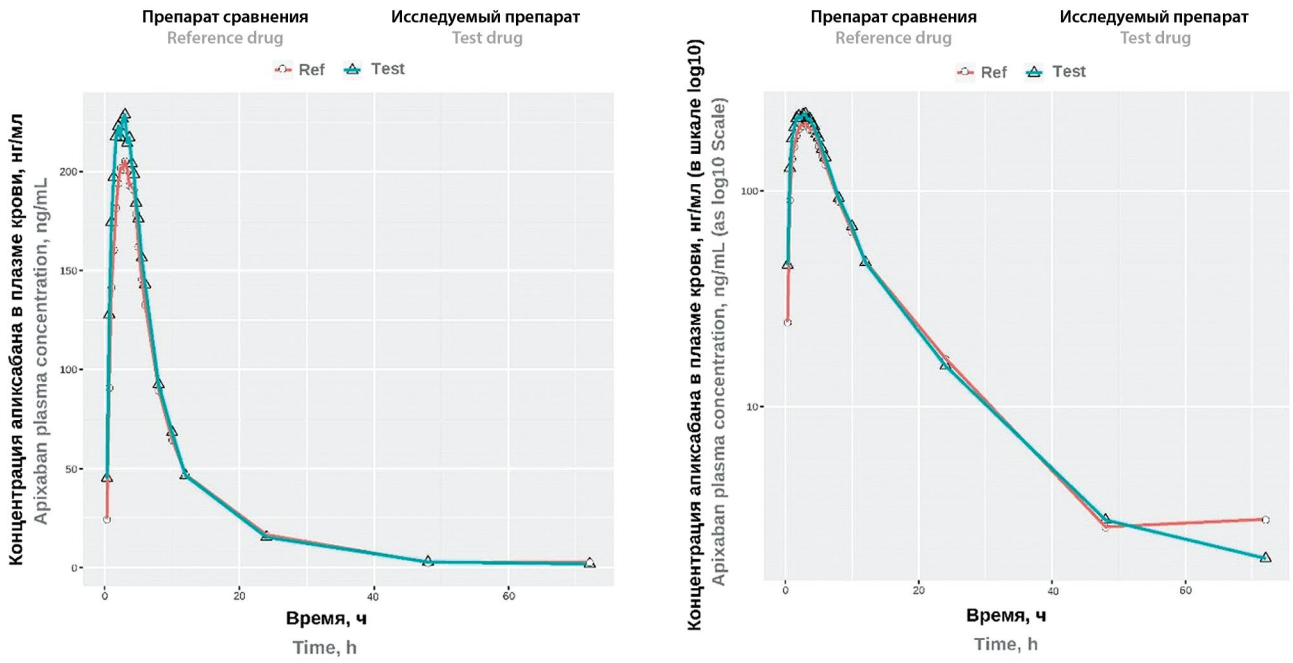


Рисунок 8. **Усредненные фармакокинетические профили апиксабана (в линейных и в логлинейных координатах)**

Figure 8. **Average pharmacokinetic profiles of apixaban (in linear and log-linear scale)**

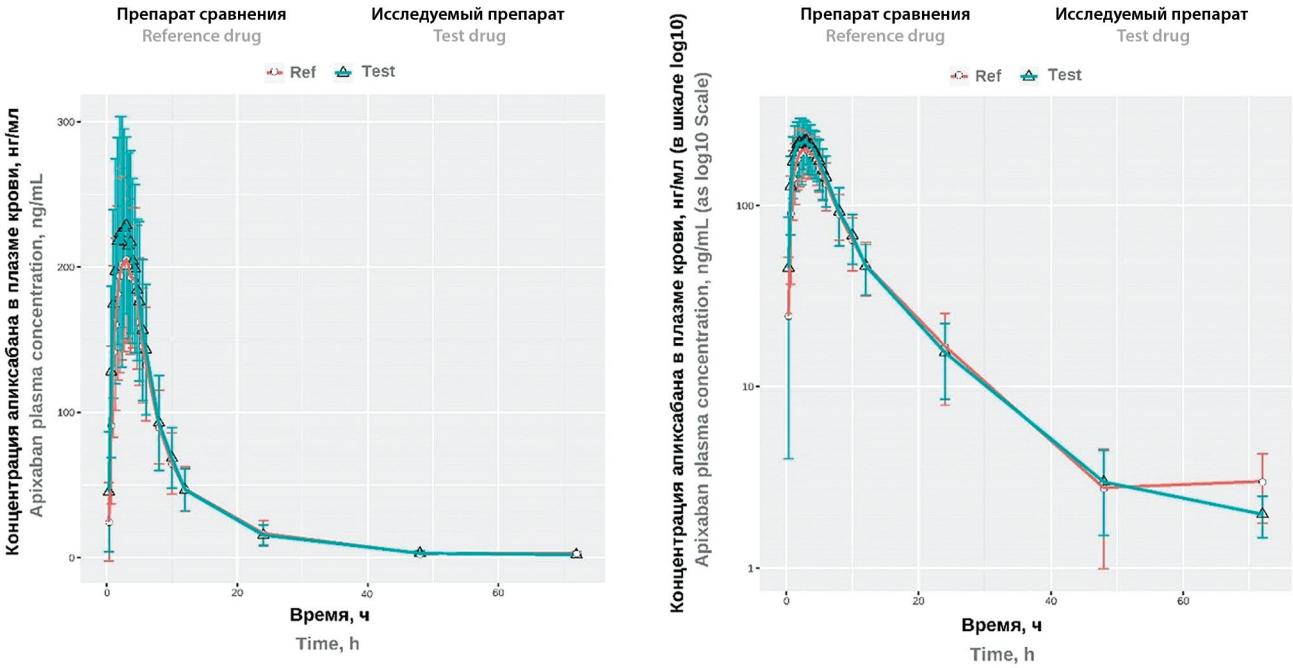


Рисунок 9. **Усредненные фармакокинетические профили апиксабана (в линейных и в логлинейных координатах со стандартными отклонениями)**

Figure 9. **Average pharmacokinetic profiles of apixaban (in linear and log-linear scale with standard deviations)**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована чувствительная методика количественного определения апиксабана в плазме крови человека с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС с подтвержденным аналитическим диапазоном 1,00–300,00 нг/мл. Данная методика отличается быстрым и простым способом пробоподготовки, коротким временем анализа, что значительно ускоряет проведение исследования, а также исполь-

зованием легкодоступного вещества в качестве внутреннего стандарта. Данная методика успешно прошла апробацию при проведении аналитической части исследования биоэквивалентности препарата апиксабана и может применяться для других фармакокинетических исследований препаратов апиксабана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева Н. М., Ткачева О. Н. Антикоагулянтная терапия у пожилых пациентов: дилемма выбора между эффективностью и безопасностью. *Медицинский алфавит*. 2018;2(16):6–14.
2. Панченко Е. П. Антитромботическая терапия ишемической болезни сердца: основы, проверенные временем. *Терапевтический архив*. 2019;91(6):19–24. DOI: 10.26442/00403660.2019.06.000296.
3. Бокарев И. Н., Кондратьева Т. Б. Новые оральные антикоагулянты в клинической практике. Эффективность и проблемы. *Клиническая медицина*. 2016;94(5):383–387. DOI: 10.18821/0023-2149-2016-94-5-383-387.
4. Van Rein N., Heide-Jørgensen U., Lijfering W. M., Dekkers O. M., Sørensen H. T., Cannegieter S. C. Major bleeding rates in atrial fibrillation patients on single, dual, or triple antithrombotic therapy: results from a Nationwide Danish Cohort Study. *Circulation*. 2019;139(6):775–786. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036248.
5. Cools F., Wollaert B., Vervoort G., Verstraete S., Voet J., Hermans K., Heyse A., De Wolf A., Hollanders G., Boussy T., Anné W., Vercammen J., Faes D., Beutels M., Mairesse G., Purnode Ph., Blankoff I., Vandergoten P., Capiau L., Allu J., Bassand J., Kayani G. Treatment patterns in anticoagulant therapy in patients with newly diagnosed atrial fibrillation in Belgium: results from the GARFIELD-AF registry. *Acta Cardiologica*. 2018;74(4):309–318. DOI: 10.1080/00015385.2018.1494089.
6. Мелехов А. В., Гендлин Г. Е., Дадашова Э. Ф., Алексеева Е. М., Заиграев И. А., Никитин И. Г. Динамика применения антитромботических препаратов у больных с фибрилляцией предсердий: собственные данные и обзор отечественных регистров. *Российский медицинский журнал*.2017;23(3):116–126. DOI: 10.18821/0869-2106-2017-23-3-116-126.
7. Груздева А. А., Хохлов А. Л., Ильин М. В. Оральные антикоагулянты в профилактике тромоэмболических осложнений у кардиологических пациентов: анализ применения в Российской Федерации. *Качественная клиническая практика*. 2020;1:69–79. DOI: 10.37489/2588-0519-2020-1-69-79.
8. Колбин А. С., Касимова А. Р., Гиляревский С. Р. Сравнительный фармакоэкономический анализ применения апиксабана, ривароксабана и дабигатрана для профилактики развития инсульта и эмболий в сосуды большого круга кровообращения у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий. *Качественная клиническая практика*. 2022;4:50–59. DOI: 10.37489/2588-0519-2022-4-50-59.
9. Dzudovic J., Sakac M. C., Antunovic M., Repic A., Obradovic S., Djordjevic S., Dzudovic B. Development and validation of LC-MS/MS method for determination of plasma apixaban. *Acta Chromatographica*. 2022;34(3):332–337. DOI: 10.1556/1326.2021.00948.
10. Levi M., Thachil J., Iba T., Levy J. H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020;7:e438–e440. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
11. Wenzler E., Engineer M. H., Yaqoob M., Benken S. T. Safety and efficacy of apixaban for therapeutic anticoagulation in critically Ill ICU patients with severe COVID-19 respiratory disease. *TH Open: Companion Journal to Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4(04):e376–e382. DOI: 10.1055/s-0040-1720962.
12. Billett H. H., Reyes-Gil M., Szymanski J., Ikemura K., Stahl L. R., Lo Y., Rahman S., Gonzalez-Lugo J. D., Kushnir M., Barouqa M., Golestaneh L., Bellin E. Anticoagulation in COVID-19: effect of enoxaparin, heparin, and apixaban on mortality. *Thrombosis and haemostasis*. 2020;120(12):1691–1699. DOI: 10.1055/s-0040-1720978.
13. Appiah D., Quinn N. J., Messing E. G., Veltri K. T. Safety and efficacy analysis of apixaban compared to heparins in hospitalized non-critically ill COVID-19 patients. *Hospital Pharmacy*. 2022;57(6):727–733. DOI: 10.1177/00185787221095764.
14. Pinto D. J., Orwat M. J., Koch S., Rossi K. A., Alexander R. S., Smallwood A., Wong P. C., Rendina A. R., Luettgen J. M., Knabb R. M., He K., Xin B., Wexler R. R., Lam P. Y. Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carboxamide (Apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Journal of medicinal chemistry*. 2007;50(22):5339–5356. DOI: 10.1021/jm070245n.
15. Luettgen J. M., Knabb R. M., He K., Pinto D. J., Rendina A. R. Apixaban inhibition of factor Xa: microscopic rate constants and inhibition mechanism in purified protein systems and in human plasma. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2011;26(4):514–526. DOI: 10.3109/14756366.2010.535793.
16. Byon W., Garonzik S., Boyd R. A., Frost C. E. Apixaban: a clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic review. *Clinical pharmacokinetics*. 2019;58(10):1265–1279. DOI: 10.1007/s40262-019-00775-z.
17. Granger C. B, Alexander J. H, McMurray J. J. V, Lopes R. D., Hylek E. M., Hanna M., Al-Khalidi H. R., Ansell J., Atar D., Avezum A., Bahit M. C., Diaz R., Easton J. D., Ezekowitz J. A., Flaker G., Garcia D., Geraldes M., Gersh B. J., Golitsyn S., Goto S., Hermosillo A. G., Hohnloser S. H., Horowitz J., Mohan P., Jansky P., Lewis B. S., Lopez-Sendon J. L., Pais P., Parkhomenko A., Verheugt F. W. A., Zhu J., Wallentin L. Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(11):981–992. DOI: 10.1056/NEJMoa1107039.
18. Романова М. В., Пузенко Д. В. Некоторые аспекты применения антикоагулянтов при венозных тромбоэмболиях, тромбоэмболии легочной артерии. Фокус на пожилых пациентов. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(3):97–106. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4944.
19. Hylek E. M., Held C., Alexander J. H., Lopes R. D., De Caterina R., Wojdyla D. M., Huber K., Jansky P., Steg Ph. G., Hanna M., Thomas L., Wallentin L., Granger C. B. Major bleeding in patients with atrial fibrillation receiving apixaban or warfarin: The ARISTOTLE Trial (Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation): Predictors, Characteristics, and Clinical Outcomes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(20):2141–2147. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.549.
20. Avezum A., Lopes R. D., Schulte P. J., Lanas F., Gersh B. J., Hanna M., Pais P., Erol C., Diaz R., Bahit M. C., Bartunek J., De Caterina R., Goto S., Ruzyllo W., Zhu J., Granger C. B., Alexander J. H. Apixaban in comparison with warfarin in patients with atrial fibrillation and valvular heart disease: findings from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) Trial. *Circulation*. 2015;132(8):624–632. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014807.
21. Lip G. Y., Keshishian A., Li X., Hamilton M., Masseria C., Gupta K., Luo X., Mardekian J., Friend K., Nadkarni A., Pan X., Baser O., Deitelzweig S. Effectiveness and safety of oral anticoagulants among nonvalvular atrial fibrillation patients: the ARISTOPHANES study. *Stroke*. 2018;49(12):2933–2944. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.020232.
22. Fralick M., Colacci M., Schneeweiss S., Huybrechts K. F., Lin K. J., Gagne J. J. Effectiveness and safety of apixaban compared with rivaroxaban for patients with atrial fibrillation in routine practice: a cohort study. *Annals of internal medicine*. 2020;172(7):463–473. DOI: 10.7326/M19-2522.
23. Rutherford O. C. W., Jonasson C., Ghanima W., Söderdahl F., Halvorsen S. Comparison of dabigatran, rivaroxaban, and apixaban for effectiveness and safety in atrial fibrillation: a nationwide

cohort study. *European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2020;6(2):75–85. DOI: 10.1093/ehjcvp/pvz086.
24. Jeong H.-C., Kim T.-E., Shin K.-H. Quantification of apixaban in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Translational and Clinical Pharmacology*. 2019;27(1):33–41. DOI: 10.12793/tcp.2019.27.1.33.
25. Rodina T. A., Melnikov E. S., Aksenov A. A., Belkov S. A., Sokolov A. V., Prokof'ev A. B., Ramenskaya G. V. Simultaneous Determination of Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban, and Warfarin in Human Blood Serum by HPLC-MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(2):289–293. DOI: 10.1007/s11094-022-02633-y.
26. Gouveia F., Bicker J., Santos J., Rocha M., Alves G., Falcão A., Fortuna A. Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;181:113109. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113109.
27. Cini M., Legnani C., Padrini R., Cosmi B., Dellanoce C., De Rosa G., Palareti G., Marcucci R., Pengo V., Poli D., Testa S. DOAC plasma levels measured by chromogenic anti-Xa assays and HPLC-UV in apixaban-and rivaroxaban-treated patients from the START-Register. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2020;42(2):214–222. DOI: 10.1111/ijlh.13159.
28. Lindahl S., Dyrkorn R., Spigset O., Hegstad S. Quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human serum by UHPLC-MS/MS – method development, validation, and application. *Therapeutic drug monitoring*. 2018;40(3):369. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000509.
29. Raghavan N., Frost C. E., Yu Z., He K., Zhang H., Humphreys W. G., Zhang D., Pinto D., Chen S., Bonacorsi S., Wong P. C. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans. *Drug metabolism and disposition*. 2009;37(1):74–81. DOI: 10.1124/dmd.108.023143.

REFERENCES

1. Vorobyeva N. M., Tkachyova O. N. Anticoagulant therapy in elderly patients: dilemma of choice between efficacy and safety. *Medical alphabet*. 2018;2(16):6–14. (In Russ.)
2. Panchenko E. P. Antithrombotic therapy of coronary heart disease: time-tested essential principles. *Therapeutic Archive*. 2019;91(6):19–24. (In Russ.) DOI: 10.26442/00403660.2019.06.000296.
3. Bokarev I. N., Kondrat'eva T. B. New anticoagulants in clinical practice. Effectiveness and problems. *Clinical Medicine*. 2016;94(5):383–387. (In Russ.) DOI: 10.18821/0023-2149-2016-94-5-383-387.
4. Van Rein N., Heide-Jørgensen U., Lijfering W. M., Dekkers O. M., Sørensen H. T., Cannegieter S. C. Major bleeding rates in atrial fibrillation patients on single, dual, or triple antithrombotic therapy: results from a Nationwide Danish Cohort Study. *Circulation*. 2019;139(6):775–786. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036248.
5. Cools F., Wollaert B., Vervoort G., Verstraete S., Voet J., Hermans K., Heyse A., De Wolf A., Hollanders G., Boussy T., Anné W., Vercammen J., Faes D., Beutels M., Mairesse G., Purnode Ph., Blankoff I., Vandergoten P., Capiau L., Allu J., Bassand J., Kayani G. Treatment patterns in anticoagulant therapy in patients with newly diagnosed atrial fibrillation in Belgium: results from the GARFIELD-AF registry. *Acta Cardiologica*. 2018;74(4):309–318. DOI: 10.1080/00015385.2018.1494089.
6. Melekhov A. V., Gendlin G. E., Dadashova E. F., Alekseeva E. M., Zaigraev I. A., Nikitin I. G. The dynamics of application of anti-thrombotic in patients fibrillation of atriums: original data and review of national registers. *Medical Journal of the Russian Federation*. 2017;23(3):116–126. (In Russ.) DOI: 10.18821/0869-2106-2017-23-3-116-126.
7. Gruzdeva A. A., Khokhlov A. L., Ilyin M. V. Oral anticoagulants in the prevention of thromboembolic complications in cardiac patients: analysis of use in the Russian Federation. *Good Clinical Practice*. 2020;1:69–79. (In Russ) DOI: 10.37489/2588-0519-2020-1-69-79.
8. Kolbin A. S, Kasimova A. R, Gilyarevskiy S. R. Comparative pharmacoeconomic analysis of the use of apixaban, rivaroxaban and dabigatran for prevention of stroke and embolism in the vessels of the systemic circulation in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Good Clinical Practice*. 2022;(4):50–59. (In Russ). DOI: 10.37489/2588-0519-2022-4-50-59.
9. Dzudovic J., Sakac M. C., Antunovic M., Repic A., Obradovic S., Djordjevic S., Dzudovic B. Development and validation of LC-MS/MS method for determination of plasma apixaban. *Acta Chromatographica*. 2022;34(3):332–337. DOI: 10.1556/1326.2021.00948.
10. Levi M., Thachil J., Iba T., Levy J. H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020;7:e438–e440. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
11. Wenzler E., Engineer M. H., Yaqoob M., Benken S. T. Safety and efficacy of apixaban for therapeutic anticoagulation in critically Ill ICU patients with severe COVID-19 respiratory disease. *TH Open: Companion Journal to Thrombosis and Haemostasis*. 2020;4(04):e376–e382. DOI: 10.1055/s-0040-1720962.
12. Billett H. H., Reyes-Gil M., Szymanski J., Ikemura K., Stahl L. R., Lo Y., Rahman S., Gonzalez-Lugo J. D., Kushnir M., Barouqa M., Golestaneh L., Bellin E. Anticoagulation in COVID-19: effect of enoxaparin, heparin, and apixaban on mortality. *Thrombosis and haemostasis*. 2020;120(12):1691–1699. DOI: 10.1055/s-0040-1720978.
13. Appiah D., Quinn N. J., Messing E. G., Veltri K. T. Safety and efficacy analysis of apixaban compared to heparins in hospitalized non-critically ill COVID-19 patients. *Hospital Pharmacy*. 2022;57(6):727–733. DOI: 10.1177/00185787221095764.
14. Pinto D. J., Orwat M. J., Koch S., Rossi K. A., Alexander R. S., Smallwood A., Wong P. C., Rendina A. R., Luettgen J. M., Knabb R. M., He K., Xin B., Wexler R. R., Lam P. Y. Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carboxamide (Apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Journal of medicinal chemistry*. 2007;50(22):5339–5356. DOI: 10.1021/jm070245n.
15. Luettgen J. M., Knabb R. M., He K., Pinto D. J., Rendina A. R. Apixaban inhibition of factor Xa: microscopic rate constants and inhibition mechanism in purified protein systems and in human plasma. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2011;26(4):514–526. DOI: 10.3109/14756366.2010.535793.
16. Byon W., Garonzik S., Boyd R. A., Frost C. E. Apixaban: a clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic review. *Clinical pharmacokinetics*. 2019;58(10):1265–1279. DOI: 10.1007/s40262-019-00775-z.
17. Granger C. B, Alexander J. H, McMurray J. J. V, Lopes R. D., Hylek E. M., Hanna M., Al-Khalidi H. R., Ansell J., Atar D., Avezum A., Bahit M. C., Diaz R., Easton J. D., Ezekowitz J. A., Flaker G., Garcia D., Geraldes M., Gersh B. J., Golitsyn S., Goto S., Hermosillo A. G., Hohnloser S. H., Horowitz J., Mohan P., Jansky P., Lewis B. S., Lopez-Sendon J. L., Pais P., Parkhomenko A., Verheugt F. W. A., Zhu J., Wallentin L. Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *New England Journal of Medicine*. 2011;365(11):981–992. DOI: 10.1056/NEJMoa1107039.
18. Romanova M. V., Puzenko D. V. Aspects of anticoagulant therapy in venous thromboembolism, pulmonary embolism. Focus on elderly patients. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(3):97–106. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2022-4944.
19. Hylek E. M., Held C., Alexander J. H., Lopes R. D., De Caterina R., Wojdyla D. M., Huber K., Jansky P., Steg Ph. G., Hanna M., Thomas L., Wallentin L., Granger C. B. Major bleeding in patients with atrial fibrillation receiving apixaban or warfarin: The ARISTOTLE Trial (Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation): Predictors, Characteristics, and Clinical Outcomes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(20):2141–2147. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.549.

20. Avezum A., Lopes R. D., Schulte P. J., Lanas F., Gersh B. J., Hanna M., Pais P., Erol C., Diaz R., Bahit M. C., Bartunek J., De Caterina R., Goto S., Ruzyllo W., Zhu J., Granger C. B., Alexander J. H. Apixaban in comparison with warfarin in patients with atrial fibrillation and valvular heart disease: findings from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) Trial. *Circulation*. 2015;132(8):624–632. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014807.
21. Lip G. Y., Keshishian A., Li X., Hamilton M., Masseria C., Gupta K., Luo X., Mardekian J., Friend K., Nadkarni A., Pan X., Baser O., Deitelzweig S. Effectiveness and safety of oral anticoagulants among nonvalvular atrial fibrillation patients: the ARISTOPHANES study. *Stroke*. 2018;49(12):2933–2944. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.020232.
22. Fralick M., Colacci M., Schneeweiss S., Huybrechts K. F., Lin K. J., Gagne J. J. Effectiveness and safety of apixaban compared with rivaroxaban for patients with atrial fibrillation in routine practice: a cohort study. *Annals of internal medicine*. 2020;172(7):463–473. DOI: 10.7326/M19-2522.
23. Rutherford O. C. W., Jonasson C., Ghanima W., Söderdahl F., Halvorsen S. Comparison of dabigatran, rivaroxaban, and apixaban for effectiveness and safety in atrial fibrillation: a nationwide cohort study. *European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2020;6(2):75–85. DOI: 10.1093/ehjcvp/pvz086.
24. Jeong H.-C., Kim T.-E., Shin K.-H. Quantification of apixaban in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Translational and Clinical Pharmacology*. 2019;27(1):33–41. DOI: 10.12793/tcp.2019.27.1.33.
25. Rodina T. A., Melnikov E. S., Aksenov A. A., Belkov S. A., Sokolov A. V., Prokof'ev A. B., Ramenskaya G. V. Simultaneous Determination of Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban, and Warfarin in Human Blood Serum by HPLC-MS/MS for Therapeutic Drug Monitoring. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;56(2):289–293. DOI: 10.1007/s11094-022-02633-y.
26. Gouveia F., Bicker J., Santos J., Rocha M., Alves G., Falcão A., Fortuna A. Development, validation and application of a new HPLC-DAD method for simultaneous quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;181:113109. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113109.
27. Cini M., Legnani C., Padrini R., Cosmi B., Dellanoce C., De Rosa G., Palareti G., Marcucci R., Pengo V., Poli D., Testa S. DOAC plasma levels measured by chromogenic anti-Xa assays and HPLC-UV in apixaban-and rivaroxaban-treated patients from the START-Register. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2020;42(2):214–222. DOI: 10.1111/ijlh.13159.
28. Lindahl S., Dyrkorn R., Spigset O., Hegstad S. Quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human serum by UHPLC-MS/MS – method development, validation, and application. *Therapeutic drug monitoring*. 2018;40(3):369. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000509.
29. Raghavan N., Frost C. E., Yu Z., He K., Zhang H., Humphreys W. G., Zhang D., Pinto D., Chen S., Bonacorsi S., Wong P. C. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans. *Drug metabolism and disposition*. 2009;37(1):74–81. DOI: 10.1124/dmd.108.023143.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1653
УДК 547.792.2; 615.273.011; 616.151.55-092.9-08

Check for updates

CC BY 4.0

Research article / Оригинальная статья

Results of Preclinical Studies of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-th Bromide in Relation to the Hemostasis System *in vivo*

Yi Wang[1], Nailya R. Bulatova[2], Elena E. Klen[3], Galina A. Rozit[3], Irina L. Nikitina[3], Elena A. Smolyarchuk[4], Ksenia A. Zavadich[4], Irina D. Krylova[3], Aleksandr V. Samorodov[3] ✉

[1] Hangzhou Normal University. 2318, Yuhangtang str., Hangzhou, 310030, China
[2] The University of Jordan. School of Pharmacy. Queen Rania str., Amman, 11942, Jordan
[3] Bashkir State Medical University. 3, Lenin str., Ufa, 450008, Russia
[4] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 2/4, Bolshaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435, Russia

✉ **Corresponding author:** Aleksandr V. Samorodov. **E-mail:** avsamorodov@gmail.com

ORCID: Yi Wang – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027; Nailya R. Bulatova – https://orcid.org/0000-0001-6754-0325;
Elena E. Klen – https://orcid.org/0000-0001-7538-6030; Galina A. Rosit – https://orcid.org/0000-0002-7935-8675;
Irina L. Nikitina – https://orcid.org/0000-0002-6283-5762; Elena A. Smolyarchuk – https://orcid.org/0000-0002-2615-7167;
Ksenia A. Zavadich – https://orcid.org/0000-0002-4792-7132; Irina D. Krylova– https://orcid.org/0000-0001-8979-9135;
Aleksandr V. Samorodov – https://orcid.org/0000-0001-9302-499X.

Received: 14.11.2023 **Revised:** 19.02.2024 **Published:** 19.02.2024

Abstract

Introduction. A characteristic manifestation of vascular brain damage is depressive disorders that accompany both acute and chronic disorders of cerebral circulation. Depression not only reduces the patient's quality of life, but also complicates the treatment of basic vascular disease, increases the risk of stroke and death. Therefore, complex therapy of vascular depression includes not only antidepressants, but also basic means to correct the consequences of disorders of cerebral blood flow, including with antiplatelet activity. In this regard, the development of a new molecule based on thietane-containing heterocycles, combining the properties of an antidepressant and an antiplatelet agent.

Aim. To conduct a preclinical evaluation of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazol-4 bromide when administered to rats.

Materials and methods. A study was conducted of the effect of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietan-3-yl)-1H-1,2,4-triazol-4-bromide on the hemostasis system during intravenous and intragastric administration to healthy white non-linear sexually mature male rats ($n = 160$). Thromboelastography was performed on a TEG 5000 device, activated with a 0.2 M solution of calcium chloride, Born aggregometry and standard clotting tests to assess the coagulation component of hemostasis.

Result and discussion. The findings show that 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-th bromide with peroral administration exceeded acetylsalicylic acid by 2.8 times in terms of ED50, and by 1.8 times with intravenous way of administration accordingly. A similar effect of pentoxifylline in the intravenous route of administration was recorded at a concentration of 27.8 mg/kg versus 12.4 mg/kg of compound I. The results of a complex method to assess the state of the hemostasis system indicate a more pronounced antiaggregational effect of compound I compared with pentoxifylline and acetylsalicylic acid.

Conclusion. Preclinical studies of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4 bromide, was demonstrated that a combination of antidepressant and antiplatelet activity, which can serve as a basis for further drug development.

Keywords: derivatives of 3-substituted thietanes, antiaggregational 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. Yi Wang, Nailya R. Bulatova, Aleksandr V. Samorodov invented and developed an experiment. Elena E. Klen, Galina A. Rosit synthesized samples. Elena A. Smolyarchuk, Ksenia A. Zavadich participated in data processing. Irina L. Nikitina, Irina D. Krylova carried out theoretical calculations. All the authors participated in the discussion of the results and in writing the text of the article.

Funding. The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation No. 23-25-00144, https://rscf.ru/project/23-25-00144 .

For citation: Wang Y., Bulatova N. R., Klen E. E., Rozit G. A., Nikitina I. L., Smolyarchuk E. A., Zavadich K. A., Krylova I. D., Samorodov A. V. Results of preclinical studies of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-th bromide in relation to the hemostasis system *in vivo*. *Drug development & registration*. 2024;13(1):241–246. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1653

Результаты доклинических исследований 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1H-1,2,4-триазол-4-ия бромида в отношении системы гемостаза в условиях *in vivo*

Ю. Ванг[1], Н. Р. Булатова[2], Е. Э. Клен[3], Г. А. Розит[3], И. Л. Никитина[3], Е. А. Смолярчук[4], К. А. Завадич[4], И. Д. Крылова[3], А. В. Самородов[3] ✉

© Wang Y., Bulatova N. R., Klen E. E., Rozit G. A., Nikitina I. L., Smolyarchuk E. A., Zavadich K. A., Krylova I. D., Samorodov A. V., 2024
© Ванг Ю., Булатова Н. Р., Клен Е. Э., Розит Г. А., Никитина И. Л., Смолярчук Е. А., Завадич К. А., Крылова И. Д., Самородов А. В., 2024

[1] Ханчжоуский педагогический университет. 310030, Китай, г. Ханчжоу, ул. Юхангтан, д. 2318
[2] Иорданский университет. 11942, Иордания, г. Амман, улица Королевы Рании
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России). 450008, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3
[4] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119435, Россия, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4

✉ **Контактное лицо:** Самородов Александр Владимирович. **E-mail:** avsamorodov@gmail.com

ORCID: Ю. Ванг – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027; Н. Р. Булатова – https://orcid.org/0000-0001-6754-0325;
Е. Э. Клен – https://orcid.org/0000-0001-7538-6030; Г. А. Розит – https://orcid.org/0000-0002-7935-8675;
И. Л. Никитина – https://orcid.org/0000-0002-6283-5762; Е. А. Смолярчук– https://orcid.org/0000-0002-2615-7167;
К. А. Завадич – https://orcid.org/0000-0002-4792-7132; И. Д. Крылова – https://orcid.org/0000-0001-8979-9135;
А. В. Самородов – https://orcid.org/0000-0001-9302-499X.

Статья поступила: 14.11.2023 **Статья принята в печать:** 19.02.2024 **Статья опубликована:** 19.02.2024

Резюме

Введение. Характерным проявлением сосудистого поражения головного мозга являются депрессивные расстройства, которые сопутствуют как острым, так и хроническим нарушениям мозгового кровообращения. Депрессия не только снижает качество жизни пациента, но и затрудняет лечение базисного сосудистого заболевания, повышает риск развития инсульта и летального исхода. Поэтому комплексная терапия сосудистой депрессии включает не только антидепрессанты, но и базисные средства для коррекции последствий нарушений мозгового кровотока, в том числе с антиагрегантной активностью. В этой связи разработка новой молекулы на основе тиетансодержащих гетероциклов, сочетающей в себе свойства антидепрессанта и антиагреганта.

Цель. Провести доклиническую оценку 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида при введении крысам.

Материалы и методы. Проведено исследование влияния 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида на систему гемостаза при внутривенном и внутрижелудочном введении здоровым белым нелинейным половозрелым крысам-самцам (n = 160). Проводилась тромбоэластография на аппарате TEG 5000, активированная 0,2 М раствором хлорида кальция, агрегатометрия по Born и стандартные клоттинговые тесты по оценке коагуляционного звена гемостаза.

Результаты и обсуждение. Установлено, что 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида при пероральном введении превосходило по уровню ED50 ацетилсалициловую кислоту в 2,8 раза, а при внутривенном пути введения в 1,8 раза соответственно. Аналогичный эффект пентоксифиллина при внутривенном пути введения регистрировался в концентрации 27,8 мг/кг против 12,4 мг/кг соединения I. Результаты комплексного метода оценки состояния системы гемостаза – тромбоэластографии, свидетельствуют о более выраженном антиагрегационном действии данного соединения по сравнению с пентоксифиллином и ацетилсалициловой кислотой.

Заключение. Таким образом, в результате доклинических исследований 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида установлено сочетание антидепресивной и антиагрегационной активности, что может послужить основой для дальнейшей разработки лекарственных препаратов.

Ключевые слова: производные 3-замещенных тиетанов, антиагрегационная активность

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

Вклад авторов. Ю. Ванг, Н. Р. Булатова, А. В. Самородов придумали и разработали эксперимент. Е. Э. Клен, Г. А. Розит синтезировали образцы. Е. А. Смолярчук, К. А. Завадич – участвовали в обработке данных. И. Л. Никитина, И. Д. Крылова проводили теоретические расчеты. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00144, https://rscf.ru/project/23-25-00144.

Для цитирования: Ванг Ю., Булатова Н. Р., Клен Е. Э., Розит Г. А., Никитина И. Л., Смолярчук Е. А., Завадич К. А., Крылова И. Д., Самородов А. В. Результаты доклинических исследований 4-(2-(4-нитрофенил)-2-оксоэтил)-1-(тиетан-3-ил)-1Н-1,2,4-триазол-4-ия бромида в отношении системы гемостаза в условиях *in vivo*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):241–246. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1653

INTRODUCTION

Disorders in the hemostatic system cause a wide prevalence of thrombosis of various origins and are a key link in the pathogenesis of many diseases and critical conditions. The need to pharmacologically correct the hemostatic system and the degree of their efficacy is a fact proven by the results of more than 280 meta-analyses for secondary and 6 tests for primary prevention of thrombosis [1–4]. To date, there are schemes to treat and prevent thrombosis of various localization, based on the results of clinical studies [5–7]. Thrombosis and thromboembolic complications are still widespread and high in frequency, being one of the main causes of mortality and disability of the adult population in industrialized countries [8, 9]. This is a consequence of the general aging of the population [10], the growth of oncological diseases [11, 12], an increase in the number of overweight and diabetic patients [13–15], an increase in the number of patients requiring long hospital stays [16, 17], or/and patients requiring emergency surgical interventions [18–20] and other population

factors, as well as insufficient efficacy, high frequency of side effects and lack of selectivity for the hemostasis system of currently used drugs [21–23]. According to WHO forecasts, by 2030, acute cerebrovascular accidents (ACVA) will take a leading position among the causes of the burden of diseases on a global scale. Therefore, complex therapy of vascular depression includes not only antidepressants, but also basic means to correct the consequences of disorders of cerebral blood flow, including with antiplatelet activity. In this regard, developing a new molecule based on thietane-containing heterocycles, combining the properties of an antidepressant and an antiplatelet agent, will qualitatively enhance the effectiveness of therapy for patients with ACVA due to multimodal action. Synthesis of analogues and derivatives of used drugs is one of the modern directions in the development of new medicines. The earlier findings aimed at searching for potential antiplatelet agents in a number of newly synthesized 3-substituted thietanes demonstrate pronounced antidepressant activity [24] and antiplatelet activity in some compounds of this series *in vitro* [25–27].

Purpose of the work is: to conduct a preclinical evaluation of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazol-4 bromide (compound I) when administered to rats (figure 1).

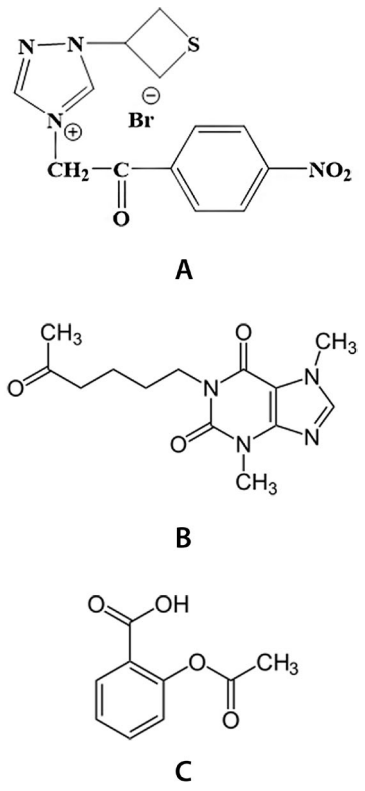


Figure 1. Structural formula of compound I (A), pentoxifylline (B) and acetylsalicylic acid (C)

MATERIALS AND METHODS

The experimental work was carried out in accordance with the recommendations of the «Guidelines for the preclinical study of new pharmacological substances» [28]. Taking into account the «principle of chemical similarity» and the potential scope of application of this compound as a means to correct depression caused by disorders of cerebral circulation[1], 3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)xanthine were selected as comparison drugs at this stage of the study (Pentoxifylline, JSC Dalkhimpharm, Russia, series N 290719, expiration date: 08.2022, produced: 07.2024) [29] and acetylsalicylic acid (Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd., China, series N 10L16, expiration date: 04.2022, produced: 10.11.2020) [2].

Experimental studies *in vivo* were performed on 160 white nonlinear mature male rats aged 3.5–4.0 months, weighing 225 ± 32 g. All experiments were performed in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals in Laboratory Conditions, the Rules for Conducting Laboratory preclinical studies in the Russian Federation. The study was approved by the ethics committee of the Bashkir State Medical University (protocol No. 2 of November 12, 2020).

Just before the experimental work, laboratory rats were divided into 4 groups of 20 animals each: group of administration of pentoxifylline, acetylsalicylic acid, group of compound I and group of control rats. The animals were anesthetized with sodium thiopental (40 mg/kg), blood was taken from the jugular vein.

Thromboelastography was carried out with TEG 5000 (Haemoscope Corporation, United States). For TEG activator was used 0,2 M solution $CaCl_2$ (LLC "Technology-Standard", Russia).

The study of platelet aggregation function was studied on the "AT-02" (LLC "NPF Meditsina-Technika", Russia). Adenosine diphosphate (ADP) at a concentration of 20 μg/ml and collagen – 5 mg/ml produced by LLC "Technologiya-Standard" (Russia) were used as inducers of platelet aggregation [30].

Anticoagulation activity (activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PTT), thrombin time (TT), antithrombin III (ATIII) and A. Clauss fibrinogen concentration) was determined by generally recognized clotting tests on a turbidimetric hemocoagulometer Solar CGL 2110 (CJSC "SOLAR", Russia) [2].

The findings were processed using the STATISTICA 10.0 statistical package (StatSoft Inc., USA) and GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA). Verification of the normality of the distribution of the actual data was performed using the Shapiro-Wilk criterion. Median and interquartile interval were used to describe the groups. The analysis of variance was carried out using the Kraskel-Wallis or Mann-Whitney criteria. The critical significance level p for statistical criteria was assumed to be 0.05. The IC50 and ED50 values were calculated using

[1] Russian Science Foundation grant No. 23-25-00144. Available at: https://rscf.ru/project/23-25-00144. Accessed: 14.11.2023.

nonlinear fitting of curves describing antiaggregational activity (%) according to a logarithmic equation with 4 parameters using GraphPad Prism software.

RESULT AND DISCUSSION

The first stage of the study evaluated the ED50 antiaggregational activity at various routes of administration of the studied compound and comparison drugs. The results of evaluating the effect of compound I on platelet aggregation during intravenous and intragastric administration to intact rats are presented in Table 1.

Table 1. Antiaggregational activity (ED_{50}) of comparison drugs and compound I during intragastric and intravenous administration to rats

Medicament	Orally, mg/kg	Intravenously, mg/kg
Acetylsalicylic acid	24.1	21.7
Pentoxifylline	–	39.8
Compound I	8.5	12.4

The data in Table 1 show that compound I, when administered orally, exceeded acetylsalicylic acid by 2.8 times in terms of ED_{50}, and by 1.8 times in the intravenous route of administration, respectively. A similar effect of pentoxifylline in the intravenous route of administration was recorded at a concentration of 27.8 mg/kg versus 12.4 mg/ kg of compound I.

The second stage assessed the effect on the hemostasis system by a global test – thromboelastography and standard clotting tests. Studies of antiaggregational activity at this stage were carried out with intravenous administration to rats in equimolar doses equal to 40.0 mg/kg for pentoxifylline, 25.9 mg/kg for acetylsalicylic acid and 55.3 mg/kg for compound I.

The results of assessing the effect of compound I on the hemostasis system by thromboelastography, which allows evaluating the hemostasis system in a complex by the main key links, are presented in table 2.

Thromboelastograms of rats receiving intravenous pentoxifylline or acetylsalicylic acid, show a shift in the total coagulation potential towards hypocoagulation: the median thrombodynamic potential index (TPI) in the control group is 15.1/sec, and in the group of pentoxifylline and acetylsalicylic acid is 7.7 ($p < 0.05$) and 5.6 ($p < 0.05$) /sec, respectively. The MA parameter characterizing the functional activity of platelets in the group of rats treated with pentoxifylline or acetylsalicylic acid was 11.2 % ($p < 0.05$) and 36.7 % ($p < 0.05$), respectively, less in comparison with the control. At the same time, the Angle indicator, reflecting the functional state of fibrinogen, remains at the level of control values when administered to animals (43.7 in the control vs 39.9 for pentoxifylline and 34.6 for acetylsalicylic acid; $p > 0.05$).

Comparison of the data of thrombelastograms for groups of rats that received compound I allows us to draw the following conclusions. The results of a complex method to assess the state of the hemostasis system indicate a more pronounced antiaggregational effect of compound I compared with pentoxifylline and acetylsalicylic acid. The MA index decreases in the group of rats treated with compound I by 1.6 times ($p < 0.05$) compared with the pentoxifylline group and by 1.2 times ($p < 0.05$) compared with acetylsalicylic acid. The mechanical and physical properties of the clot also change: the G index decreases in the group of compound I by 1.7 and 1.3 times ($p < 0.05$) compared with the indicators of pentoxifylline and acetylsalicylic acid, respectively. The fibrinolysis indices (CLT and CL30%) in the presence of pentoxifylline and compound I remain at the control values.

The next stage of the experiments evaluated the effect of compound I and antiplatelet agents on the coagulation component of hemostasis and markers of thrombosis (table 3).

Table 2. Indicators of thromboelastography during intravenous administration of compound I and comparison drugs to rats, Me [0.25–0.75]

Indicator	Control	Pentoxifylline	Acetylsalicylic acid	Compound I
R (time of latency from start of test to initial fibrin formation), sec	11.6 (9.7–13.2)	9.9 (8.5–11.4)	10.2 (8.7–11.1)	13.8 (10.6–14.2)
Angle (measures the speed at which fibrin build up and cross-linking takes place, hence assesses the rate of clot formation), deg	43.7 (42.4–44.3)	39.9 (36.4–45.1)	34.6 (33.9–44.5)	41.4 (38.6–43.1)
MA (maximum amplitude), mm	55.9 (51.2–57.8)	49.6 (46.7–52.3)*	35.4 (32.1–37.2)*	31.5 (28.4–33.2)*,‡
TMA (time to maximum amplitude), min	35.4 (32.4–38.5)	33.4 (32.5–37.3)	38.4 (37.4–41.3)	42.5 (40.5–43.8)*,‡
G (shear modulus strength), dyne/cm^2	6.3 (5.7–6.4)	4.6 (4.1–6.3)*	3.5 (3.2–3.9)*	2.7 (2.2–3.4)*,‡,Δ
E (elasticity constant), dyne/cm^2	127.3 (115.4–142.3)	101.5 (98.5–109.4)*	113.4 (101.8–116.7)*	67.3 (64.8–71.0)*,‡,Δ
TPI (thrombodynamic potential index), sec	15.1 (13.2–17.1)	7.7 (7.1–8.6)*	5.6 (5.1–6.3)*	3.4 (2.7–4.1)*,‡,Δ
CL30 (clot lysis index at 30 minute), %	97.5 (91.3–99.5)	98.5 (97.3–99.2)	99.4 (97.8–99.7)	98.8 (97.5–99.3)
CLT (clot lysis time), min	36.9 (32.4–38.3)	36.5 (33.1–38.4)	36.5 (33.1–38.4)	34.4 (30.1–36.5)
CI (clotting or coagulation index)	0.38 (0.1–0.7)	–1.8 (–1.1/–2.7)*	–2.3 (–2.1/–2.6)*	–4.1 (–3.5/–5.7)*,‡,Δ

Note. * – $p < 0.05$ – pentoxifylline/acetylsalicylic acid/compound I vs control; ‡ – $p < 0.05$ – pentoxifylline vs compound I; Δ – $p < 0.05$ – acetylsalicylic acid vs compound I, $n = 20$.

Table 3. Indicators of coagulation component of hemostasis during intravenous administration of compound I and comparison drugs to rats, Me [0.25-0.75]

№	Indicator	Control	Pentoxifylline	Acetylsalicylic acid	Compound I
1	APPT, sec	24.2 (21.5–26.3)	23.5 (21.4–24.9)	21.7 (20.4–24.1)	23.9 (22.1–24.7)
2	TT, sec	28.1 (25.9–29.4)	28.4 (27.2–29.4)	27.8 (25.3–28.7)	26.9 (25.7–28.4)
3	PTT, sec	13.2 (11.7–13.4)	12.9 (11.4–13.7)	13.4 (11.7–14.5)	14.1 (12.7–14.9)
4	Fibrinogen, sec	25.4 (22.7–26.4)	25.7 (24.7–26.5)	23.9 (22.8–24.7)	24.9 (23.5–26.8)
5	AT III, %	94.6 (94.8–97.3)	97.3 (96.3–98.1)	96.6 (94.5–97.2)	97.5 (94.5–98.9)

Note. $p > 0.05$ – pentoxifylline/acetylsalicylic acid/compound I vs control, $n = 20$.

The findings proved that pentoxifylline and acetylsalicylic acid naturally do not show activity against the coagulation link of the hemostasis system when administered to rats. The studied compound also has no effect on the activity of coagulation factors of the internal and external activation pathways and the concentration of fibrinogen according to Clauss.

Disturbances in the hemostasis system are a key link in the pathogenesis of many cardiovascular, cerebrovascular, immune, and infectious diseases. Much of the research currently focuses on the inhibition of platelet activation and aggregation. In our study, we chose pentoxifylline and acetylsalicylic acid as analogue drugs. Despite the fact that pentoxifylline is not an antithrombotic drug, today the indications for the use of pentoxifylline as a component of modern antithrombotic therapy are clearly defined. The results of randomized studies and clinical recommendations demonstrate the effectiveness of pentoxifylline specifically in cases of retinal vascular thrombosis and acute ischemic cerebrovascular accident [29]. Despite the high and seemingly obvious benefits of taking acetylsalicylic acid, according to the author [25], acetylsalicylic acid turns out to be ineffective in 5–48 % of cases of long-term use. The use of acetylsalicylic acid in combination with other drugs (clopidogrel, ticlid, etc.), which have an inhibitory effect on platelet activation processes, statistically reduces the frequency of repeated fatal episodes of myocardial infarction and stroke [27]. In this regard, the development of new drugs and evaluation of their antiaggregation effect seems quite promising. This is especially true in terms of the development of drugs for complex therapy of cerebrovascular accidents.

CONCLUSION

Thus, the preclinical findings of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxoethyl)-1-(thietane-3-yl)-1H-1,2,4-triazole-4-th bromide with intravenous and intragastric administration to rats, show that the level of its antiaggregational activity exceeds the indicators of an analog drug which, in combination with the previously established antidepressant activity, can serve as a basis for further drug development.

REFERENCES

1. Andreotti F., Geisler T., Collet J., Gigante B., Gorog D., Halvorsen S., Lip G., Morais J., Navarese E., Patrono C., Rocca B., Rubboli A., Sibbing D., Storey R., Verheugt F., Vilahur G. Acute, periprocedural and longterm antithrombotic therapy in older adults: 2022 Update by the ESC Working Group on Thrombosis. *European Heart Journal.* 2023;44(4):262–279. DOI: 10.1093/eurheartj/ehac515.
2. Baigent C., Blackwell L., Collins R., Emberson J., Godwin J., Peto R., Buring J., Hennekens C., Kearney P., Meade T., Patrono C., Roncaglioni M., Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 2009;373(9678):1849–1860. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60503-1.
3. Badimon L., Vilahur G., Rocca B., Patrono C. The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis. *Cardiovascular Research.* 2021;117(9):2001–2015. DOI: 10.1093/cvr/cvab003.
4. Alenazy F. O., Thomas M. R. Novel antiplatelet targets in the treatment of acute coronary syndromes. *Platelets.* 2021;32(1):15–28. DOI: 10.1080/09537104.2020.1763731.
5. Patrono C., Bachmann F., Baigent C., Bode C., De Caterina R., Charbonnier B., Fitzgerald D., Hirsh J., Husted S., Kvasnicka J., Montalescot G., García Rodríguez L., Verheugt F., Vermylen J., Wallentin L., Priori S., Alonso Garcia M., Blanc J., Budaj A., Cowie M., Dean V., Deckers J., Fernández Burgos E., Lekakis J., Lindahl B., Mazzotta G., Morais J., Oto A., Smiseth O., Morais J., Deckers J., Ferreira R., Mazzotta G., Steg P., Teixeira F., Wilcox R. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European society of cardiology. *European Heart Journal.* 2004;25(2):166–181. DOI: 10.1016/j.ehj.2003.10.013.
6. Patrono C., Andreotti F., Arnesen H., Badimon L., Baigent C., Collet J., De Caterina R., Gulba D., Huber K., Husted S., Kristensen S., Morais J., Neumann F., Rasmussen L., Siegbahn A., Steg P., Storey R., Van de Werf F., Verheugt F. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis. *European Heart Journal.* 2011;32:2922–2932. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr373.
7. Douketis J. D., Spyropoulos A. C., Murad M. H., Arcelus J. I., Dager W. E., Dunn A. S., Fargo R. A., Levy J. H., Samama C. M., Shah S. H., Sherwood M. W., Tafur A. J., Tang L. V., Moores L. K. Perioperative Management of Antithrombotic Therapy: An American College of Chest Physicians Clinical Practice Guideline. *Chest.* 2022;162(5):e207–e243. DOI: 10.1016/j.chest.2022.07.025.
8. Greco A., Occhipinti G., Giacoppo D., Agnello F., Laudani C., Spagnolo M., Mauro M., Rochira C., Finocchiaro S., Mazzone P., Faro D., Landolina D., Ammirabile N., Imbesi A., Raffo C., Capodanno D. Antithrombotic Therapy for Primary and Secondary Prevention of Ischemic Stroke: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology.* 2023;82(15):1538–1557. DOI: 10.1016/j.jacc.2023.07.025.
9. Lutsey P. L., Zakai N. A. Epidemiology and prevention of venous thromboembolism. *Nature Reviews Cardiology.* 2023;20(4):248–262. DOI: 10.1038/s41569-022-00787-6.
10. Heit J. A., O'Fallon W. M., Petterson T. M., Lohse C. M., Silverstein M. D., Mohr D. N., Melton L. J. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. *Archives of Internal Medicine.* 2002;162(11):1245–1248. DOI: 10.1001/archinte.162.11.1245.

11. Timp J. F., Braekkan S. K., Versteeg H. H., Cannegieter S. C. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood.* 2013;122(10):1712–123. DOI: 10.1182/blood-2013-04-460121.
12. Patrono C. Cyclooxygenase Inhibitors and Cancer: The Missing Pieces. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2023;386(2):181–189. DOI: 10.1124/jpet.122.001631.
13. Piazza G., Goldhaber S., Kroll A., Goldberg R., Emery C., Spencer F. Venous thromboembolism in patients with diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*. 2012;125(7):709–716. DOI: 10.1016/j.amjmed.2011.12.004.
14. Wascher T. C., Stulnig T. M., Saely C. H., Stechemesser L. Inhibition of platelet aggregation (Update 2023). *Wiener klinische Wochenschrift.* 2023;135:161–163. DOI: 10.1007/s00508-023-02168-6.
15. Heinzmann A. C., Coenen D. M., Vajen T., Cosemans J. M., Koenen R. R. Combined antiplatelet therapy reduces the proinflammatory properties of activated platelets. *TH Open*. 2021;5(4):e533–e542. DOI: 10.1055/a-1682-3415.
16. Goldhaber S. Z., Turpie A. G. Prevention of venous thromboembolism among hospitalized medical patients. *Circulation*. 2005;111(1):1–3. DOI: 10.1161/01.
17. Olie R. H., van der Meijden P. E. J., Spronk H. M. H., ten Cate H. Antithrombotic Therapy: Prevention and Treatment of Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2022;270:103–130. DOI: 10.1007/164_2020_357.
18. Geerts W. H., Pineo G. F., Heit J. A., Bergqvist D., Lassen M. R., Colwell C. W., Ray J. G. Prevention of venous thromboembolism: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3):338S-400S. DOI: 10.1378/chest.126.3_suppl.338S.
19. Kamran H., Jneid H., Kayani W. T., Virani S. S., Levine G. N., Nambi V., Khalid U. Oral Antiplatelet Therapy After Acute Coronary Syndrome: A Review. *JAMA*. 2021;325(15):1545–1555. DOI: 10.1001/jama.2021.0716.
20. Habib A., Petrucci G., Rocca B. Pathophysiology of Thrombosis in Peripheral Artery Disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2020;18(3):204–214. DOI: 10.2174/1570161117666190206234046.
21. Sharma R., Kumar P., Prashanth S., Belagali Y. Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease. *Cardiology and Therapy*. 2020;9(2):349–361. DOI: 10.1007/s40119-020-00197-0.
22. Santos-Gallego C. G., Badimon J. Overview of Aspirin and Platelet Biology. *The American Journal of Cardiology.* 2021;144(1):2–9. DOI: 10.1016/j.amjcard.2020.12.018.
23. Gragnano F., Moscarella E., Calabrò P., Cesaro A., Pafundi P. C., Ielasi A., Patti G., Cavallari I., Antonucci E., Cirillo P., Pignatelli P., Palareti G., Pelliccia F., Gaudio C., Sasso F. C., Pengo V., Gresele P., Marcucci R. Fimiani F., Vitale R. A., Schiavo A., Conte M., Di Maio D., Pastori D., Menichelli D., Grossi G., Di Serafino L., Taglialatela V., Galiero R., Acierno C., del Pinto M., Gugliemini G. Clopidogrel versus ticagrelor in high-bleeding risk patients presenting with acute coronary syndromes: insights from the multicenter START-ANTIPLATELET registry. *Internal and Emergency Medicine*. 2021;16(2):379–387. DOI: 10.1007/s11739-020-02404-1.
24. Khaliullin F. A., Klen E. E., Nikitina I. L., Pavlov V. N., Rozit G. A., Gaisina G. G., Samorodov A. V. Synthesis and antidepressant activity of thietane-containing 4-(2-oxo-2-phenylethyl)-1H-1,2,4-triazol-4 bromides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2023;56:1596–1603. (In Russ.) DOI: 10.1007/s11094-023-02832-1.
25. Zheng T. J., Kohs T. C., Mueller P. A., Pang J., Reitsma S. E., Parra-Izquierdo I., Melrose A. R., Yang L., Choi J., Zientek K. D., Sviridov D. O., Larson M. K., Williams C. D., Pamir N., Shatzel J. J., Reddy A. P., Kievit P., Remaley A. T., Stevens J. F., Hinds M. T., McCarty O. J., Aslan J. E. Effect of antiplatelet agents and tyrosine kinase inhibitors on oxLDL-mediated procoagulant platelet activity. *Blood Advances*. 2023;7(8):1366–1378. DOI: 10.1182/bloodadvances.2022007169.
26. Gawaz M., Geisler T., Borst O. Current concepts and novel targets for antiplatelet therapy. *Nature Reviews Cardiology*. 2023;20(9):583–599. DOI: 10.1038/s41569-023-00854-6.
27. Jourdi G., Lordkipanidzé M., Philippe A., Bachelot-Loza C., Gaussem P. Current and Novel Antiplatelet Therapies for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23):13079. DOI: 10.3390/ijms222313079.
28. Mironov A. N., editor. Handbook for Preclinical Drug Studies. Moscow: Grif and Co; 2013. 944 p. (In Russ.)
29. McCarty M. F., O'Keefe J. H., DiNicolantonio J. J. Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. *Open Heart*. 2016;3(1):e000365. DOI: 10.1136/openhrt-2015-000365.
30. Born G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927–929. DOI: 10.1038/194927b0.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1531
УДК 615.275.4

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Опыт проведения валидации методики оценки нейтрализующих антител ромиплостима в плазме крови человека

А. Н. Афанасьева[1]✉, В. Б. Сапарова[1, 2], И. Е. Макаренко[1, 2], Т. А. Сельменских[1], Д. В. Куркин[2], А. Л. Хохлов[3], Р. В. Драй[1]

[1] Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34, лит. А
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А. И. Евдокимова Минздрава России). 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

✉ **Контактное лицо:** Афанасьева Алина Николаевна. **E-mail:** Alina.Afanaseva@geropharm.com

ORCID: А. Н. Афанасьева – https://orcid.org/0000-0002-1443-4294; В. Б. Сапарова – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129;
И. Е. Макаренко – https://orcid.org/0000-0003-2308-0608; Т. А. Сельменских – https://orcid.org/0000-0001-7073-311X;
Д. В. Куркин – https://orcid.org/0000-0002-1116-3425; А. Л. Хохлов – https://orcid.org/0000-0002-0032-0341;
Р. В. Драй – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Статья поступила: 25.08.2023 **Статья принята в печать:** 19.02.2024 **Статья опубликована:** 20.02.2024

Резюме

Введение. Ромиплостим представляет собой аналог пептида слитого белка тромбопоэтина (ТПО), который увеличивает количество тромбоцитов за счет связывания и активации человеческого рецептора ТПО. Используется для лечения тромбоцитопении, связанной с хронической иммунной тромбоцитопенией. Для ромиплостима одной из возможных нежелательных реакций со стороны иммунной системы является иммуногенность – выработка противолекарственных антител к препарату, в том числе нейтрализующих антител, которые могут влиять на эффективность и профиль безопасности препарата.

Цель. Валидировать методику определения нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека для дальнейшего проведения клинических исследований иммуногенности

Материалы и методы. В исследовании были использованы поликлональные антитела кролика к ромиплостиму, в качестве стандартного образца брали Энплейт® производства Amgen Europe, для оценки специфичности брали плацебо производства ООО «ГЕРОФАРМ», клеточная линия 32D-hTPOR clone 63 со стабильной экспрессией ТРО-рецептора человека и набор для определения хемилюминесценции CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay от Promega. Эксперимент проводили на клеточной линии 32D-hTPOR clone 63, которую рассевали в первый день и вносили растительную концентраций нейтрализующих антител с константной концентрацией ромиплостима, затем на второй день детектировали хемилюминесценцию. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 9.

Результаты и обсуждение. Продемонстрированы показатели специфичности методики; в максимальной концентрации препарат отличается от плацебо в 309 раз по остаточному уровню жизнеспособности клеток. Линейность методики по коэффициенту детерминации 0,9969. Определена прецизионность методики: сходимость составила 1–9 %, внутрилабораторная прецизионность – 3–18 %. Коэффициент вариации селективности методики составил 22 %. Для параметра «правильность» определены значения «внесено/найдено» на уровне 90–101 %. Доказано отсутствие эффекта матрицы.

Заключение. Можно утверждать, что методика является линейной, специфичной, высокопрецизионной, правильной, селективной и с доказанным отсутствием эффекта матрицы, что позволяет применять ее для определения иммуногенности препаратов ромиплостим при проведении клинических исследований.

Ключевые слова: антитела к лекарственному препарату, биоаналог, исследования нейтрализующих антител, клинические испытания иммуногенности, валидация, определение жизнеспособности клеток, антитела к ромиплостиму

Конфликт интересов. Исследование *in vitro* было организовано ЗАО «Фарм-Холдинг», которое входит в группу компаний ООО «ГЕРОФАРМ».

Вклад авторов. А. Н. Афанасьева – написание и редактирование текста, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*. В. Б. Сапарова – разработка дизайна исследования *in vitro*, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*, редактирование текста. И. Е. Макаренко – критический пересмотр содержания статьи, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*. Т. А. Сельменских – постановка экспериментов *in vitro*. Д. В. Куркин – интерпретация результатов исследования *in vitro*, утверждение текста. А. Л. Хохлов – интерпретация результатов исследования *in vitro*, утверждение текста. Р. В. Драй – утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Спонсор не оказывал влияния на ход исследования и интерпретацию результатов.

Соответствие принципам этики. Исследования проведены на клеточной линии *in vitro*.

Для цитирования: Афанасьева А. Н., Сапарова В. Б., Макаренко И. Е., Сельменских Т. А., Куркин Д. В., Хохлов А. Л., Драй Р. В. Опыт проведения валидации методики оценки нейтрализующих антител ромиплостима в плазме крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):247–255. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1531

© Афанасьева А. Н., Сапарова В. Б., Макаренко И. Е., Сельменских Т. А., Куркин Д. В., Хохлов А. Л., Драй Р. В., 2024
© Afanaseva A. N., Saparova V. B., Makarenko I. E., Selmenskikh T. A., Kurkin D. V., Hohlov A. L., Drai R. V., 2024

Experimental Validation a Method for Assessing Neutralizing Antibodies of Romiplostim in Human Plasma

Alina N. Afanaseva[1]✉, Valeria B. Saparova[1, 2], Igor E. Makarenko[1, 2], Tatiana A. Selmenskikh[1], Denis V. Kurkin[2], Alexander L. Hohlov[3], Roman V. Drai[1]

[1] Closed Joint Stock Company "Pharm-Holding". 34A, Svyazi str., Strelna village, Saint-Petersburg, 198515, Russia
[2] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russion Federation. 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russia
[3] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 5, Revolyucionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

✉ **Corresponding author:** Alina N. Afanaseva. **E-mail:** Alina.Afanaseva@geropharm.com

ORCID: Alina N. Afanaseva – https://orcid.org/0000-0002-1443-4294; Valeria .B. Saparova – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129; Igor E. Makarenko – https://orcid.org/0000-0003-2308-0608; Tatiana A. Selmenskikh – https://orcid.org/0000-0001-7073-311X; Denis V. Kurkin – https://orcid.org/0000-0002-1116-3425; Alexander L. Hohlov – https://orcid.org/0000-0002-0032-0341; Roman V. Drai – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Received: 25.08.2023 **Revised:** 19.02.2024 **Published:** 20.02.2024

Abstract

Introduction. Romiplostim is an analogue of the fusion protein peptide of thrombopoietin (TPO), which increases platelet count by binding and activating the human thrombopoietin receptor (TPO-R). It is used to treat thrombocytopenia associated with chronic immune thrombocytopenia. For romiplostim, one of the possible adverse reactions from the immune system is immunogenicity: the production of anti-drug antibodies to the medicinal product, including neutralising antibodies, which may affect the efficacy and safety profile of the medicinal product.

Aim. Validate the procedure for determining neutralising antibodies to romiplostim in human plasma for further clinical studies of immunogenicity.

Materials and methods. The study used rabbit polyclonal antibodies to romiplostim, Nplate® produced by Amgen Europe as a standard sample; a placebo produced by LLC "GEROPHARM", a cell line 32D-hTPOR clone 63 with stable expression of human TPO receptor and a chemiluminescence assay kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay produced by Promega to assess specificity. The experiment was carried out on cell line 32D-hTPOR clone 63, which was seeded on the first day and the neutralizing antibody concentrations were titrated with a constant concentration of romiplostim, then the chemiluminescence was detected on the second day. Statistical processing of the results was carried out using Prism 9 software.

Result and discussion. The specificity of the procedure was demonstrated; at maximum concentration, the medicinal product differs from placebo by 309 times in the residual level of cell viability. The linearity of the procedure in terms of the coefficient determination is 0.9969. The precision of the procedure was determined: the repeatability was 1–9 %, the intermediate precision was 3–18 %. The coefficient of variation in selectivity of the procedure was 22 %. For the accuracy parameter, the values for recovery/spike were determined as 90–101 %. It was proven that there was no matrix effect.

Conclusion. It can be stated that the procedure is linear, specific, highly precise, correct, selective and with a proven absence of matrix effect, which allows it to be used to determine the immunogenicity of romiplostim medicinal products in clinical studies.

Keywords: anti-drug antibodies, biosimilar, neutralizing antibody studies, clinical studies of immunogenicity, validation, cell viability determination, antibodies to romiplostim

Conflict of interest. The *in vitro* study was organized by CJSC "Pharm-Holding", which is part of the LLC "GEROPHARM" group of companies.

Contribution of the authors. Alina N. Afanaseva – writing and editing the text, analysis and interpretation of *in vitro* study results. Valeria B. Saparova – development of *in vitro* study design, analysis and interpretation of *in vitro* study results, text editing. Igor E. Makarenko – critical revision of the content of the article, analysis and interpretation of the results of the *in vitro* study. Tatyana A. Selmenskikh – setting up *in vitro* experiments. Kurkin V. Denis – interpretation of *in vitro* study results, approval of the text. Alexander L. Khokhlov – interpretation of the results of the *in vitro* study, approval of the text. Roman V. Drai – approval of the final version of the article for publication.

Funding. The work was carried out with the financial support of LLC "GEROPHARM". The sponsor had no influence on the course of the study or interpretation of the results.

Compliance with the principles of ethics. The studies were carried out on a cell line *in vitro*.

For citation: Afanaseva A. N., Saparova V. B., Makarenko I. E., Selmenskikh T. A., Kurkin D. V., Hohlov A. L., Drai R. V. Experimental validation a method for assessing neutralizing antibodies of romiplostim in human plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(1):247–255. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1531

ВВЕДЕНИЕ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) – это состояние низкого количества тромбоцитов (тромбоцитопения) по неизвестной причине (идиопатическая). Поскольку большинство причин связано с антителами против тромбоцитов, она также известна как иммунная тромбоцитопеническая пурпура [1]. Этиология ИТП опосредована аутоантителами (обычно иммуноглобулином G) [2], и у пациентов с ИТП вырабатываются аутоантитела к белкам мембраны тромбоцитов [3]. ИТП – это заболевание, которое влияет на общее количество тромбоцитов в крови, а не на их функцию [1, 4]. Смертность от ИТП у взрослых лишь немного выше, чем в сопоставимой по возрасту популяции, и в основном об-

условлена осложнениями от кровотечений, как и у детей [5]. Большинство пациентов с ИТП чаще умирают от состояний, не связанных с ИТП, чем от осложнений ИТП или лечения [5].

В качестве терапии рекомендуется использовать агонисты рецепторов тромбопоэтина, например ромиплостим, который представляет собой слитый белок Fc-пептид для подкожного введения, содержащий два пептида из 14 аминокислот, стабилизированных путем связывания с Fc-доменом иммуноглобулина G, который связывается с рецептором ТПО и активирует его [6]. Аминокислотная последовательность ромиплостима не имеет гомологии последовательностей с эндогенным тромбопоэтином [7–9]. Он связывается так же, как эндогенный ТРО, и может вытеснять ТРО из связи с рецептором. Ромиплостим, аналогично ТРО, активирует внутриклеточные сигнальные пути, что приводит к устойчивому повышению количества тромбоцитов [7, 10–12].

Способность биологической терапии индуцировать нейтрализующие антитела (НА) в клинических исследования общепризнана, и ожидается, что она будет проявляться в некоторой степени даже для полностью человеческих белков [13]. Сами по себе НА могут оказывать значительное влияние на биодоступность, эффективность и безопасность белкового терапевтического средства, и, соответственно, тестирование на иммуногенность требуется до получения разрешения регулирующих органов. Важно использовать чувствительные, специфичные и валидированные методы для обнаружения НА. Принцип анализа нейтрализующей активности препарата основывается на том, что любой образец, содержащий НА, будет ингибировать биологическую активность, связанную с фиксированной концентрацией лекарственного средства, и это может быть достигнуто с помощью клеточного анализа, в котором используется линия, экспрессирующая рецептор [14]. Отмечено, что ромиплостим обладает меньшей иммуногенностью, чем рекомбинантный тромбопоэтин человека и рекомбинантный фактор роста мегакариоцитов человека, так как вырабатывающиеся в ответ на введение данных препаратов антитела нивелировали их клинический эффект [15], и существует необходимость также подтвердить это для биоаналога. Определение положительных результатов для пациентов принято рассчитывать по пороговому значению, для которого в ходе анализа 30 индивидуальных образцов интактной плазмы крови человека оценивается уровень НА. Эти образцы являются реактивными (часто называемыми потенциально положительными) на присутствие антител к лекарственному препарату; тем не менее некоторые из них могут быть неспецифичными из-за 1 % ложноположительных результатов, поэтому при использовании непараметрического подхода необходимо оценивать выбросы [16, 17].

Валидация биоаналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач. Соблюдение принципов валидации обеспечивает надежность данных, получаемых в процессе разработки и экспертизы качества лекарственных препаратов на рынке как химических, так и биологических препаратов[1, 2, 3].

Цель

Валидировать методику определения нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека методом, основанным на использовании трансгенной клеточной системы с детекцией продукта по хемилюминесценции для дальнейшего проведения клинических исследований иммуногенности. В рамках валидации были поставлены задачи: определение оптимального значения концентрации ромиплостима для максимальной индукции люминесценции, оценка валидационных параметров (линейность, специфичность, правильность, селективность, эффект матрицы, сходимость и внутрилабораторная прецизионность) и заключение о применимости методики для клинических исследований иммуногенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали поликлональные антитела кролика к ромиплостиму (ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России), в качестве стандартного образца брали Энплейт® (Nplate, лиофилизат для приготовления раствора 250 мкг, Amgen Europe, B.V., серия 1107017A, годен до 02.2024), для оценки специфичности брали плацебо (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия). Тест-система – это клеточная линия лимфобластов мыши *Mus musculus* со стабильной экспрессией ТРО-рецептора человека 32D-hTPOR cell line, clone 63 (далее 32D-hTPOR clone 63), которая способна к дозозависимой пролиферации под действием агонистов тромбопоэтинового рецептора. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (кат. № 1.3.4, ООО «БиолоТ», Россия) + 2 мМ L-глутамина (кат. № Ф032, НПП «ПанЭко», Россия) с содержанием 1,5 г/л бикарбоната натрия (кат. № S5761 Sigma-Aldrich, США), 4,5 г/л глюкозы (кат. № 141341, PanReac AppliChem, Германия), 10 мМ ХЕПЕС (кат. № 1.2.6.1, ООО «БиолоТ», Россия) и 1 мМ пирувата

[1] ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Доступно по: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskih-metodik/ Ссылка активна на 25.08.2023.

[2] ICH Topic Q 2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. EMA; 2006. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-step-5-first-version_en.pdf. Accessed: 25.08.2023.

[3] 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.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411942/cncd_21112016_85. Ссылка активна на 25.08.2023.

натрия (кат. № 1.4.004, ООО «БиолоТ», Россия), далее RPMI Basal с добавлением 10%-й эмбриональной бычьей сыворотки FBS (кат. № FBS-11A, Capricorn Scientific GmbH, Германия) 5 нг/мл IL-3 (кат. № I4144, Sigma-Aldrich, США) и 0,3 мг/мл гигромицина B (кат. № Hyg-H, Capricorn Scientific GmbH, Германия).

В исследовании использовали среду без IL-3 и гигромицина B, так как эти растворы влияют на пролиферативную активность. Изначально готовили растворы Энплейта® и нейтрализующих антител кролика к ромиплостиму в среде RPMI Basal + 10 % FBS, где концентрация препарата была 1 нг/мл, а для антител брали растительную концентраций от 1 до 5000 нг/мл. Клетки 32D-hTPOR clone 63 рассевали в 96-луночные белые планшеты по 5000 клеток на лунку в среде RPMI Basal + 10 % FBS. Смесь препарата, антител и клеток инкубировали при 37 °C и 5 % CO_2 24 ± 4 часа, остужали до комнатной температуры в течение 1 часа и снимали хемилюминесценцию с помощью набора CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (кат. № G7571, Promega) согласно инструкции производителя. Регистрировали люминесценцию на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия). Анализ данных проводился в интегрированном программном обеспечении MARS Data Analysis, а статистический анализ – в программе GraphPad Prism 9.3.1 (471), где нормировали данные в процентах относительно нулевого контроля, затем строили четырехпараметрическую кривую зависимости «доза – реакция» для подсчета величины IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования).

Валидационные параметры. Критерии валидации были подобраны согласно Государственной фармакопее Российской Федерации, рекомендациям Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) и EMA. Процедура валидации включала оценку специфичности, линейности, селективности, сходимости, внутрилаборатрной прецизионности и определение эффекта матрицы методики. Для оценки специфичности рассматривали методику «Пролиферативная активность ромиплостима» [18], на основе которой была разработана методика нейтрализующих антител ромиплостима, поскольку действие нейтрализующих антител основано на снижении количества молекул ромиплостима в растворе, доступных для связывания с рецептором, данные применимы в рамках данной валидации. В специфичности оценивали сигнал при растительной концентрации Энплейта® и аналогичной растительной плацебо. Линейность методики определения концентрации НА к ромиплостиму в плазме крови человека устанавливали с учетом константной концентрации ромиплостима. Для этого были выполнены измерения при добавлении растительной концентраций Энплейта® без внесения НА. Прецизионность методики оценивали по сходимости и внутрилабораторной прецизионности, в которых оценивали коэффициент вариации (CV) для каждой точки концентрации НА с добавлением константной концентрации ромиплостима. Селективность методики оценивали для 6 образцов бланковой пулированной плазмы крови человека, где были внесены НА на уровне минимальной концентрации линейного диапазона методики. Правильность оценивали по результатам для образцов внутреннего контроля (ВКО) с внесенными концентрациями НА 75, 150 и 300 нг/мл. Эффект матрицы сравнивали для результатов, полученных при разведении калибровочных проб в культуральной среде и плазме крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методика оценки нейтрализующих антител к ромиплостиму применялась ранее на клинических образцах [19–21], где было показано, что нейтрализующие антитела к ромиплостиму развивались у малого количества пациентов. Однако в исследовании не было указаний о проведении валидации представленных методик, что необходимо при анализе клинических образцов. В данном исследовании мы провели валидацию и доказали применимость методики для оценки нейтрализующих антител к ромиплостиму в клинических исследованиях иммуногенности.

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Для определения линейности методики НА к ромиплостиму в плазме крови человека необходимо определить константную концентрацию ромиплостима. Для этого были выполнены измерения при добавлении растительной концентраций ромиплостима без внесения НА. Зависимость пролиферации клеток и уровня люминесценции от концентрации ромиплостима описывается 4-параметрической логистической функцией и имеет график сигмоидальной кривой с логарифмической обработкой. С учетом особенностей 4-параметрической кривой получение количественных значений концентраций, отношения откликов RFU (относительные единицы флуоресценции или ОЕФ) которых превышают верхнее допустимое значение (top, верхнее плато), а также концентраций, отношения откликов RFU которых меньше нижнего допустимого значения (bottom, нижнее плато), невозможно, поэтому количественному анализу был подвергнут линейный диапазон кривой. В качестве оптимальной была выбрана максимальная концентрация ромиплостима, лежащая в линейном диапазоне отклика и определяющаяся с достаточной правильностью. График зависимости ответа в RFU от концентрации ромиплостима в нг/мл и его основные характеристики представлены на рисунке 1.

Данное испытание было выполнено в ходе разработки и адаптации методики, при этом было проанализировано 11 концентраций ромиплостима в

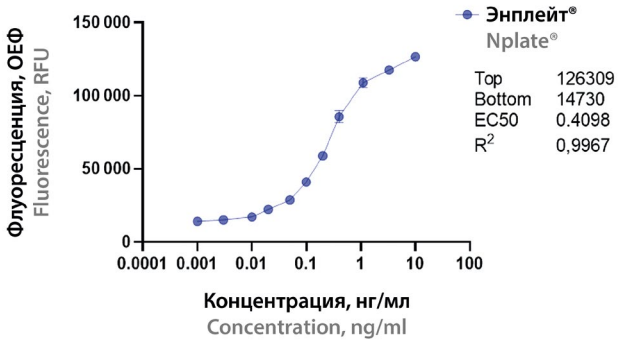


Рисунок 1. График зависимости концентрации ромиплостима и сигнала флуоресценции.

Top – верхнее плато сигнала; bottom – нижняя граница сигнала; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; R^2 – коэффициент детерминации. Данные представлены в виде Mean ± SD

Figure 1. Graph of romiplostim concentration and fluorescence signal.

Top – upper limit of the signal; bottom – lower limit of the signal; EC_{50} – half-maximum effective concentration; R^2 – coefficient of determination. Data are presented as Mean ± SD

диапазоне 0,001–10 нг/мл, из них 5 в диапазоне концентраций 0,05–1 нг/мл попали в линейную область графика. Правильность определения для данных концентраций представлена в таблице 1.

Таблица 1. Зависимость отклика RFU от концентраций ромиплостима

Table 1. RFU response versus romiplostim concentrations

Внесено, нг/мл Added, ng/ml	Сигнал, ОЕФ Signal, RFU	Найдено, нг/мл Found, ng/ml	Открываемость, % Recovery, %
0	13 778	n/a	n/a
0,001	14 250	n/a	n/a
0,003	15 187	n/a	n/a
0,01	17 156	n/a	n/a
0,02	22 316	n/a	n/a
0,05	28 781	0,05	102
0,1	41 006	0,10	97
0,2	58 990	0,19	93
0,4	85 741	0,43	108
1,1	108 912	1,14	103
3,3	117 578	n/a	n/a
10	126 687	n/a	n/a

Примечание. n/a – значение не найдено. «Открываемость» – соотношение между полученным средним и истинным значениями, показатель правильности, который отражается в процентах.

Note. n/a – the value was not found. "Recovery" – this is the ratio between the obtained average and the true values, an indicator of correctness, which is reflected in percentage.

Представленные данные демонстрируют, что оптимальной концентрацией ромиплостима является 1 нг/мл, выбранной концентрации соответствует максимальный ответ в линейном диапазоне, правильность определения составила 103 %. Концентрация ромиплостима 1 нг/мл была использована во всех дальнейших экспериментах.

Для валидируемого метода определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека назначена нелинейная зависимость на всем диапазоне концентраций НА (1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1250, 2500 и 5000 нг/мл). Экспериментальные данные моделируются функцией, являющейся нелинейной комбинацией параметров модели и зависящей от одной и более независимых переменных. Линейный диапазон методики – 25, 50, 100, 250, 500 и 1250 нг/мл.

На рисунке 2 представлены результаты в виде графика зависимости RFU от концентрации НА с константной концентрацией ромиплостима 1 нг/мл, приведен коэффициент детерминации.

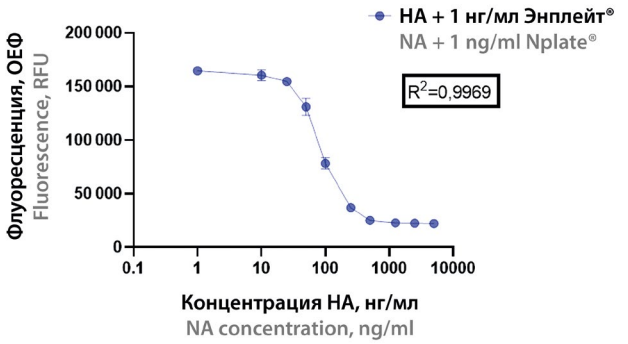


Рисунок 2. График зависимости концентрации НА с константной концентрацией ромиплостима 1 нг/мл и сигнала флуоресценции; R^2 – коэффициент детерминации. Данные представлены в виде Mean ± SD

Figure 2. Graph of the dependence of the concentration of NA with a constant concentration of romiplostim 1 ng/ml and the fluorescence signal; R^2 – coefficient of determination. Data are presented as Mean ± SD

С помощью метода наименьших квадратов была выбрана 4-параметрическая кривая как функция, наиболее близко описывающая зависимость результатов теста от концентрации антител. Для методики показано соответствие модели в диапазоне концентраций НА 1–5000 нг/мл.

Специфичность тест-системы, используемой в биоаналитической методике, определяется возможностью с ее помощью достоверно отличать действующее вещество от примесных соединений, продуктов его деградации и вспомогательных веществ. Параметр рассматривали для методики «Пролиферативная активность ромиплостима», на основе которой была разработана методика количественного определения нейтрализующих антител к ромиплостиму. Оценивали специфичность клеточного ответа на предъявление ромиплостима, поскольку действие нейтрализующих антител основано на снижении ко-

личества молекул ромиплостима в растворе, доступных для связывания с рецептором, данные применимы в рамках текущей валидации. В рамках проведенной валидации проанализировали ответ клеточной линии 32D-hTPOR clone 63 на стимуляцию растворами Энплейт® и плацебо ромиплостима (рисунок 3, таблица 2). Оценивали уровень пролиферативной активности клеточной линии в 11 концентрационных точках ромиплостима. Для плацебо использовали разведения, идентичные разведениям препарата каждой концентрации. Результаты нормализовали по шкале от 0 до 100 %, где за 0 % принимался уровень пролиферации клеток без внесения исследуемых объектов, а за 100 % – максимальный уровень пролиферации в ответ на стимуляцию Энплейтом®.

Согласно результатам значения для плацебо ромиплостима более чем в 309 раз отличаются от таковых для растворов, имеющих в составе лекарственное вещество (ромиплостим). Ответ тест-системы клеток линии 32D-hTPOR clone 63 специфичен по отношению к препарату ромиплостим.

Прецизионность характеризует степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит от случайных факторов и выражается величиной стандартного отклонения – коэффициентом вариации (CV). Во всех экспериментах для стимуляции пролиферативной активности использовали ромиплостим в концентрации 1 нг/мл и растворовку концентраций нейтрализующих антител к ромиплостиму в диапазоне концентраций 1–5000 нг/мл. Сходимость (повторяемость) характеризует степень согласованности результатов измерений, полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же исследователем, с использованием одного и того же оборудования, т. е. проведенных в идентичных условиях. В рамках проведенной валидации методики была оценена повторяемость по значениям RFU в эксперименте для десяти концентраций, каждая из которых в 4 повторах (таблица 3).

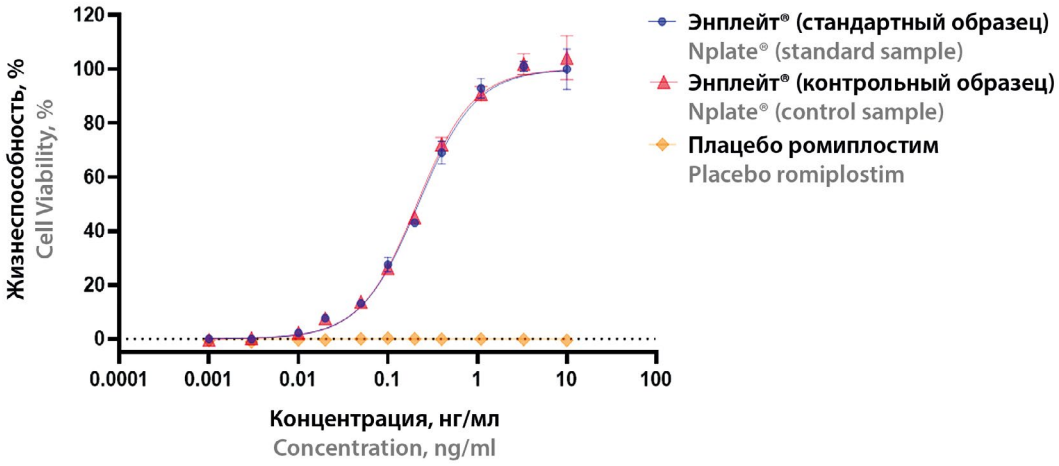


Рисунок 3. Специфичность ответа клеточной линии 32D-hTPOR clone 63. На графике представлена зависимость уровня пролиферации клеток 32D-hTPOR clone 63 от концентрации исследуемого объекта, данные представлены в виде Mean ± SD

Figure 3. The specificity of the response of the 32D-hTPOR clone 63 cell line. The graph shows the dependence of the level of proliferation of 32D-hTPOR clone 63 cells on the concentration of the test object, the data are presented as Mean ± SD

Таблица 2. Пролиферативная активность клеток 32D-hTPOR clone 63

Table 2. Proliferative activity of 32D-hTPOR clone 63 cells

	Концентрация исследуемого объекта, нг/мл Concentration of the object under study, ng/ml										
	0,001	0,003	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,4	1,1	3,3	10
	Пролиферативная активность, % (Mean, *n* = 8) Proliferative activity, % (Mean, *n* = 8)										
Энплейт® Nplate®	–0,2	0,1	2,3	7,6	13,4	26,9	44,1	70,6	91,9	101,5	102,1
Плацебо Placebo	–0,62	–1,16	–0,43	–0,42	0,02	0,27	0,02	–0,18	–0,11	–0,26	–0,58

Примечание. Представлены нормализованные данные уровня пролиферативной активности, %. Для каждой концентрации представлено среднее значение по 8 повторностям.

Note. Normalized data on the level of proliferative activity, % are presented. For each concentration, the mean value over 8 replicates is presented.

Таблица 3. Сходимость для методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека

Table 3. Repeatability for the method for determining the concentration of neutralizing antibodies to romiplostim in human plasma

Концентрация НА, нг/мл NA concentration, ng/ml	ОЕФ RFU			Среднее ОЕФ Mean RFU	CV, %
1	162225	169187	162600	164671	2
10	155937	159737	165950	160541	3
25	155737	154575	153800	154704	1
50	122250	138112	132737	131033	6
100	72150	81537	81087	78258	7
250	33987	36200	40662	36950	9
500	23812	24662	26837	25104	6
1250	22462	21687	23962	22704	5
2500	22137	21712	23312	22387	4
5000	20850	22762	22450	22021	5

Примечание. CV – коэффициент вариации; ОЕФ/RFU – относительные единицы флуоресценции

Note. CV – coefficient of variation; RFU – relative fluorescence units

Сходимость методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека по результатам испытания составила от 1 до 9 %. **Внутрилабораторная прецизионность (промежуточная)** оценивается в условиях работы одной лаборатории с изменением условий проведения эксперимента. В рамках валидации проанализировали внутрилабораторную прецизионность с изменением дня постановки эксперимента (таблица 4).

Внутрилабораторная прецизионность методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека составляет от 3 до 18 %.

Селективность – это способность биоаналитической методики определять и различать исследуемое анализируемое вещество и внутренний стандарт в присутствии компонентов, которые могут содержаться в образце. Для выполнения теста на селективность в 6 образцов бланковой пулированной плазмы человека были внесены НА на уровне минимальной концентрации линейного диапазона определения (75 нг/мл). Концентрацию определяли по калибровочной кривой, описанной НА (таблица 5).

Таблица 5. Селективность для методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека

Table 5. Selectivity for the method for determining the concentration of neutralizing antibodies to romiplostim in human plasma

№	Внесено, нг/мл Added, ng/ml	Найдено, нг/мл Found, ng/ml	CV, %
1	75	70,42	22
2		78,58	
3		109,2	
4		111,34	
5		93,89	
6		66,69	

Примечание. CV – коэффициент вариации.

Note. CV – coefficient of variation.

Селективность на уровне коэффициента вариации в 22 % и биоаналитическая методика определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека методом, осно-

Таблица 4. Внутрилабораторная прецизионность (разные дни) для методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека

Table 4. Intralaboratory Precision (various days) for the method for determining the concentration of neutralizing antibodies to romiplostim in human plasma

ОЕФ RFU						Среднее ОЕФ Mean RFU	CV, %
17.11.2021-18.11.2021			08.12.2021-09.12.2021				
117281	118618	128993	162225	169187	162600	143151	17
112368	114193	122356	155937	159737	165950	138424	18
107731	111556	120631	155737	154575	153800	134005	17
98443	97793	110893	122250	138112	132737	116705	15
65781	68168	77918	72150	81537	81087	74440	9
29368	30418	37156	33987	36200	40662	34632	12
22793	23356	25731	23812	24662	26837	24532	6
20181	20718	21106	22462	21687	23962	21686	6
22306	21543	22231	22137	21712	23312	22207	3
22393	22006	22956	20850	22762	22450	22236	3

Примечание. CV – коэффициент вариации, ОЕФ/RFU – относительные единицы флуоресценции

Note. CV – coefficient of variation, RFU – relative fluorescence units

ванным на использовании трансгенной клеточной системы с детекцией продукта по хемилюминесценции, является селективной.

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное (номинальное). Правильность оценивали по результатам постановок анализа в дубликатах с использованием образцов ВКО с внесенной концентрацией НА 75, 150 и 300 нг/мл. (таблица 6).

Таблица 6. Правильность для методики определения концентрации нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека

Table 6. Accuracy for the method for determining the concentration of neutralizing antibodies to romiplostim in human plasma

Внесено, нг/мл Added, ng/ml	75	150	300
Найдено, нг/мл Found, ng/ml	70,4	160,7	309,2
	78,6	173,7	359,9
Среднее, нг/мл Mean, ng/mL	74,5	167,2	334,6
Открываемость, % Recovery, %	101	90	90

Примечание. CV – коэффициент вариации, «Среднее» – среднее арифметическое, «Открываемость» – соотношение между полученным средним и истинным значениями, показатель правильности, который отражается в процентах.

Note. CV – coefficient of variation, Mean – arithmetic mean, Recovery – this is the ratio between the obtained average and the true values, an indicator of correctness, which is reflected in percent.

Значения, рассчитанные с помощью валидируемой методики, соответствуют номинальным на 90–101 %. Методика определения нейтрализующих антител к ромиплостиму в плазме крови человека позволяет правильно определять их концентрацию в анализируемом растворе.

Эффект матрицы – прямое или опосредованное влияние на результаты анализа, обусловленное наличием в биологическом образце других, отличных от целевого аналита, веществ. При проведении валидационного теста сравнивали результаты, полученные при разведении калибровочных проб в культуральной среде и плазме крови человека. Для минимизации эффекта матрицы и стандартизации условий проведения анализа все анализируемые образцы разбавляли в культуральной среде в 40 раз. Результат оценивали по калибровочным кривым с ответом по первичным данным RFU и нормализованным данным (рисунок 4).

Согласно результатам плазма крови человека снижает клеточный ответ и соответствующую хемилюминесценцию на уровне верхнего плато даже при разведении в 40 раз, при этом профиль полученной кривой при нормализации данных не меняется. Поскольку дальнейшее разведение могло повлиять на точность и правильность полученных данных от целевых молекул, было принято решение исключить эффект матрицы разведением калибровочных образцов и образцов ВКО в RPMI Basal при постановке методики в пулированной плазме крови человека, как наиболее близкой матрице.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенной работы методика определения нейтрализующих антител к ромиплостиму была оценена по всем основным валидационным параметрам. В качестве матрицы использовали плазму крови человека, в качестве тест-системы – трансгенную клеточную линию 32D-hTPOR clone. Определение жизнеспособности клеток проводилось с детекцией продукта по хемилюминесценции. Были выбраны концентрации нейтрализующих антител от 1 до 5000 нг/мл и концентрация ромиплостима 1 нг/мл. Полученные значения линейности, специфичности, прецизионности, правильности, селективности и эффекта матрицы позволяют применять ее для определения иммуногенности препаратов ромиплостим при проведении клинических исследований.

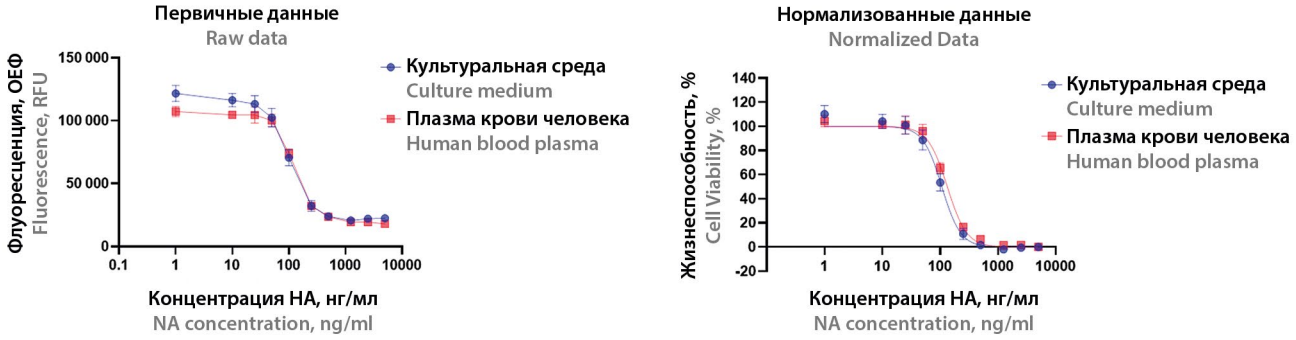


Рисунок 4. Эффект матрицы. На графике представлена зависимость уровня пролиферации клеток линии 32D-hTPOR clone 63 от концентрации НА при стабильной концентрации ромиплостима 1 нг/мл, данные представлены в виде Mean ± SD

Figure 4. Matrix effect. The graph shows the dependence of the level of proliferation of 32D-hTPOR clone 63 cells on the concentration of NA at a stable concentration of romiplostim 1 ng/ml, the data are presented as Mean ± SD

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kayal L., Jayachandran S., Singh K. Idiopathic thrombocytopenic purpura. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2014;5(3):410–414. DOI: 10.4103/0976-237X.137976.
2. Provan D., Arnold D. M., Bussel J. B., Chong B. H., Cooper N., Gernsheimer T., Ghanima W., Godeau B., González-López T. J., Grainger J., Hou M., Kruse C., McDonald V., Michel M., Newland A. C., Pavord S., Rodeghiero F., Scully M., Tomiyama Y., Wong R. S., Zaja F., Kuter D. J. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Advances*. 2019;3(22):3780–3817. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000812.
3. Zufferey A., Kapur R., Semple J. Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP). *Journal of Clinical Medicine*. 2017;6(2):16. DOI: 10.3390/jcm6020016.
4. Pietras N. M., Pearson-Shaver A. L. Immune Thrombocytopenic Purpura. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*; 2022.
5. Neunert C., Noroozi N., Norman G., Buchanan G. R., Goy J., Nazi I., Kelton J. G., Arnold D. M. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(3):457–464. DOI: 10.1111/jth.12813.
6. Soff G. A., Miao Y., Bendheim G., Batista J., Mones J. V., Parameswaran R., Wilkins C. R., Devlin S. M., Abou-Alfa G. K., Cercek A., Kemeny N. E., Sarasohn D. M., Mantha S. Romiplostim Treatment of Chemotherapy-Induced Thrombocytopenia. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(31):2892–2898. DOI: 10.1200/JCO.18.01931.
7. Bussel J. B., Soff G., Balduzzi A., Cooper N., Lawrence T., Semple J. W. A Review of Romiplostim Mechanism of Action and Clinical Applicability. *Drug Design, Development and Therapy*. 2021;15:2243–2268. DOI: 10.2147/DDDT.S299591.
8. Kuter D. J. Romiplostim. In: Lyman G. H., Dale D. C., editors. Hematopoietic Growth Factors in Oncology. New York: Springer; 2011. P. 267–288. DOI: 10.1007/978-1-4419-7073-2_16.
9. Yang A. S. Development of romiplostim: a novel engineered peptibody. *Seminars in Hematology*. 2015;52(1):12–15. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2014.10.007.
10. Bussel J.B., Kuter D. J., George J. N., McMillan R., Aledort L. M., Conklin G. T., Lichtin A. E., Lyons R. M., Nieva J., Wasser J. S., Wiznitzer I., Kelly R., Chen C.-F., Nichol J. L. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(16):1672–1681. DOI: 10.1056/NEJMoa054626.
11. Kuter D. J., Bussel J. B., Lyons R. M., Pullarkat V., Gernsheimer T. B., Senecal F. M., Aledort L. M., George J. N., Kessler C. M., Sanz M. A., Liebman H. A., Slovick F. T., de Wolf J. T. M., Bourgeois E., Guthrie T. H., Newland A., Wasser J. S., Hamburg S. I., Grande C., Lefrère F., Lichtin A. E., Tarantino M. D., Terebelo H. R., Viallard J.-F., Cuevas F. J., Go R. S., Henry D. H., Redner R. L., Rice L., Schipperus M. R., Guo D. M., Nichol J. L. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. *The Lancet*. 2008;371(9610):395–403. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60203-2.
12. Shirasugi Y., Ando K., Miyazaki K., Tomiyama Y., Okamoto S., Kurokawa M., Kirito K., Yonemura Y., Mori S., Usuki K., Iwato K., Hashino S., Wei H., Lizambri R. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized Phase III clinical trial. *International Journal of Hematology*. 2011;94(1):71–80. DOI: 10.1007/s12185-011-0886-8.
13. Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: Clinical implications and future prospects. *Clinical Therapeutics*. 2002;24(11):1720–1740. DOI: 10.1016/s0149-2918(02)80075-3.
14. Civoli F., Kroenke M. A., Reynhardt K., Zhuang Y., Kaliyaperumal A., Gupta S. Development and optimization of neutralizing antibody assays to monitor clinical immunogenicity. *Bioanalysis*. 2012;4(22):2725–2735. DOI: 10.4155/bio.12.239.
15. Chalmers S., Tarantino M. D. Romiplostim as a treatment for immune thrombocytopenia: a review. *Journal of Blood Medicine*. 2015;6:37–44. DOI: 10.2147/JBM.S47240.
16. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y. C., Bowsher R., Finco-Kent D., Fiscella M., Gorovits B., Kirschner S., Moxness M., Parish T., Quarmby V., Smith H., Smith W., Zuckerman L. A., Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;48(5):1267–1281. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.09.020.
17. Shen M., Dai T. Statistical methods of screening cut point determination in immunogenicity studies. *Bioanalysis*. 2021;13(7):551–563. DOI: 10.4155/bio-2019-0296.
18. Arefeva A. N., Makarenko I. E., Saparova V. B., Karal-ogli D. D., Afanaseva A. N., Dorotenko A. R., Kalatanova A. V., Kurkin D. V., Khokhlov A. L., Drai R. V. Comparability of biosimilar romiplostim with originator: Protein characterization, animal pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Biologicals*. 2023;81:101666. DOI: 10.1016/j.biologicals.2023.101666.
19. Jawa V., Hokom M., Hu Z., El-Abaadi N., Zhuang Y., Berger D., Gupta S., Swanson S. J., Chirmule N. Assessment of immunogenicity of romiplostim in clinical studies with ITP subjects. *Annals of Hematology*. 2010;89(1):75–85. DOI: 10.1007/s00277-010-0908-2.
20. Mytych D. T., Park J. K., Kim J., Barger T. E., Boshier A., Jawa V., Kuter D. J. Assessment of romiplostim immunogenicity in adult patients in clinical trials and in a global postmarketing registry. *British Journal of Haematology*. 2020;190(6):923–932. DOI: 10.1111/bjh.16658.
21. Fang Q., Huang F., Liang J., Chen Y., Li C., Zhang M., Wu X., Luo W. Safety of romiplostim and eltrombopag for children with immune thrombocytopenia: a pharmacovigilance study of the FDA adverse event reporting system database. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2023;22(8):707–714. DOI: 10.1080/14740338.2023.2182288.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«РЕГУЛЯТОРНАЯ ПРАКТИКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ» — «РЕГЛЕК 2024»

20–22 мая 2024 г., Москва

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

20 мая Сессия 1

Пленарный доклад

Секционные заседания

- Упрощенная процедура приведения в соответствие. Первый опыт
- Валидация методик: helicopter view правил ЕАЭС
- Внесение изменений в регистрационное досье
- Как оперативно удовлетворить потребности здравоохранения в лекарственных препаратах: подходы к упрощенной/ускоренной регистрации
- Регистрационные клинические исследования: важные вопросы планирования

21 мая Сессия 2

Секционные заседания

- Стратегия регистрации лекарственных препаратов: выбор и последствия
- Новый взгляд на проблему биоэквивалентности: актуальные требования ЕАЭС
- Изменения по процедуре ЕАЭС (качество ЛС). Типичные ошибки. Опыт экспертов
- Новый этап в развитии требований к маркировке и инструкции лекарственных препаратов
- Развитие систем инспектирования в процессе регистрации лекарственных средств

Круглый стол

- Актуальные вопросы качества лекарственных средств

22 мая Сессия 3

Секционные заседания

- Медицинская продукция в составе упаковок лекарственных препаратов: подходы к регулированию в ЕАЭС
- Тревожные меры для фармкомпании: отзыв/приостановка обращения лекарственных препаратов
- Внесение изменений в регистрационное досье и информационное взаимодействие в рамках ЕАЭС
- Вопросы перехода от биологических методик испытания лекарственных препаратов к инструментальным методам анализа. Современные подходы
- Развитие информатизации регистрационных процедур – настоящее и будущее
- Фармаконадзор

Круглый стол

- Актуальные вопросы экспертизы и регистрации лекарственных средств

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конференции оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков

РегЛек

Дополнительная информация на сайте www.fru.ru
и по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38, e-mail: fru@fru.ru

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

П. К. Карнакова[1]✉, Т. Н. Комаров[1, 2], О. А. Арчакова[1], Д. Ю. Ивкин[3], Е. С. Ветрова[1], И. И. Тернинко[3], И. Е. Шохин[1, 2], И. А. Наркевич[3]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН). 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
[3] 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, 14, лит. А

✉ **Контактное лицо:** Карнакова Полина Константиновна. **E-mail:** p.karnakova@cpha.ru

ORCID: П. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877;
О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Д. Ю. Ивкин – http://orcid.org/0000-0001-9273-6864;
Е. С. Ветрова – http://orcid.org/0000-0003-2219-5964; И. И. Тернинко – http://orcid.org/0000-0002-2942-1015;
И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630; И. А. Наркевич – http://orcid.org/0000-0002-5483-6626.

Статья поступила: 19.01.2024 **Статья принята в печать:** 26.02.2024 **Статья опубликована:** 26.02.2024

Резюме

Введение. Этмабен – перспективный препарат для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, тщательно изученный в ходе полного цикла доклинических исследований. Для проведения I фазы клинических исследований (КИ) необходимо разработать биоаналитическую методику, позволяющую количественно определять этмабен в плазме крови человека.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для последующего проведения фармакокинетического исследования.

Материалы и методы. Определение этмабена в плазме крови человека проводилось на хроматографе Nexera XR с масс-селективным детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Пробоподготовка осуществлялась путем осаждения белков ацетонитрилом. Внутренний стандарт: прометазин. Колонка: Luna C18, 100 Å, 50 × 2,00 мм, 5 мкм. Элюирование проводилось в градиентном режиме при скорости потока 1,00 мл/мин. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А), 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В). Время удерживания этмабена и прометазина около 1,18 и 1,15 мин соответственно. Общее время регистрации хроматограммы: 4,00 мин. Метод и режим ионизации: электроспрей; отрицательный режим для этмабена, положительный – для прометазина. Детектирование на масс-спектрометрическом детекторе осуществлялось путем мониторинга MRM-переходов (Multiple Reaction Monitoring): 249,90 → 92,15 m/z; 249,90 → 160,20 m/z (этмабен); 284,95 → 197,95 m/z (прометазин).

Результаты и обсуждение. Была проведена разработка первой методики определения этмабена в плазме крови человека, а также ее полная и частичная валидация согласно действующим требованиям нормативной документации.

Заключение. Разработана и валидирована методика определения этмабена в плазме крови человека с подтвержденным аналитическим диапазоном 0,250–30,000 мкг/мл. Подтвержденный аналитический диапазон методики по результатам частичной валидации составил 0,040–35,000 мкг/мл. Методика была успешно апробирована при проведении I фазы КИ и может применяться для других фармакокинетических исследований этмабена.

Ключевые слова: этмабен, ВЭЖХ-МС/МС, разработка, валидация, плазма крови, количественное определение, фармакокинетика

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

Вклад авторов. П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Е. С. Ветрова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики, а также в проведении аналитической части исследования. Д. Ю. Ивкин, И. И. Тернинко выполняли консультативную работу. И. Е. Шохин, И. А. Наркевич отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Ивкин Д. Ю., Ветрова Е. С., Тернинко И. И., Шохин И. Е., Наркевич И. А. Разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):257–271. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752

Development and Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Quantitative Determination of Etmaben in Human Blood Plasma

Polina K. Karnakova[1]✉, Timofey N. Komarov[1, 2], Olga A. Archakova[1], Dmitry Yu. Ivkin[3], Evgeniya S. Vetrova[1], Inna I. Terninko[3], Igor E. Shohin[1, 2], Igor A. Narkevich[3]

[1] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
[2] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
[3] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Polina K. Karnakova. **E-mail:** p.karnakova@cpha.ru

© Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Ивкин Д. Ю., Ветрова Е. С., Тернинко И. И., Шохин И. Е., Наркевич И. А., 2024
© Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Ivkin D. Yu., Vetrova E. S., Terninko I. I., Shohin I. E., Narkevich I. A., 2024

ORCID: Polina K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Dmitry Yu. Ivkin – http://orcid.org/0000-0001-9273-6864; Evgeniya S. Vetrova – http://orcid.org/0000-0003-2219-5964; Inna I. Terninko – http://orcid.org/0000-0002-2942-1015; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630; Igor A. Narkevich – http://orcid.org/0000-0002-5483-6626.

Received: 19.01.2024 **Revised:** 26.02.2024 **Published:** 26.02.2024

Abstract

Introduction. Etmaben is a promising drug for the treatment of cardiovascular diseases, widely studied in preclinical studies. In order to conduct phase I clinical trials, it is necessary to develop a bioanalytical method for the quantitative determination of etmaben in human blood plasma.

Aim. The aim of the study is to develop and validate a method for the quantitative determination of etmaben in human blood plasma using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS) for the pharmacokinetic study.

Materials and methods. The determination of etmaben in human blood plasma was carried out on a Nexera XR chromatograph with a mass-selective detector LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Japan). Sample preparation: precipitation with acetonitrile. Internal standard: promethazine. Column: Luna C18, 100 Å, 50 × 2.00 mm, 5 µm. Elution in gradient mode at a flow rate of 1.00 mL/min. Mobile phase: 0.1 % formic acid solution in water (eluent A), 0.1 % formic acid solution in acetonitrile (eluent B). Retention time for etmaben and promethazine is approximately 1.18 min and 1.15 min, respectively. Total chromatogram registration time: 4.00 min. Ionization method and mode: electrospray; negative mode for etmaben, positive mode for promethazine. Detection was carried out in the mode of multiple reaction monitoring (MRM): 249.90 → 92.15 m/z; 249.90 → 160.20 m/z (etmaben); 284.95 → 197.95 m/z (promethazine).

Results and discussion. We have developed, for the first time, a method for determining etmaben and performed its full and partial validation according to current regulatory requirements.

Conclusion. The method for determining etmaben in human blood plasma with a confirmed analytical range of 0.250–30.000 µg/mL has been developed and validated. The confirmed analytical range of the method based on the results of the partial validation was 0.040–35.000 µg/mL. The method was successfully applied in phase I clinical trials and can be used for other pharmacokinetic studies of etmaben.

Keywords: etmaben, HPLC-MS/MS, development, validation, blood plasma, quantitative determination, pharmacokinetics

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

Contribution of the authors. Polina K. Karnakova, Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Evgeniya S. Vetrova were involved in the development and validation of the bioanalytical method as well as in conducting the analytical part of the study. Dmitry Yu. Ivkin, Inna I. Terninko provided consulting work. Igor E. Shohin, Igor A. Narkevich were responsible for the organizational aspects of the study. All of the mentioned authors participated in the discussion of the obtained results in the form of a scientific discussion.

For citation: Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Ivkin D. Yu., Vetrova E. S., Terninko I. I., Shohin I. E., Narkevich I. A. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of etmaben in human blood plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(1):257–271. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей угрозой для здоровья населения во всех странах мира, включая Россию [1–3]. Ежегодно фиксируется более чем 17,9 млн смертей от ССЗ и прогнозируется, что к 2030 году смертность возрастет до 22,3 млн [4, 5]. Одно из основных клинических проявлений ССЗ – ишемическая болезнь сердца (ИБС), которая считается главной причиной инвалидности и смертности среди всех ССЗ, а также оказывает значительную нагрузку на систему здравоохранения [6–8]. Общее число летальных исходов от ИБС продолжает увеличиваться, что может быть связано с недостаточно эффективной и нерационально подобранной терапией данного заболевания [5, 8]. В связи с этим одной из наиболее приоритетных задач современной медицинской науки является поиск и создание новых лекарственных средств с кардиотропной активностью, применяемых для лечения ИБС [9].

Ишемическая болезнь сердца возникает вследствие нарушения баланса между потребностью миокарда в кислороде и его реальным кровоснабжением, что приводит к развитию гипоксии миокарда. При гипоксии миокарда снижается синтез молекул аденозинтрифосфата, который в норме синтезируется в митохондриях кардиомиоцитов в результате окислительных реакций и является основным энергетическим субстратом кардиомиоцитов, происходит снижение окисления глюкозы, повышение использования свободных жирных кислот (СЖК) и усиление процессов свободнорадикального окисления, вызывающих окислительный стресс. Данные процессы оказывают негативное воздействие на кардиомиоциты и приводят к их гибели [9–12].

Одним из наиболее перспективных способов лечения ИБС считается применение препаратов, воздействующих на внутриклеточные биохимические процессы: регулирование и восстановление энергетических процессов в клетках путем оптимизации использования кислорода миокардом за счет

усиления аэробного гликолиза и уменьшения интенсивности окисления СЖК, нивелирования последствий окислительного стресса и снижения потребности в кислороде. Для данной цели применяются препараты, которые наряду с антиангинальным действием имеют антиоксидантные и антигипоксантные эффекты и обеспечивают нормальное функционирование кардиомиоцитов в условиях сохраняющейся гипоксии [11, 13–15].

В исследованиях по изучению активности производных малоновой кислоты было спрогнозировано и обнаружено их выраженное антигипоксическое действие, что открывает новые возможности для создания инновационных препаратов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [15, 16]. Одним из активно изучаемых производных малоновой кислоты является этмабен (4-[(3-этокси-3-оксопропаноил) амино]бензойная кислота), впервые синтезированный на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ) [17, 18]. Синтез этмабена происходит при взаимодействии диэтилового эфира малоновой кислоты с пара-аминобензойной кислотой при нагревании в присутствии органического растворителя толуола или *о*-ксилола [17]. Схема синтеза этмабена представлена на рисунке 1.

Этмабен является инновационным лекарственным средством с антиишемической и антиоксидантной активностью. Учитывая способность этмабена снижать интенсивность окислительных процессов за счет ингибирования дыхательной функции, а также оказывать влияние на гликолиз и окислительное фосфорилирование, этмабен может применяться для лечения ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности [15, 19]. На данный момент этмабен имеет запатентованные схемы синтеза [17], отработанные технологии получения фармацевтических композиций и готовых лекарственных форм [20, 21], а также положительные результаты доклинических исследований [15, 19, 22–25].

Исследователями из СПХФУ было изучено влияние этмабена на формирование экспериментальной постинфарктной хронической сердечной недостаточности и доказана кардиотропная активность на модели хронической сердечной недостаточности [19]. Был проведен полный цикл доклинических исследований этмабена, включающий оценку эффективности и безопасности этмабена, а также изучение его потенциального механизма действия и фармакологических эффектов. Были доказаны положительные профили безопасности активной фармацевтической субстанции (АФС) и готовой лекарственной формы этмабена, изучена фармакологическая безопасность фармацевтической субстанции этмабена и определены основные фармакокинетические и фармакодинамические параметры на грызунах и негрызунах при различных путях введения [22–25]. Был проведен полный цикл фармацевтической разработки, включая разработку методик для определения родственных примесей этмабена [18, 26]. Следующим этапом разработки является проведение I фазы клинических исследований (КИ). Ранее было получено разрешение на проведение I фазы КИ № 733 от 28.12.2022 («Этмабен, 300 мг», таблетки, покрытые оболочкой). Далее для проведения аналитического этапа КИ необходимо провести разработку и валидацию биоаналитической методики, пригодной для количественного определения этмабена в плазме крови человека.

Таким образом, целью данного исследования является проведение разработки и валидации методики количественного определения этмабена в плазме крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для дальнейшей апробации и использования при проведении аналитического этапа I фазы КИ.

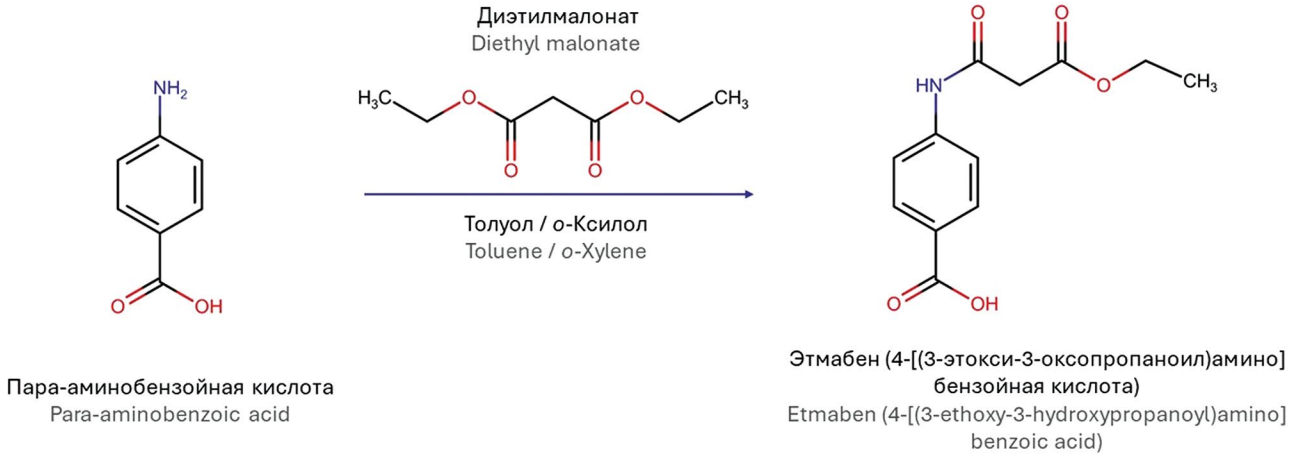


Рисунок 1. Схема синтеза этмабена

Figure 1. Scheme of etmaben synthesis

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы, стандартные образцы и биоматериалы

При проведении данного исследования были использованы следующие реактивы: метанол (класс «ос.ч.» для градиентной ВЭЖХ», ООО ТД «ХИММЕД», Россия), ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО «Компонент-Реактив», Россия; класс «HPLC-S Gradient Grade», Biosolve Chimie, Франция), муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Германия, AppliChem, Испания), вода деминерализованная I класса, полученная с помощью системы очистки воды Hydrolab R5 (Польша).

Были использованы следующие стандартные образцы (СО): этмабен (количественное содержание 99,50 %, Отдел синтеза ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, Россия), прометазина гидрохлорид (количественное содержание 99,90 %, USP Reference Standard, Франция).

Для приготовления валидационных образцов, калибровочных образцов и образцов контроля качества была использована интактная плазма крови без содержания аналита и внутреннего стандарта (ВС).

Приготовление исходных и рабочих растворов

При проведении исследования были приготовлены следующие растворы:

- *Исходные стандартные раствора этмабена.* Для этого точную навеску СО этмабена растворяли в метаноле до получения раствора с концентрацией 1000,000 мкг/мл.
- *Рабочие стандартные растворы этмабена.* Для этого исходные стандартные растворы этмабена разводили метанолом до получения концентраций, соответствующих калибровочным образцам № 1–8 и уровням контроля качества (КК) LLOQ (нижний предел количественного определения, НПКО [lower limit of quantification]), L (низкий [low]), M1, M2 (средний [middle]), H (высокий, [high]) – для оценочного диапазона (серия растворов № 1); калибровочным образцам № 1–9 и уровням КК LLOQ, L, M1, M2, M3, H – для аналитического диапазона № 1 (серия растворов № 2), а также калибровочным образцам № 1–10 и уровням КК LLOQ, L, M1, M2, M3, M4, H – для аналитического диапазона № 2 (серия растворов № 3). Концентрации рабочих стандартных растворов этмабена приведены в таблице 1.
- *Исходный стандартный раствор прометазина.* Для этого точную навеску СО прометазина гидрохлорида растворяли в метаноле до получения концентрации прометазина в растворе 200,00 мкг/мл.
- *Рабочий стандартный раствор прометазина.* Для этого исходный стандартный раствор прометазина разводили метанолом до получения раствора с концентрацией 21,000 мкг/мл.

Таблица 1. Концентрации этмабена в рабочих стандартных растворах

Table 1. Concentrations of etmaben at work standard solutions

Уровень Level	Концентрация этмабена, мкг/мл Etmaben concentration, μg/mL		
	Оценочный диапазон (серия № 1) Estimated range (Series № 1)	Аналитический диапазон № 1 (серия № 2) Analytical range № 1 (Series № 2)	Аналитический диапазон № 2 (серия № 3) Analytical range № 2 (Series № 3)
Калибровочные образцы Calibration levels			
1	0,100	5,000	0,800
2	0,200	10,000	2,000
3	1,000	20,000	10,000
4	2,000	100,000	20,000
5	5,000	200,000	100,000
6	10,000	300,000	200,000
7	20,000	400,000	300,000
8	30,000	500,000	400,000
9	–	600,000	500,000
10	–	–	700,000
Образцы контроля качества Quality control samples			
LLOQ	0,100	5,000	0,800
L	0,300	15,000	2,400
M1	4,500	30,000	3,500
M2	18,000	90,000	35,000
M3	–	360,000	105,000
M4	–	–	420,000
H	24,000	480,000	560,000

Пробоподготовка

Пробоподготовка проводилась согласно схеме, представленной на рисунке 2. Для приготовления модельных образцов (калибровочных образцов и образцов КК) к 190 мкл интактной плазмы крови добавляли по 10 мкл рабочих стандартных растворов этмабена до получения образцов с концентрациями, указанными в таблице 2. В качестве внутреннего стандарта в пробы добавляли по 10 мкл рабочего стандартного раствора прометазина. Осаждение белков плазмы крови проводилось с помощью 400 мкл ацетонитрила. После перемешивания и центрифугирования супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа, где поддерживалась температура на уровне 20 ± 5 °C.

Рисунок 2. **Схема пробоподготовки**

Figure 2. **Scheme of sample preparation**

Таблица 2. **Концентрации этмабена и прометазина в калибровочных образцах и образцах контроля качества**

Table 2. **Concentrations of etmaben and promethazine at calibration levels and quality control samples**

Уровень Level	Концентрация этмабена, мкг/мл Etmaben concentration, µg/mL			Концентрация прометазина, мкг/мл Promethazine concentration, µg/mL
	Оценочный диапазон (модельные образцы № 1) Estimated range (Samples № 1)	Аналитический диапазон № 1 (модельные образцы № 2) Analytical range № 1 (Samples № 2)	Аналитический диапазон № 2 (модельные образцы № 3) Analytical range № 2 (Samples № 3)	
Калибровочные образцы Calibration levels				
1	0,005	0,250	0,040	1,000
2	0,010	0,500	0,100	1,000
3	0,050	1,000	0,500	1,000
4	0,100	5,000	1,000	1,000
5	0,250	10,000	5,000	1,000
6	0,500	15,000	10,000	1,000
7	1,000	20,000	15,000	1,000
8	1,500	25,000	20,000	1,000
9	–	30,000	25,000	1,000
10	–	–	35,000	1,000
Образцы контроля качества Quality control samples				
LLOQ	0,005	0,250	0,040	1,000
L	0,015	0,750	0,120	1,000
M1	0,225	1,500	0,175	1,000
M2	0,900	4,500	1,750	1,000
M3	–	18,000	5,250	1,000
M4	–	–	21,000	1,000
H	1,200	24,000	28,000	1,000

Хроматографическое разделение и детектирование

Хроматографическое разделение осуществлялось с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Nexera XR (Shimadzu Corporation, Япония), оборудованного градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, устройством автоматической подачи образцов в автосамплер, краном переключения линии потока высокого давления. Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось на тандемном масс-селективным детекторе с тройным квадруполем LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Обработка первичных данных проводилась с помощью программного обеспечения LabSolutions ver. 5.91 (Shimadzu Corporation, Япония).

Для хроматографического разделения использовалась колонка Luna C18, 100 Å, 50 × 2,00 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) и предколонка SecurityGuard™ C18, 4 × 3,0 мм (Phenomenex, США). Температура термостата колонок поддерживалась на уровне 40 °C.

Элюирование проходило в градиентном режиме при постоянной скорости потока 1,00 мл/мин. В качестве подвижной фазы были использованы следующие элюенты:

- ✓ *Элюент А подвижной фазы*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему);
- ✓ *Элюент В подвижной фазы*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему).

Градиент по составу подвижной фазы представлен в виде диаграммы на рисунке 3. Общее время регистрации хроматограммы: 0,00–4,00 мин. Время удерживания этмабена составило около 1,18 минут, время удерживания прометазина – около 1,15 минут.

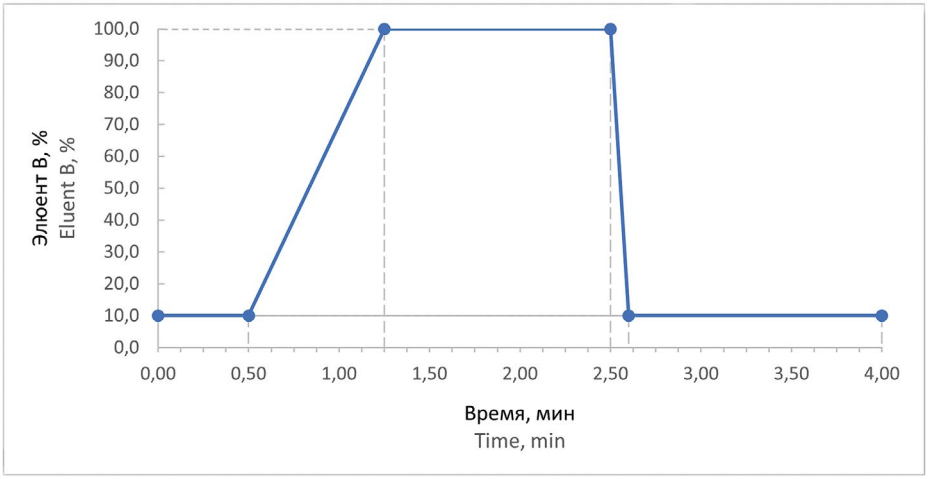


Рисунок 3. **Градиент подвижной фазы**

Figure 3. **Gradient elution**

Объем вводимой пробы составил 20 мкл.

Для ионизации вещества был выбран источник ионизации электроспрей (electrospray ionization, ESI). Ионизация этмабена проводилась в отрицательном режиме, прометазина – в положительном режиме. Детектирование проводилось путем мониторинга MRM-переходов (Multiple Reaction Monitoring). Были подобраны следующие MRM-переходы: 249,90 → 92,15 m/z; 249,90 → 160,20 m/z (этмабен); 284,95 → 197,95 m/z (прометазин). Параметры источника ионизации: осушающий газ 20 л/мин, распыляющий газ 3 л/мин, температура линии десольватации 200 °C, температура блока нагрева 400 °C, напряжение на игле ESI –5,0 кВ для этмабена, +4,5 кВ для прометазина.

Валидация аналитической методики

Валидация методики была проведена на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза[1], а также руководств EMA[2] и FDA[3]. Была проведена полная и частичная валидация методики. При проведении полной валидации проводилась оценка следующих параметров: калибровочная кривая, точность и прецизионность, нижний предел количественного определения (НПКО), селективность, пригодность стандартных образцов, эффект матрицы, степень извлечения, перенос пробы, стабильность. При проведении частичной валидации в связи с необходимостью изменения аналитического диапазона методики была проведена оценка параметров: калибровочная кривая, точность и прецизионность, НПКО, селективность.

Калибровочная кривая

Для оценки данного параметра в каждом цикле проводилась оценка калибровочных образцов (см. таблицу 2). Величины относительной погрешности (*E*, %) должны находиться в диапазоне значений ±20 % – для образцов на уровне LLOQ и ±15 % – для остальных калибровочных образцов. Данному критерию должны соответствовать не менее 75 % калибровочных образцов не менее чем в шести различных концентрациях.

Точность и прецизионность

Анализировали образцы плазмы крови, соответствующие уровням КК (см. таблицу 2). Анализ проводился в течение пяти последовательностей по пять вводов образца каждого уровня КК. Оценка точности и прецизионности проводилась внутри каждой последовательности, а также между циклами в течение 1–3 ($n = 15$), 1–4 ($n = 20$), 1–5 ($n = 25$) последовательностей.

Рассчитанные значения *E* для оценки точности должны находиться в пределах ±20 % – для образцов на уровне LLOQ и ±15 % – для остальных образцов КК. Для оценки прецизионности рассчитанное значение относительного стандартного отклонения (RSD, %) не должно превышать 20 % – для образцов на уровне LLOQ, 15 % – для остальных образцов КК.

[1] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.). Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107/ Ссылка активна на 13.01.2024.

[2] European Medicines Agency. Доступно по: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/ Ссылка активна на 13.01.2024.

[3] Food and Drug Administration. Доступно по: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/ Ссылка активна на 13.01.2024.

Нижний предел количественного определения

На основании данных, полученных при оценке калибровочной кривой, точности и прецизионности, проводилась оценка параметра «нижний предел количественного определения». За НПКО методики принималась минимальная концентрация этмабена в плазме крови, которая поддается надежному количественному определению со значениями RSD и *E* не более 20 %.

Селективность

Для оценки способности методики дифференцировать этмабен и прометазин от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов, содержащихся в образце, были проанализированы по шесть холостых образцов, приготовленных на интактной плазме крови (ИПК), гиперлипидемической интактной плазме крови (ГЛИПК), гемолизной интактной плазме крови (ГИПК), а также образцы, соответствующие уровню LLOQ, также приготовленные на различных видах матрицы.

На холостых образцах, приготовленных на различных видах матрицы, сигнал этмабена не должен превышать 20 % от средних значений сигналов этмабена на уровнях LLOQ, сигнал ВС прометазина не должен превышать 5 % от средних значений сигналов ВС, полученных при анализе образцов LLOQ. Оценка данного параметра проводилась при полной валидации методики с аналитическим диапазоном № 1 (0,250–30,000 мкг/мл), а также при проведении частичной валидации с аналитическим диапазоном № 2 (0,040–35,000 мкг/мл) в связи с изменением НПКО методики.

Пригодность СО

Проводился анализ образца ИПК с добавлением ВС прометазина без добавления этмабена. Для данного образца сигнал этмабена не должен превышать 20 % от среднего значения сигналов, полученных при анализе образцов LLOQ, приготовленных на ИПК. Также был проведен анализ образца ИПК без добавления ВС прометазина с добавлением этмабена до концентрации, соответствующей калибровочному образцу № 9. Для данного образца сигнал ВС прометазина не должен превышать 5 % от среднего значения сигналов ВС, полученных при анализе образцов LLOQ.

Эффект матрицы

Для оценки данного параметра анализировали по шесть образцов на уровне L и H, приготовленных на различных видах матрицы (ИПК, ГЛИПК и ГИПК), без влияния биологической матрицы, а также по шесть образцов на уровне L и H, приготовленных на различных видах матрицы, без влияния степени извлечения. RSD фактора матрицы, нормализованного по ВС, не должно превышать 15 %.

Степень извлечения

Для оценки данного параметра проводили анализ образцов, приготовленных на ИПК, ГЛИПК и ГИПК без влияния степени извлечения и с учетом степени извлечения. Анализировали по три образца на уровнях L, M1, M2, M3, H, приготовленных на различных видах матрицы, без влияния степени извлечения, а также по три образца на уровнях L, M1, M2, M3, H, приготовленных на различных видах матрицы, с учетом влияния степени извлечения. Рассчитанное RSD степени извлечения этмабена из различных видов биологических матриц не должно превышать 15 %.

Перенос пробы

Для оценки переноса пробы были последовательно проанализированы калибровочные образцы № 9 и холостые образцы, приготовленные на ИПК. Также для оценки данного параметра были использованы данные, полученные при анализе образцов LLOQ, приготовленных на ИПК. Сигнал этмабена в холостых образцах не должен превышать 20 % от среднего значения сигналов на уровне LLOQ, сигнал ВС прометазина в образце не должен превышать 5 % от среднего значения сигналов ВС, полученных при анализе образцов LLOQ.

Стабильность

Была проведена оценка различных видов стабильности: краткосрочной стабильности («настольной» и «постпрепаративной»), стабильности при пятикратной заморозке-разморозке, стабильности стандартных растворов (исходных и рабочих), долгосрочной стабильности аналита в матрице. Оценка долгосрочной стабильности аналита в матрице проводилась методом брекетинга дважды: была проведена промежуточная оценка в течение 112 дней, а также дополнительная оценка в течение 234 дней. Для оценки каждого вида стабильности были проанализированы по пять образцов на уровнях L и H. Полученные величины *E* не должны превышать ±15 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждение

Ранее были опубликованы результаты доклинического исследования по изучению фармакокинетических параметров при пероральном введении этмабена грызунам и негрызунам. Аналитическая методика, используемая для количественного определения этмабена в плазме и моче крыс и кроликов, в данной работе описана не была [27]. Также имеются результаты исследования количественного определения этмабена в стандартном образце методом материального баланса. В ходе данного исследования проводился подбор условий для определения

родственных примесей этмабена с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) с использованием градиентного режима элюирования и хроматографической колонки Phenomenex Luna C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм [26]. Помимо этого, была разработана единая аналитическая методика для определения родственных примесей в СО, АФС и таблетках малобена и этмабена методом ВЭЖХ-УФ с использованием колонки Phenomenex Intersil® ODS-3V, 250 × 4,6 мм, 5 мкм [18].

Изучив литературные данные, мы можем сделать вывод, что до настоящего времени разработка и валидация биоаналитических методик определения этмабена в биологических образцах человека не проводилась и ни одной методики определения этмабена в плазме крови человека до настоящего момента опубликовано не было. Нами была проведена разработка первой методики количественного определения этмабена в плазме крови человека. Данная методика была валидирована и прошла успешную апробацию в аналитическом этапе I фазы КИ.

Разработка аналитической методики

Количественное определения этмабена проводилось с помощью наиболее селективного и чувствительного инструментального метода анализа – ВЭЖХ-МС/МС.

В качестве внутреннего стандарта было выбрано производное фенотиазина – прометазин ((RS)-N,N,α-триметил-10H-фенотиазин-10-этанамин). Методика с данным ВС прошла валидацию, результаты оценки всех оцениваемых параметров соответствовали критериям приемлемости. На этом основании можно сделать вывод, что данное вещество полностью удовлетворяет нашим требованиям и может использоваться в качестве ВС для количественного определения этмабена. На этапе разработки в качестве ВС рассматривалось схожее с этмабеном по химической формуле и физико-химическим свойствам производное малоновой кислоты – малобен (4,4′-(пропандиамидо)дибензоат натрия). Малобен не был выбран в качестве ВС, так как СО малобена содержал примеси этмабена в мешающем проведению анализа количестве. Мы рассматриваем возможность улучшения данной биоаналитической методики путем использования малобена в качестве ВС при условии очистки СО малобена от примесей этмабена.

Разработка масс-спектрометрического детектирования начиналась с выбора источника и режима ионизации. Ионизация проводилась с помощью ESI. Молекула этмабена ионизировалась в отрицательном режиме. Был зарегистрирован ион-прекурсор этмабена с отношением массы к заряду 249,90 m/z. Далее был проведен анализ дочерних ионов, зарегистрированных при различных энергиях соударения (CE, collusion energy). Были выбраны и оптимизированы 2 наиболее интенсивных MRM-перехода: 249,90 → 92,15 m/z (CE 35,6 кВ), 249,90 → 160,20 m/z (CE 9,2 кВ). Упрощенный масс-спектр этмабена с предполагаемыми путями фрагментации представлен на рисунке 4. Максимальная интенсивность была получена при установлении на игле ESI напряжения –5,0 кВ. Масс-спектрометрическое детектирование прометазина проводилось в положительном режиме ионизации. MRM-переход для прометазина: 284,95 → 197,95 m/z, напряжение на игле ESI +4,5 кВ, CE –26,6 кВ.

Были подобраны условия хроматографического разделения, позволяющие получить пики этмабена и прометазина с оптимальными хроматографически-

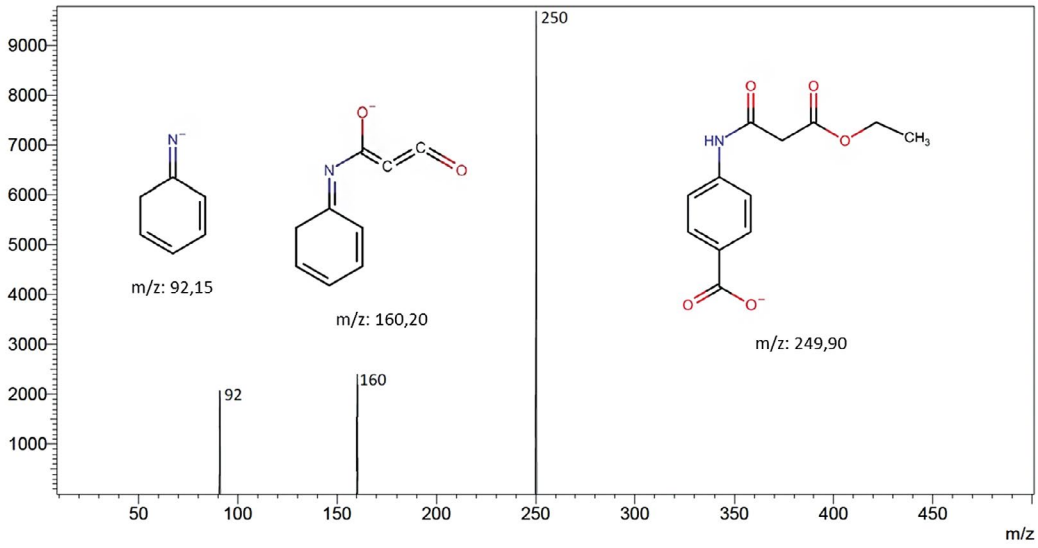


Рисунок 4. Спектр иона-прекурсора и дочерних ионов этмабена с предполагаемыми путями фрагментации

Figure 4. Product ion spectrum of parent ion and product ions of etmaben and its suggested fragmentation pathways

ми параметрами. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Luna C18, 100 Å, 50 × 2,00 мм, 5 мкм (Phenomenex, США). В качестве подвижной фазы были выбраны наиболее универсальные растворители: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А, по объему) и 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В, по объему). Благодаря градиентному элюированию и скорости потока удалось добиться оптимальных хроматографических характеристик и сократить время анализа до 4 минут. Был выбран быстрый и простой способ пробоподготовки: осаждение белков плазмы крови ацетонитрилом в соотношении матрица : растворитель (1 : 2). Выбор данного способа пробоподготовки оправдывается отсутствием необходимости в дополнительном концентрировании пробы и повышении степени экстракции аналита.

В разработке биоаналитических методик для количественного определения инновационных препаратов особую сложность, в связи с отсутствием данных об оценке фармакокинетических параметров в плазме крови человека, представляет выбор аналитического диапазона методики. Аналитический диапазон данной методики был выбран с использованием оценочного подхода. Для этого была приготовлена серия растворов № 1 с концентрациями, приведенными в таблице 1. С использованием данных растворов были приготовлены модельные образцы с концентрациями, соответствующими оценочному диапазону 0,005–1,500 мкг/мл в плазме крови (см. таблицу 2). Были проанализированы пробы нескольких добровольцев, а также данные модельные образцы. На основании полученных данных была проведена корректировка аналитического диапазона. Для этого была приготовлена серия растворов № 2 (см. таблицу 1), из которой были приготовлены модельные образцы № 2, соответствующие аналитическому диапазону № 1 (см. таблицу 2). При проведении аналитического этапа исследования было обнаружено несоответствие полученных результатов ожидаемому диапазону концентраций, на основании которого был выбран аналитический диапазон методики. В связи с этим аналитический диапазон было необходимо скорректировать и провести частичную валидацию методики. Для этого была приготовлена серия растворов № 3 (см. таблицу 1), из которой были приготовлены модельные образцы № 3, соответствующие аналитическому диапазону № 2 (см. таблицу 2).

Результаты валидации аналитической методики

Калибровочная кривая

Для построения калибровочной кривой использовались значения, полученные при анализе калибровочных образцов № 1–9 (0,250–30,000 мкг/мл) при проведении полной валидации методики и в валидационном цикле для оценки долгосрочной стабильности аналита в матрице (валидационные циклы № 1–3, 5), а также образцов № 1–10 (0,040–35,000 мкг/мл) при проведении частичной валидации (валидационный цикл № 4). Частичная валидация была проведена в связи с необходимостью валидировать измененный аналитический диапазон. Для оценки валидационного цикла № 5 использовался нерасширенный аналитический диапазон в связи с особенностями проведения оценки долгосрочной стабильности аналита в матрице.

На основе полученных значений были построены графики калибровочных кривых в координатах отношение площади пика этмабена к площади пика ВС прометазина от отношения концентрации этмабена к концентрации ВС прометазина. Калибровочные кривые описываются линейной функцией $f(x) = k \times x + b$. График калибровочной кривой валидационного цикла № 1 приведен на рисунке 5. Значения переменных и коэффициенты корреляции (R) для калибровочных графиков в валидационных циклах приведены в таблице 3.

Таблица 3. Значения переменных и коэффициенты корреляции

Table 3. Variable values and correlation coefficients

Цикл Cycle	*k*	*b*	*R*
1	0,0886	0,0055	0,9984
2	0,0692	0,0045	0,9977
3	0,0973	0,0041	0,9965
4	0,2377	0,0035	0,9972
5	0,4339	0,0260	0,9980

Точность и прецизионность

Рассчитанные значения E для оценки точности и RSD для оценки прецизионности соответствуют критериям приемлемости. Оценка точности и прецизионности на уровнях LLOQ, L, M1, M2, M3, H (0,250; 0,750; 1,500; 4,500; 18,000; 24,000 мкг/мл соответственно) проводилась в валидационных циклах № 1–3, 5; на уровнях LLOQ, L, M1, M2, M3, M4, H (0,040; 0,120; 0,175; 1,750; 5,250; 21,000; 28,000 мкг/мл соответственно) в валидационном цикле № 4. Данные о точности и прецизионности между валидационными циклами № 1–5 представлены в таблице 4.

Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения этмабена в аналитическом диапазоне № 1 составил 0,250 мкг/мл, в аналитическом диапазоне № 2 после снижения НПКО методики – 0,040 мкг/мл. На рисунке 6 приведена хроматограмма образца плазмы крови, соответствующего уровню LLOQ с номинальной концентрацией в плазме крови 0,040 мкг/мл.

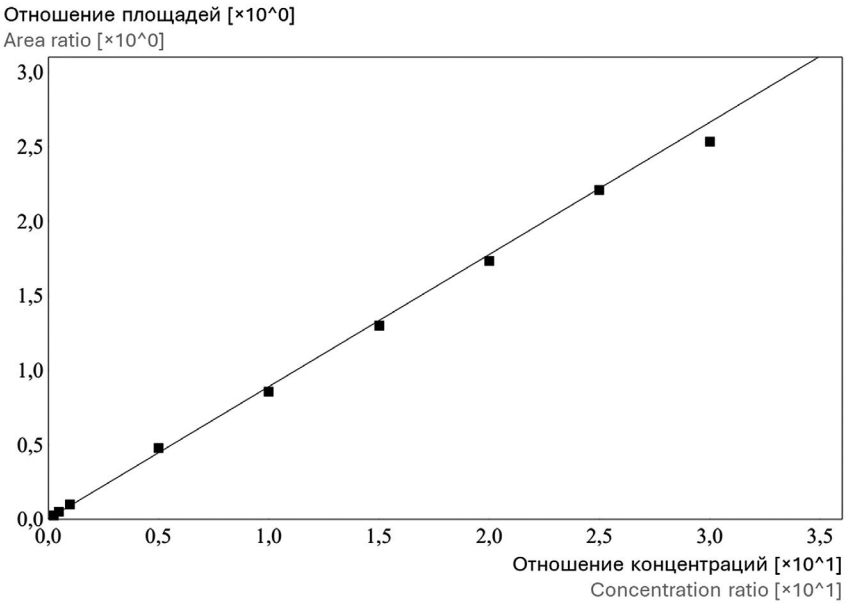


Рисунок 5. **График калибровочной кривой**

Figure 5. **Calibration curve**

Таблица 4. **Точность и прецизионность между циклами № 1–5 (*n* = 25)**

Table 4. **Intra-day accuracy and precision in cycles № 1–5 (*n* = 25)**

Уровень Level	**LLOQ**		**L**		**M1**		**M2**		**M3**		**M4**	**H**	
Введено (мкг/мл) Injected (μg/mL)	0,250	0,040	0,750	0,120	1,500	0,175	4,500	1,750	18,000	5,250	21,000	24,000	28,000
Среднее Average	0,256	0,040	0,772	0,120	1,545	0,166	4,778	1,660	17,742	4,982	18,631	23,243	25,456
RSD, %	8,49	10,42	7,29	7,26	4,84	7,96	4,29	6,60	8,21	4,74	3,51	8,38	6,49
E, %	2,22	–0,50	2,88	–0,17	2,99	–5,14	6,17	–5,17	–1,43	–5,10	–11,28	–3,15	–9,08

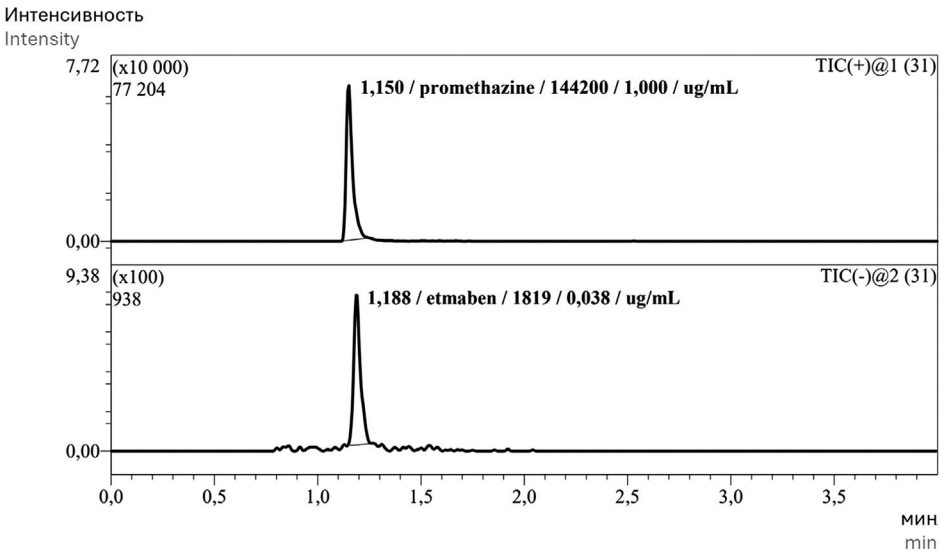


Рисунок 6. **Хроматограмма образца плазмы крови на уровне НПКО**

Figure 6. **Chromatogram of LLOQ plasma sample**

Селективность

Сигналы этмабена и ВС прометазина в холостых образцах, приготовленных на различных видах матрицы, не превышали 20 % от средних значений сигналов этмабена и 5 % от средних значений сигнала ВС, полученных при анализе образцов LLOQ, приготовленных на различных видах матрицы. На рисунке 7 представлена хроматограмма образца интактной плазмы крови человека. Несмотря на то, что на хроматограммах холостых образцов были детектированы пики аналита и ВС, их площади не превышали максимально допустимых значений и соответствовали указанным ранее критериям приемлемости.

Пригодность СО

Было доказано отсутствие влияния ВС прометазина и его примесей на этмабен: сигнал этмабена в образце ИПК с добавлением прометазина без добавления этмабена не превышал 20 % от среднего значения сигналов этмабена в образцах LLOQ; сигнал ВС прометазина на образце без добавления прометазина с добавлением этмабена не превышал 5 % от среднего значения сигналов ВС в образцах LLOQ, что соответствует критериям приемлемости.

Эффект матрицы

Был проведен анализ образцов L и H, приготовленных на ИПК, ГЛИПК и ГИПК без влияния степени извлечения и без влияния биологической матрицы, рассчитано значения фактора матрицы, нормализованного по ВС, и RSD. Фактор матрицы, нормализованный по ВС, рассчитывался как отношение площади пика этмабена на образцах L и H, приготовленных без влияния степени извлечения, к значению площади пика этмабена на образцах L и H, приготовленных без влияния биологической матрицы к площади пика прометазина на образце, приготовленном без влияния степени извлечения к значению площади пика прометазина на образца, приготовленного без влияния биологической матрицы. RSD не превышало 15 %, что соответствует критериям приемлемости (таблица 5).

Степень извлечения

Был проведен расчет степени извлечения и доказано эффективное и воспроизводимое извлечение этмабена из различных видов биологических матриц. Среднее значение степени извлечения из ИПК, ГИПК и ГЛИПК составило 90,26 %, RSD – 12,81 %, что соответствует критериям приемлемости (таблица 6).

Перенос пробы

В валидационных циклах № 1–3 был проведен последовательный анализ образцов с максимальной концентрацией (калибровочный образец № 9), а также холостых образцов ИПК. Сигнал этмабена в холостых образцах не превышал 20 % от среднего значения сигналов на уровне LLOQ, сигнал ВС прометазина в холостых образцах не превышал 5 % от среднего значения сигналов ВС, полученных при анализе образцов LLOQ, что соответствует критериям приемлемости. Результаты оценки приведены в таблице 7.

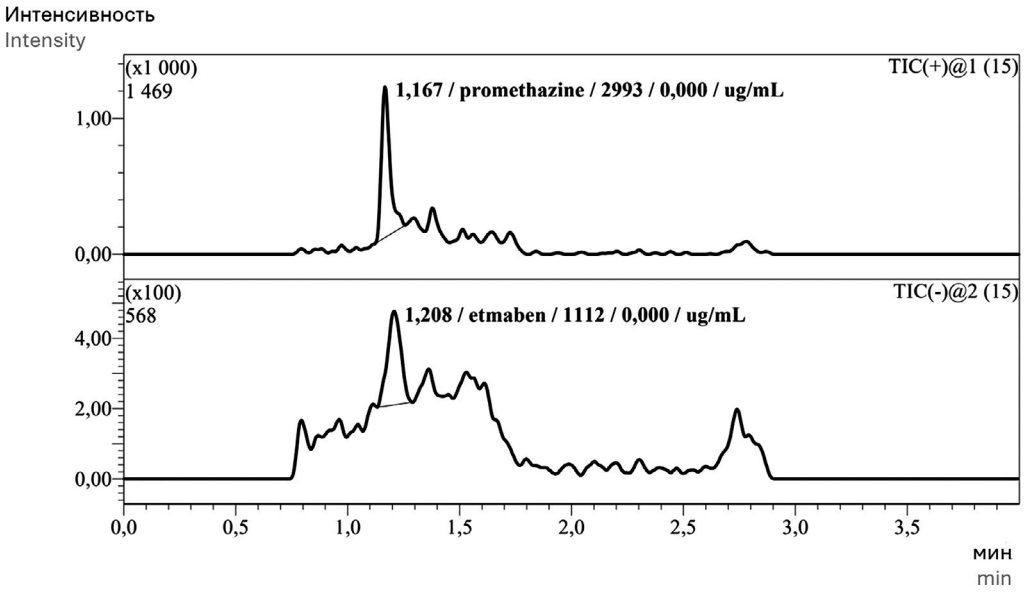


Рисунок 7. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови**

Figure 7. **Chromatogram of blank human plasma sample**

Таблица 5. **Изучение эффекта матрицы**

Table 5. **Matrix effects assessment**

Уровень Level	**L**			**H**		
Биологическая матрица Biological matrix	**ИПК** Blank blood plasma	**ГИПК** Hemolyzed blank blood plasma	**ГЛИПК** Hyperlipidemic blank blood plasma	**ИПК** Blank blood plasma	**ГИПК** Hemolyzed blank blood plasma	**ГЛИПК** Hyperlipidemic blank blood plasma
Нормализованный Mf Normalized Mf	0,76	0,79	0,80	0,88	0,95	1,00
	0,91	0,80	0,87	0,90	0,89	0,96
	1,06	1,03	1,03	0,95	0,93	0,97
	0,86	0,86	0,84	0,92	0,91	0,83
	0,80	0,94	0,87	0,89	0,91	0,91
Среднее Average	0,88			0,92		
RSD, %	10,29			4,63		

Таблица 6. **Оценка степени извлечения этмабена**

Table 6. **Recovery assessment of etmaben**

Биологическая матрица Biological matrix	**ИПК** Blank blood plasma	**ГИПК** Hemolyzed blank blood plasma	**ГЛИПК** Hyperlipidemic blank blood plasma
Уровень Level	**Среднее значение степени извлечения, %** Average of recovery, %		
L	86,99	72,53	80,19
M1	98,13	91,21	87,28
M2	93,79	90,48	95,62
M3	88,31	110,82	98,34
H	85,52	89,63	85,07
Среднее Average	90,26		
RSD, %	12,81		

Стабильность

Была проведена оценка различных видов стабильности этмабена. Результаты оценки стабильности этмабена, а также сроки и условия хранения образцов для оценки представлены в таблице 8. Рассчитанные значения *E* соответствуют критериям приемлемости.

Применение разработанной методики

Разработанная и валидированная методика количественного определения этмабена в плазме крови была успешно апробирована при проведении аналитической части I фазы КИ по изучению безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров различных доз препарата Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) у здоровых добровольцев. В данном КИ были изучены различные дозы и режимы дозирования препарата «Этмабен, 300 мг». При проведении аналитического этапа исследования было подтверждено, что разработанная нами методика пригодна для определения этмабена в плазме крови человека при проведении фармакокинетических исследований. Препарат не метаболизируется в плазме крови, поэтому ведется определение основного вещества, а не метаболита; никаких сопутствующих компонентов, мешающих детектированию этмабена, обнаружено не было. Пример хроматограммы добровольца, участвующего в данном исследовании, представлен на рисунке 8.

Таблица 7. **Оценка переноса пробы**

Table 7. **Carry-over assessment**

Цикл Cycle	**1**		**2**		**3**	
Название вещества Name	**Этмабен** Etmaben	**Прометазин** Promethazine	**Этмабен** Etmaben	**Прометазин** Promethazine	**Этмабен** Etmaben	**Прометазин** Promethazine
Значение площади, НПКО Area value, LLOQ	19313	676304	13973	607326	16730	557054
Значение площади, холостой образец Area value, blank	670	4605	0	5494	2854	5570
Отношение площадей, % Area ratio, %	3,47	0,68	0,00	0,90	17,06	1,00

Таблица 8. **Оценка стабильности этмабена**

Table 8. **Stability assessment of etmaben**

Вид стабильности Type of stability	**Срок и условия хранения образцов** Time and storage conditions		**Среднее значение E, %** Average value of E, %	
			L	**H**
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализ свежеприготовленных образцов. Хранение при 20 ± 5 °C Analyzed freshly prepared. Stored at 20 ± 5 °C		–5,89	–14,72
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	Хранение в автосамплере хроматографа не менее 29 часов при 20 ± 5 °C Stored in a chromatograph autosampler for at least 29 hours at 20 ± 5 °C		11,01	–4,97
Стабильность при заморозке-разморозке Freeze-thaw stability	5 циклов заморозки-разморозки: не менее 60 часов при –42,5 ± 7,5 °C (заморозка) и не менее 10 часов при 20 ± 5 °C (разморозка) 5 freeze-thaw cycles: at least 60 hours at –42.5 ± 7.5 °C (freeze) and at least 10 hours at 20 ± 5 °C (thaw)		1,68	–2,92
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	112 дней 112 days	при –20 ± 5 °C at –20 ± 5 °C	–1,36	–4,16
		при –75 ± 10 °C at –75 ± 10 °C	7,68	–5,71
	234 дней 234 days	при –20 ± 5 °C at –20 ± 5 °C	–1,36	–9,25
		при –75 ± 10 °C at –75 ± 10 °C	–6,05	–7,69
Стабильность исходных стандартных растворов Stock solution stability	112 дней при –42,5 ± 7,5 °C 112 days at –42.5 ± 7.5 °C		5,23	–7,33
Стабильность рабочих стандартных растворов Work solution stability			2,45	–7,27

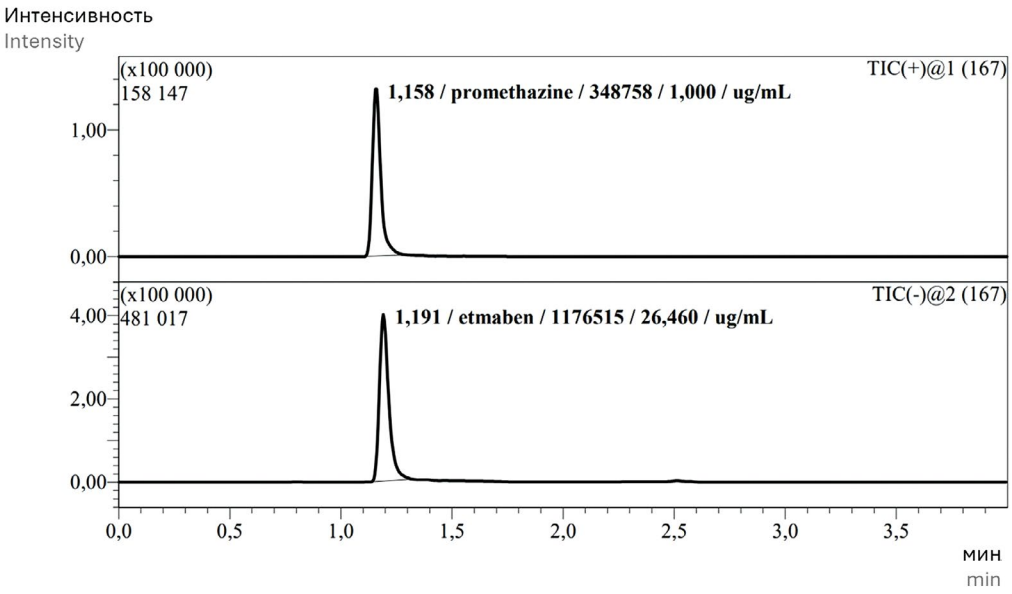


Рисунок 8. **Хроматограмма образца плазмы крови добровольца**

Figure 8. **Chromatogram of volunteer plasma sample**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка и валидация методики количественного определения инновационного препарата этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. До этого не производилась разработка и валидация биоаналитических методик определения этмабена в биологических образцах человека, поэтому данная методика количественного определения этмабена в плазме крови человека является первой. Подтвержденный аналитический диапазон валидированной методики составил 0,250–30,000 мкг/мл. Также в связи со снижением НПКО и повышением верхнего предела количественного определения методики была проведена частичная валидация. Новый подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,040–35,000 мкг/мл. Методика была успешно апробирована при проведении I фазы КИ этмабена на здоровых добровольцах и может применяться для других фармакокинетических исследований этмабена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Концевая А. В., Муканеева Д. К., Игнатьева В. И., Анциферова А. А., Драпкина О. М. Экономика профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации. *Российский кардиологический журнал*. 2023;28(9):5521. DOI: 10.15829/1560-4071-2023-5521.
2. Campbell N. R., Ordunez P., Giraldo G., Morales Y. A., Lombardi C., Khan T., Padwal R., Tsuyuki R. T., Varghese C. WHO HEARTS: a global program to reduce cardiovascular disease burden: experience implementing in the Americas and opportunities in Canada. *Canadian Journal of Cardiology*. 2021;37(5):744–755. DOI: 10.1016/j.cjca.2020.12.004.
3. Movsisyan N. K., Vinciguerra M., Medina-Inojosa J. R., Lopez-Jimenez F. Cardiovascular diseases in central and eastern Europe: a call for more surveillance and evidence-based health promotion. *Annals of global health*. 2020;86(1):21. DOI: 10.5334/aogh.2713.
4. Şahin B., İlgün G. Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries. *Health & Social Care in the Community*. 2022;30(1):73–80. DOI: 10.1111/hsc.13156.
5. Nasarian E., Abdar M., Fahami M. A., Alizadehsani R., Hussain S., Basiri M. E., Zomorodi-Moghadam M., Zhou X., Pławiak P., Acharya U. R., Tan R. S. Association between work-related features and coronary artery disease: A heterogeneous hybrid feature selection integrated with balancing approach. *Pattern Recognition Letters*. 2020;133:33–40. DOI: 10.1016/j.patrec.2020.02.010.
6. Rehman S., Rehman E., Ikram M., Jianglin Z. Cardiovascular disease (CVD): assessment, prediction and policy implications. *BMC Public Health*. 2021;21(1):1–4. DOI: 10.1186/s12889-021-11450-z.
7. Timmis A., Townsend N., Gale C. P., Torbica A., Lettino M., Petersen S. E., Mossialos E. A., Maggioni A. P., Kazakiewicz D., May H. T., De Smedt D. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2019. *European heart journal*. 2020;41(1):12–85. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz859.
8. Roth G. A., Mensah G. A., Johnson C. O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L. M., Barengo N. C., Beaton A. Z., Benjamin E. J., Benziger C. P., Bonny A. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(25):2982–3021. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
9. Крыжановский С. А., Лихошерстов А. М., Цорин И. Б., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Мокров Г. В., Гудашева Т. А. Скрининг кардиотропной активности в ряду α, ω-диарилметильных производных бис-(ω-аминоалкил) аминов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016;(2):10–13.
10. Severino P., D'Amato A., Pucci M., Infusino F., Adamo F., Birtolo L. I., Netti L., Montefusco G., Chimenti C., Lavalle C., Maestrini V. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(21):8118. DOI: 10.3390/ijms21218118.
11. Сизова Ж. М. Фармакотерапевтические подходы к лечению стабильной стенокардии: трудные вопросы-простые решения. *Медицинский совет*. 2021;(4):34–40. DOI: 10.21518/2079-701X-2021-4-34-40.
12. Orellana-Urzúa S., Rojas I., Líbano L., Rodrigo R. Pathophysiology of ischemic stroke: role of oxidative stress. *Current pharmaceutical design*. 2020;26(34):4246–4260. DOI: 10.2174/1381612826666200708133912.
13. Стаценко М. Е., Туркина С. В., Фабрицкая С. В., Полетаева Л. В. Миокардиальная цитопротекция при ишемической болезни сердца: что мы знаем об этом с позиции доказательной медицины? *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2011;(2):9–14.
14. Хабибулина М. М., Шамилов М. Д. Влияние метаболической терапии на состояние церебральной гемодинамики при гипоэстрогенемии. *Врач*. 2023;34(3):52–56. DOI: 10.29296/25877305-2023-03-10.
15. Кованских В. Е., Кушнир В. И., Булатова С. А. Оценка влияния производных малоновой кислоты на выживаемость мышей в условиях гипоксии. Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XII всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием, Санкт-Петербург, 14 марта – 22 апреля 2022 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2022. С. 342–345.
16. Авенирова Е. Л., Алексеева П. А., Баранова Н. И., Басс М. С., Бурякина А. В., Питухина Н. Н., Федорова Е. В. Молекулярные аспекты создания лекарственных препаратов: использование методов компьютерного моделирования с целью создания нового противоишемического средства. *Биомедицина*. 2014;(1):4–10.
17. Юсковец В. Н., Яковлев И. П., Наркевич И. А. Способ получения 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойной кислоты. Патент России № 2515245 C1 от 07.02.2013.
18. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573.
19. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Драчева А. В., Питухина Н. Н., Ивкина А. С., Бурякина А. В., Теслев А. А. Влияние производного бензойной кислоты на формирование экспериментальной хронической сердечной недостаточности. *Фармация*. 2016;63(4):49–52.
20. Вайнштейн В. А., Теслев А. А., Сорокин В. В., Яковлев И. П., Наркевич И. А., Бурякина А. В., Ивкин Д. Ю. Фармацевтическая композиция с антиишемической и антиоксидантной активностью и способ ее получения. Патент России № 2013153648/15 от 03.12.2013. Доступно по: https://patentimages.storage.googleapis.com/08/87/3b/8e4964eac4f9fd/RU2545833C1.pdf. Ссылка активна на 22.02.2024.
21. Вайнштейн В. А., Теслев А. А., Наркевич И. А., Яковлев И. П. Способ получения водорастворимого лиофилизата 4-(3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты, обладающей антиишемической и антиоксидантной активностью. Патент России № 2015124309/15 от 22.06.2015.
22. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Кованских В. Е., Титович И. А. Экспериментальная оценка фармакологической безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2023;19(3E):95–98. DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-95-98.
23. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А. Экспериментальная оценка эффективности и безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2022;18(3):109–112. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-109-112.
24. Гришина А. Ю, Караваева А. В. Изучение аллергизирующих свойств этмабена. От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов I Всероссийской научной конференции. Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 52–54.

25. Гришина А. Ю., Евгеньева Е. М., Елецкая Е. И. Оценка мутагенного потенциала производного малоновой кислоты этмабена. От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов I Всероссийской научной конференции. Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 55–57.
26. Адамова А. А. Количественное определение стандартного образца 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена) методом материального баланса. Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием, Санкт-Петербург, 01–11 марта 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 163-166.
27. Гришина А. Ю., Карпов А. А. Изучение фармакокинетических параметров – 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил) амино) бензойной кислоты (этмабена). От молекулы до лекарственного препарата: Сборник материалов I Всероссийской научной конференции. Санкт-Петербург, 27 октября 2023 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ; 2023. С. 58–61.

REFERENCES

1. Kontsevaya A. V., Mukaneeva D. K., Ignatieva V. I., Antsiferova A. A., Drapkina O. M. Economics of cardiovascular prevention in the Russian Federation. *Russian Journal of Cardiology*. 2023;28(9):5521. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2023-5521.
2. Campbell N. R., Ordunez P., Giraldo G., Morales Y. A., Lombardi C., Khan T., Padwal R., Tsuyuki R. T., Varghese C. WHO HEARTS: a global program to reduce cardiovascular disease burden: experience implementing in the Americas and opportunities in Canada. *Canadian Journal of Cardiology*. 2021;37(5):744–755. DOI: 10.1016/j.cjca.2020.12.004.
3. Movsisyan N. K., Vinciguerra M., Medina-Inojosa J. R., Lopez-Jimenez F. Cardiovascular diseases in central and eastern Europe: a call for more surveillance and evidence-based health promotion. *Annals of global health*. 2020;86(1):21. DOI: 10.5334/aogh.2713.
4. Şahin B., İlgün G. Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries. *Health & Social Care in the Community*. 2022;30(1):73–80. DOI: 10.1111/hsc.13156.
5. Nasarian E., Abdar M., Fahami M. A., Alizadehsani R., Hussain S., Basiri M. E., Zomorodi-Moghadam M., Zhou X., Pławiak P., Acharya U. R., Tan R. S. Association between work-related features and coronary artery disease: A heterogeneous hybrid feature selection integrated with balancing approach. *Pattern Recognition Letters*. 2020;133:33–40. DOI: 10.1016/j.patrec.2020.02.010.
6. Rehman S., Rehman E., Ikram M., Jianglin Z. Cardiovascular disease (CVD): assessment, prediction and policy implications. *BMC Public Health*. 2021;21(1):1–4. DOI: 10.1186/s12889-021-11450-z.
7. Timmis A., Townsend N., Gale C. P., Torbica A., Lettino M., Petersen S. E., Mossialos E. A., Maggioni A. P., Kazakiewicz D., May H. T., De Smedt D. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2019. *European heart journal*. 2020;41(1):12–85. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz859.
8. Roth G. A., Mensah G. A., Johnson C. O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L. M., Barengo N. C., Beaton A. Z., Benjamin E. J., Benziger C. P., Bonny A. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(25):2982–3021. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
9. Kryzhanovskii S. A., Likhosherstov A. M., Tsorin I. B., Stolyaruk V. N., Vititnova M. B., Mokrov G. V., Gudasheva T. A. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α, ω-diarilmetil derivatives of bis-(ω-aminoalkyl)amines. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2016;(2):10–13. (In Russ.)
10. Severino P., D'Amato A., Pucci M., Infusino F., Adamo F., Birtolo L. I., Netti L., Montefusco G., Chimenti C., Lavalle C., Maestrini V. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(21):8118. DOI: 10.3390/ijms21218118.
11. Sizova Zh. M. Pharmacotherapeutic approaches targeting stable angina: simple solutions to complex problems. *Medical Council*. 2021;(4):34–40. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2021-4-34-40.
12. Orellana-Urzúa S., Rojas I., Líbano L., Rodrigo R. Pathophysiology of ischemic stroke: role of oxidative stress. *Current pharmaceutical design*. 2020;26(34):4246–4260. DOI: 10.2174/1381612826666200708133912.
13. Statsenko M. E., Turkina S. V., Fabritskaya S. V., Poletaeva L. V. Myocardial cytoprotection in ischemic heart disease: what do we know about it from the point of evidence-based medicine? *Bulletin of Volgograd State Medical University*. 2011;(2):9–14. (In Russ.)
14. Habibulina M. M., Shamilov M. D. The influence of metabolic therapy on the state of cerebral hemodynamics in hypoestrogenemia. *The Doctor*. 2023;34(3):52–56. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877305-2023-03-10.
15. Kovanskov V. E., Kushnir V. I., Bulatova S. A. Researching of the effect of malonic acid derivatives on the survival of mice in hypoxia. In Young pharmacy – the potential of the future: A collection of materials of the XII All-Russian Scientific Conference of students and postgraduates with international participation, St. Petersburg, March 14–18, 2022. Saint Petersburg: SPCPU; 2022. P. 342–345. (In Russ.)
16. Avenirova E. L., Alekseeva P. A., Baranova N. I., Bass M. S., Burjakina A. V., Pituhina N. N., Fedorova E. V. Molecular aspects of drug development: using methods of computer modeling to create new anti-ischemic agents. *Journal Biomed*. 2014(1):4–10. (In Russ.)
17. Yuskovets V. N., Yakovlev I. P., Narkevich I. A. Method for producing 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino]benzoic acid. Patent RUS No. 2515245 C1 dated 07.02.2013. (In Russ.)
18. 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573.
19. Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Dracheva A. V., Pituhina N. N., Ivkina A. S., Burjakina A. V., Teslev A. A. Effect of a benzoic acid derivative on the development of experimental chronic heart failure. *Pharmacy*. 2016;63(4):49–52. (In Russ.)
20. Vajnshtejn V. A., Teslev A. A., Sorokin V. V., Jakovlev I. P., Narkevich I. A., Burjakina A. V., Ivkin D. Yu. Pharmaceutical composition with anti-ischemic and antioxidant activity and method for preparing it. Patent RUS No. 2545833 C1 dated 03.12.2013. Available at: https://patentimages.storage.googleapis.com/08/87/3b/8e4964eac4f9fd/RU2545833C1.pdf. Accessed: 22.02.2024. (In Russ.)
21. Vajnshtejn V. A., Teslev A. A., Narkevich I. A., Jakovlev I. P. Method of producingwater-solublelyophilisate of 4-(3-oxo-3-ethoxypropanoyl) amino)benzoic acid possessing anti-ischemic and antioxidant activity. Patent RUS No. 2602665 C1 dated 22.06.2015. (In Russ.)
22. Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Kovanskov V. E., Titovich I. A. Experimental evaluation of the pharmacological safety of a new propagandic acid derivative with a cardiotropic action. *Journal Biomed*. 2023;19(3E):95–98. (In Russ.) DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-95-98.
23. Ivkin D. Yu., Karpov A. A. Experimental evaluation of the effectiveness and safety of a new propandic acid derivative exhibiting cardiotropic action. *Journal Biomed*. 2022;18(3):109–112. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-109-112.
24. Grishina A. Y., Karavaeva A. V. Study of allergic effects of etmaben. In From molecule to drug: A collection of materials of the I All-Russian Scientific Conference. St. Petersburg, October 27, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 52–54. (In Russ.)
25. Grishina A. Y., Evgenieva E. M., Eletskaya E. I. Evaluation of the mutagenic potential of malonic acid derivative etmaben. In From molecule to drug: A collection of materials of the I All-Russian Scientific Conference, St. Petersburg, October 27, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 55–57. (In Russ.)
26. Adamova A. A. Quantitative determination of a reference standard of 4-((3-oxo-3-ethoxypropanoyl)amino)benzoic acid (etmaben) by the material balance method. In Young pharmacy – the potential of the future: A collection of materials of the XIII All-Russian Scientific Conference of students and postgraduates with international participation, St. Petersburg, March 01 – 11, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 163–166. (In Russ.)
27. Grishina A. Y., Karpov A. A. Study of pharmacokinetic parameters of – 4-((3-oxo-3-ethoxypropanoyl) amino) benzoic acid (ethmaben). In From molecule to drug: A collection of materials of the I All-Russian Scientific Conference, St. Petersburg, October 27, 2023. Saint Petersburg: SPCPU; 2023. P. 58–61. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1761
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Оценка взаимного влияния монокомпонентов комбинированного лекарственного препарата, содержащего молнупиравир и фавипиравир, на фармакокинетику в рамках фазы I клинического исследования

Т. Н. Комаров[1, 2]✉, К. К. Карнакова[1], Н. С. Багаева[1], О. А. Арчакова[1], М. О. Попова[1], В. С. Щербакова[3], К. Я. Заславская[3], П. А. Белый[3], И. Е. Шохин[1]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН). 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
[3] Общество с ограниченной ответственностью «ПРОМОМЕД РУС». 129090, Россия, г. Москва, пр-т Мира, д. 13 стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Комаров Тимофей Николаевич. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; К. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231; Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; М. О. Попова – https://orcid.org/0009-0008-1688-1902; В. С. Щербакова – https://orcid.org/0000-0002-7251-8744; К. Я. Заславская – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; П. А. Белый – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 19.01.2024 **Статья принята в печать:** 26.02.2024 **Статья опубликована:** 26.02.2024

Резюме

Введение. Коронавирусная инфекция, спустя почти 4 года после начала пандемии, по-прежнему остается важной глобальной проблемой здравоохранения. Вирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) продолжает мутировать и распространяться по всему миру, что сохраняет потребность в препаратах для лечения коронавирусной инфекции. Молнупиравир и фавипиравир – лекарственные средства с прямым противовирусным действием в отношении РНК содержащих вирусов – рекомендованы Министерством здравоохранения Российской Федерации для включения в схемы лечения COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). Разработанный препарат содержит комбинацию двух противовирусных средств с разными механизмами подавления репликации РНК вирусов, что позволяет предполагать эффективность в отношении преобладающего большинства возбудителей ОРВИ, встречающихся в человеческой популяции, включая SARS-CoV-2, и гриппа.

Цель. Целью исследования является изучение фармакокинетики препарата JTBC00301, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в сравнении с препаратами Эсперавир® (МНН: молнупиравир), капсулы (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) и Арепливир® (МНН: фавипиравир), таблетки, покрытые пленочной оболочкой (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) с последующей проверкой гипотезы влияния монокомпонентов препарата на фармакокинетику друг друга.

Материалы и методы. В рамках открытого рандомизированного перекрестного трехпериодного клинического исследования I фазы по изучению препарата JTBC00301, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 + 400 мг (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) проводились клинический и аналитический этапы исследования, изучение фармакокинетики и статистический анализ результатов. В исследовании определялась концентрация основного метаболита молнупиравира β-D-N4-гидроксицитидина (NHC) и фавипиравира в плазме крови 42 здоровых добровольцев после приема дозы 400 + 400 мг исследуемого препарата JTBC00301 (1 таблетка), дозы 400 мг первого препарата сравнения Эсперавир® (2 капсулы по 200 мг) и дозы 400 мг второго препарата сравнения Арепливир® (2 таблетки по 200 мг). Расчет параметров описательной статистики проводился при помощи пакета Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Расчет фармакокинетических параметров, дисперсионный анализ, вычисление 90%-х доверительных интервалов и коэффициентов внутрииндивидуальной вариации проводились при помощи программного обеспечения R Project (версия 3.5.1, разработчики R Core Team, Австрия) с расширением «bear» (версия 2.8.3-2, разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань).

Результаты и обсуждение. По полученным значениям концентраций NHC и фавипиравира были рассчитаны значения фармакокинетических параметров, построены усредненные фармакокинетические профили в линейных и полулогарифмических координатах, проведен дисперсионный анализ. 90%-е доверительные интервалы для отношения средних значений C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ NHC и фавипиравира находились в пределах 80,00–125,00 %, что позволило признать гипотезу об отсутствии влияния монокомпонентов препарата на фармакокинетику друг друга.

Заключение. Разработка лекарственного препарата на основе фиксированной комбинации «молнупиравир + фавипиравир» обладает большим потенциалом, так как может повысить профиль безопасности и улучшить переносимость терапии, а также способствовать увеличению эффективности противовирусной терапии. Полученные результаты определили возможность осуществить переход к последующим фазам клинических исследований препарата JTBC00301, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 + 400 мг (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия).

Ключевые слова: молнупиравир, фавипиравир, COVID-19, фармакокинетика

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

© Комаров Т. Н., Карнакова К. К., Багаева Н. С., Арчакова О. А., Попова М. О., Щербакова В. С., Заславская К. Я., Белый П. А., Шохин И. Е., 2024
© Komarov T. N., Karnakova K. K., Bagaeva N. S., Archakova O. A., Popova M. O., Shcherbakova V. S., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Shohin I. E., 2024

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова участвовали в проведении аналитического этапа исследования. Н. С. Багаева, К. К. Карнакова проводили статистическую обработку данных и расчет фармакокинетических параметров. М. О. Попова, В. С. Щербакова, К. Я. Заславская, П. А. Белый, И. Е. Шохин отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Финансирование. Клиническое исследование спонсировалось ООО «ПРОМОМЕД РУС». В. С. Щербакова, К. Я. Заславская и П. А. Белый являются представителями данной компании.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Карнакова К. К., Багаева Н. С., Арчакова О. А., Попова М. О., Щербакова В. С., Заславская К. Я., Белый П. А., Шохин И. Е. Оценка взаимного влияния монокомпонентов комбинированного лекарственного препарата, содержащего молнупиравир и фавипиравир, на фармакокинетику в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):272–280. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1761

Reciprocal Impact of Molnupiravir and Favipiravir Monocomponents of the Combination Drug on Each Other's Pharmacokinetics in a Phase I Clinical Trial

Timofey N. Komarov[1, 2]✉, Kseniia K. Karnakova[1], Natalia S. Bagaeva[1], Olga A. Archakova[1], Maria O. Popova[1], Victoria S. Shcherbakova[3], Kira Ya. Zaslavskaya[3], Petr A. Bely[3], Igor E. Shohin[1]

[1] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
[2] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
[3] LLC «PROMOMED RUS». 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ **Corresponding author:** Timofey N. Komarov. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Kseniia K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231;
Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060;
Maria O. Popova – https://orcid.org/0009-0008-1688-1902; Victoria S. Shcherbakova – https://orcid.org/0000-0002-7251-8744;
Kira Ya. Zaslavskaya – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; Petr A. Bely – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874;
Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 19.01.2024 **Revised:** 26.02.2024 **Published:** 26.02.2024

Abstract

Introduction. COVID-19 (Coronavirus disease 2019) almost 4 years after he start of the pandemic is still a significant public health problem. SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) that causes COVID-19 continues to mutate and spread throughout the world. Molnupiravir and favipiravir have been shown to be efficacious against variety of RNA viruses including the SARS-CoV-2. The Ministry of Health of the Russian Federation approved the use of these drugs as a treatment of COVID-19. The developed drug contains the combination of two antiviral agents with different mechanisms of suppressing viral RNA replication, which suggests efficacy against the vast majority of ARVI pathogens found in the human population including SARS-CoV-2 and influenza.

Aim. The aim of the pharmacokinetics study is comparison between JTBC00301 (INN: molnupiravir + favipiravir), film-coated tablets (LLC "PROMOMED RUS", Russia), Esperavir® (INN: molnupiravir), capsules (LLC "PROMOMED RUS", Russia) and Areplivir® (INN: favipiravir), film-coated tablets (LLC "PROMOMED RUS", Russia) to evaluate the impact of monocomponents on each other's pharmacokinetics.

Materials and methods. The clinical and analytical phases as well as pharmacokinetic analyses have been performed as a part of a phase I, randomized, open-label, 3-period crossover study of drug JTBC00301 (INN: molnupiravir + favipiravir), film-coated tablets, 400 + 400 mg (LLC "PROMOMED RUS", Russia). The plasma concentration of β-D-N4-hydroxycytidine (NHC), the active metabolite of molnupiravir and favipiravir were determined in 42 healthy volunteers after taking the test drug JTBC00301 (1 tablet of 400 + 400 mg), the reference drug Esperavir® (2 capsules of 200 mg) and the reference drug Areplivir® (2 tablets of 200 mg). The descriptive statistics were calculated using Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). The pharmacokinetic parameters, analysis of variance (ANOVA), the intra-subject coefficient of variation (CVintra) and 90 % confidence intervals (90 % CI) were calculated by R Project 3.5.1 software (package «bear», version 2.8.3-2), originally created by Hsin-ya Lee and Yung-jin Lee, Taiwan.

Results and discussion. Pharmacokinetic parameters of NHC and favipiravir were determined, averaged pharmacokinetic profiles in linear and log-linear scales were plotted, analysis of variance was carried out. The 90% CIs for geometric mean ratios of C_{max} and $AUC_{(0-t)}$ for NHC and favipiravir were all within the acceptance range of 80–125 % which means there is no effect of monocomponents on each other's pharmacokinetics.

Conclusion. The development of the fixed-dose drug combination of molnupiravir and favipiravir has great potential as it may allow to increase the safety profile and improve the tolerability of therapy as well as increase the effectiveness of antiviral therapy. The results justified the study of the subsequent phases of clinical trials of JTBC00301 (INN: molnupiravir + favipiravir), film-coated tablets, 400 + 400 mg (LLC "PROMOMED RUS", Russia).

Keywords: molnupiravir, favipiravir, COVID-19, pharmacokinetics

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

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova participated in the clinical phase of the study. Natalia S. Bagaeva and Kseniia K. Karnakova carried out statistical processing of the obtained results. Maria O. Popova, Victoria S. Shcherbakova, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely and Igor E. Shohin carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

Funding. A clinical study was sponsored by LLC "PROMOMED RUS". Authors Victoria S. Shcherbakova, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely represent LLC "PROMOMED RUS".

For citation: Komarov T. N., Karnakova K. K., Bagaeva N. S., Archakova O. A., Popova M. O., Shcherbakova V. S., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Shohin I. E. Reciprocal impact of molnupiravir and favipiravir monocomponents of the combination drug on each other's pharmacokinetics in a phase I clinical trial. *Drug development & registration*. 2024;13(1):272–280. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1761

ВВЕДЕНИЕ

Впервые заражение вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) из семейства *Coronaviridae* было зафиксировано декабре 2019 года в Китае. Новое инфекционное заболевание, названное Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ)[1] коронавирусной инфекцией [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)], быстро распространилось по всему миру и вызвало пандемию [1–6].

В мае 2023 года Генеральным директором ВОЗ было объявлено[2] о прекращении чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения, вызванной COVID-19. Несмотря на это, коронавирусная инфекция, спустя почти 4 года после начала пандемии, по-прежнему остается важной глобальной проблемой здравоохранения. Вирус SARS-CoV-2 продолжает мутировать и распространяться во всех странах, что сохраняет потребность в препаратах для лечения коронавирусной инфекции [7–9].

В последнее время в силу расширения доступности средств для диагностики и лечения, а также формирования иммунитета населения против COVID-19 в результате вакцинации или перенесенной инфекции, наблюдается значительное снижение воздействия коронавирусной инфекции[3]. Несмотря на отчетливую тенденцию снижения смертности и уровня госпитализации, во всем мире продолжают регистрировать случаи летальных исходов от коронавирусной инфекции. Кроме того, значительное число переболевших коронавирусной инфекцией сталкиваются с последствиями после перенесенного заболевания, на протяжении многих месяцев испытывая проблемы со здоровьем [10]. Важно продолжать проводить исследования одобренных средств для лечения COVID-19, а также осуществлять разработку новых лекарственных препаратов, способствующих снижению интенсивности распространения вируса и имеющих перспективы широкого применения[4] [9, 11].

Молнупиравир и фавипиравир – лекарственные средства с прямым противовирусным действием в отношении SARS-CoV-2 и других РНК содержащих вирусов [12–17]. Молнупиравир и фавипиравир рекомендованы Министерством здравоохранения Российской Федерации для включения в схемы лечения COVID-19[5]. И молнупиравир, и фавипиравир обладает высокой биодоступностью при пероральном приеме [18–21].

Разработанный препарат содержит комбинацию двух противовирусных средств с разными механизмами подавления репликации РНК вирусов, что позволяет предполагать эффективность в отношении преобладающего большинства возбудителей ОРВИ, встречающихся в человеческой популяции, включая SARS-CoV-2, и гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический, аналитический этапы исследования, изучение фармакокинетических параметров проводились в рамках клинического исследования I фазы «Открытое рандомизированное перекрестное сравнительное исследование фармакокинетики, безопасности и переносимости лекарственного препарата JTBC00301 (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) с участием здоровых добровольцев» по изучению комбинированного лекарственного препарата JTBC00301, содержащего молнупиравир и фавипиравир, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 + 400 мг (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) (далее – JTBC00301). Данное исследование было одобрено Министерством здравоохранения Российской Федерации РКИ №309 от 25.04.2022, протокол № MLF-022022[6].

В исследовании определялась концентрация основного метаболита молнупиравира β-D-N4-гидроксицитидина (далее – NHC) и фавипиравира в плазме крови добровольцев после приема натощак дозы 400 мг+400 мг (1 таблетка) исследуемого препарата JTBC00301, дозы 400 мг (2 капсулы по 200 мг) препарата сравнения Эсперавир® (МНН: молнупиравир), капсулы, 400 мг (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) (далее – Эсперавир®), или дозы 400 мг (2 таблетки по 200 мг) препарата сравнения Арепливир® (МНН: фавипиравир), таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 мг (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) (далее – Арепливир®).

Клинический этап исследования

Выборка добровольцев состояла из 42 здоровых мужчин в возрасте от 18 до 45 лет, которые соответствовали критериям включения клинического

[1] Хронология действий ВОЗ по борьбе с COVID-19. Доступно по: https://www.who.int/ru/news-room/detail/29-06-2020-covidtimeline. Ссылка активна на 16.10.2023.

[2] Доклад Комитета по обзору ММСП для рассмотрения постоянных рекомендаций по COVID-19 (4 августа 2023). Доступно по: https://www.who.int/ru/publications/m/item/report-of-the-review-committee-regarding-standing-recommendations-for-covid-19. Ссылка активна на 16.10.2023.

[3] Там же.

[4] Там же.

[5] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 18 (26.10.2023)». Доступно по: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/064/610/original/BMP_COVID-19_V18.pdf. Ссылка активна на 27.10.2023.

[6] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации: Реестр разрешений на проведение клинических исследований 309. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=a480039d-7d34-4f8d-83fe-bf0c7bfc5d68&CIPermGUID=8b99d5fb-a60a-46b8-b5db-150478b658cc. Ссылка активна на 27.10.2023.

исследования. Субъекты были рандомизированы в три группы по 14 человек.

Добровольцам на 13 часов устанавливался кубитальный гепаринизированный катетер. После снятия катетера отборы крови проводился путем венепункции. После установки катетера отбиралась нулевая проба крови (за 5–10 минут до приема лекарственного препарата). Дальнейший отбор осуществлялся через 0,5 ч; 0,75 ч; 1 ч; 1,25 ч; 1,5 ч; 1,75 ч; 2 ч; 2,25 ч; 2,5 ч; 3 ч; 3,5 ч; 4 ч; 6 ч; 8 ч; 10 ч; 12 ч; 24 ч после приема препарата. Отмывочный период между приемами изучаемых лекарственных препаратов составлял 7 дней.

Образцы крови отбирались в пробирки, содержащие антикоагулянт K_2ЭДТА, и центрифугировались при 3000 об/мин в течение 10 минут при температуре +4 °С. Полученная плазма разделялась для каждого определяемого вещества на аликвоту для анализа и аликвоту для повторных анализов в предварительно маркированные криопробирки, которые замораживались и хранились при температуре не выше –35 °С. Транспортировка образцов для анализа в аналитическую лабораторию осуществлялась при контролируемом температурном режиме не выше –35 °С.

Аналитический этап исследования

Подробное описание методики количественного определения исследуемых действующих веществ в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС и ее валидация приведены в статье [11].

Статистическая обработка данных и анализ фармакокинетики

Значений концентраций NHC и фавипиравира в плазме крови человека во времени, полученные в ходе аналитического этапа исследования, характеризовались следующими фармакокинетическими параметрами:

- ✓ C_{max} – максимальная концентрация лекарственного вещества;
- ✓ t_{max} – время достижения максимальной концентрации лекарственного вещества;
- ✓ $AUC_{(0–t)}$ – площадь под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке *t*;
- ✓ $AUC_{(0–\infty)}$ – площадь под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности;
- ✓ k_{el} – константа скорости терминальной элиминации лекарственного вещества;
- ✓ $t_{1/2}$ – период полувыведения лекарственного вещества;
- ✓ $AUC_{(0–t)}/AUC_{(0–\infty)}$ – отношение значения площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке *t* к значению площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности;
- ✓ $AUC_{(t–\infty)}$ – экстраполируемая площадь под кривой «концентрация – время».

После логарифмирования значений фармакокинетических параметров проводился дисперсионный анализ (analysis of variance, далее – ANOVA) при заданном уровне значимости $\alpha = 0{,}05$. Использовалась процедура общей линейной модели с фиксированными факторами, вносящими вклад в наблюдаемую вариацию данных: лекарственный препарат, последовательность приема лекарственных препаратов, доброволец, вложенный в фактор «последовательность приема лекарственных препаратов» (далее – доброволец * последовательность приема), период.

На основе результатов дисперсионного анализа вычислялись 90%-е доверительные интервалы, которые подвергались обратному преобразованию, и проводилась проверка гипотезы влияния монокомпонентов изучаемого лекарственного препарата на фармакокинетику друг друга.

Нулевая гипотеза состояла в том, что истинное отношение геометрического среднего исследуемого препарата JTBC00301 к геометрическому среднему препаратов сравнения Эсперавир®/Арепливир® для $AUC_{(0–t)}$ и C_{max} менее 80,00 % или более 125,00 %, то есть монокомпоненты препарата оказывают влияние на фармакокинетику друг друга. Альтернативная гипотеза состояла в том, что истинное отношение геометрического среднего исследуемого препарата JTBC00301 к геометрическому среднему препарата сравнения Эсперавир®/Арепливир® находилось в интервале 80,00–125,00 % для фармакокинетических параметров $AUC_{(0–t)}$ и C_{max}, то есть монокомпоненты препарата не оказывают влияние на фармакокинетику друг друга.

Расчет параметров описательной статистики проводился при помощи пакета Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Расчет фармакокинетических параметров, ANOVA и вычисление 90%-х доверительных интервалов проводились при помощи программного обеспечения R Project (версия 3.5.1, разработчики R Core Team) с расширением «bear» (версия 2.8.3-2, разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань). Статистический анализ различий параметра t_{max} проводился с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни для независимых выборок (непреобразованные данные, двусторонний тест) с помощью программы обеспечения R Project (версия 3.5.1, разработчики R Core Team) с расширением «stats» (версия 3.5.1, разработчики R Core Team), функция wilcox.test, заданный уровень значимости $\alpha = 0{,}05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В анализ фармакокинетики были включены данные 42 добровольцев, принявших исследуемый препарат JTBC00301 (T), препараты сравнения Эсперавир® (R1) и Арепливир® (R2) и завершивших исследование согласно Протоколу клинического исследования.

β-D-N4-гидроксицитидин (NHC)

Усредненные значения фармакокинетических параметров NHC после приема препаратов JTBC00301 и Эсперавир® приведены в таблице 1. Усредненные фармакокинетические профили в линейных и полулогарифмических координатах со стандартными отклонениями в каждой временной точке для NHC приведены на рисунках 1–2.

Таблица 1. Усредненные значения фармакокинетических параметров

Table 1. Summary data of pharmacokinetic parameters

Фармакокинетический параметр Pharmacokinetic parameter	β-D-N4-гидроксицитидин (NHC) β-D-N4-hydroxycytidine (NHC)	
	JTBC00301	Эсперавир® Esperavir®
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/mL	1830,99 (595,36) [42]	1677,30 (529,53) [42]
$AUC_{(0-t)}$, нг · ч/мл $AUC_{(0-t)}$, ng · h/mL	4531,77 (1288,30) [42]	4398,15 (1179,13) [42]
$AUC_{(0-\infty)}$, нг · ч/мл $AUC_{(0-\infty)}$, ng · h/mL	4708,33 (1284,50) [42]	4666,39 (1100,30) [40]
t_{max}, ч t_{max}, h	1,75 (0,75–3) [42]	1,5 (0,75–4) [42]
k_{el}, $ч^{-1}$ k_{el}, h^{-1}	0,607 (0,149) [42]	0,624 (0,153) [40]
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	1,26 (0,55) [42]	1,18 (0,33) [40]
$AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, % $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, %	95,96 (2,87) [42]	96,09 (2,09) [40]
$AUC_{(t-\infty)}$, % $AUC_{(t-\infty)}$, %	4,04 (2,87) [42]	3,91 (2,08) [40]

Примечание. Для всех параметров кроме t_{max} приведены значения Mean (SD) [*n*], для t_{max} приведены значения Median (Min – Max) [*n*].

Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, Median – медиана, Min – минимальное значение, Max – максимальное значение, *n* – количество субъектов для расчета фармакокинетического параметра.

Note. Parameters are expressed as Mean (SD) except for t_{max}, which is expressed as Median (Min – Max).

Mean – arithmetic mean, SD – standard deviation, Median – median, Min – minimum value, Max – maximum value, *n* – number of subjects for pharmacokinetic parameter calculation.

Различия по фармакокинетическому параметру tmax между исследуемым препаратом JTBC00301 и препаратом сравнения Эсперавир® статистически не значимы ($p = 0,37$, U-критерий Манна – Уитни).

Результаты дисперсионного анализа значений фармакокинетических параметров NHC приведены в таблице 2. Полученные результаты позволили для фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ принять нулевую гипотезу о том, что различия в средних

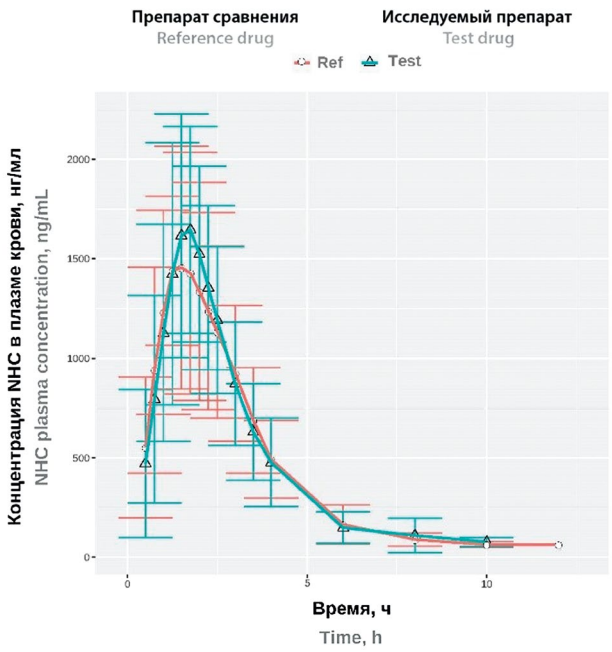


Рисунок 1. Усредненные фармакокинетические профили NHC (в линейных координатах со стандартными отклонениями)

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles of NHC (linear scale with standard deviations)

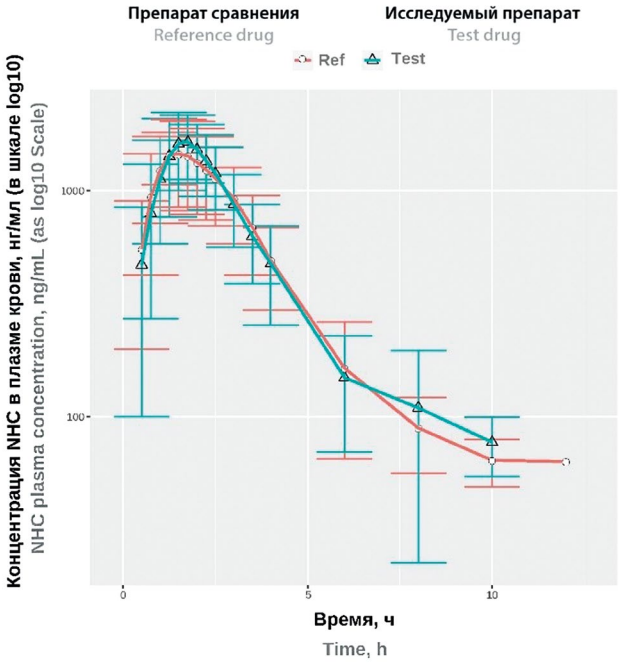


Рисунок 2. Усредненные фармакокинетические профили NHC (в лог-линейных координатах со стандартными отклонениями)

Figure 2. Average pharmacokinetic profiles of NHC (log-linear scale with standard deviations)

значениях основных фармакокинетических параметров не вызваны различиями между сравниваемыми препаратами (кроме фактора «доброволец * последовательность приема»).

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0–t)}$ NHC [DF – число степеней свободы; SS – сумма квадратов отклонений; MS – средний квадрат отклонений]

Table 2. Analysis of variance results of NHC pharmacokinetic parameters C_{max} and $AUC_{(0–t)}$ [DF – Degrees of Freedom; SS – Sum of Squares; MS – Mean Squares]

Параметр Parameter	Источник вариации Source of variation	DF	SS	MS	F-статистика F-value	p-величина p-value	Значимость Significance
ln C_{max}	Последовательность приема лекарственных препаратов Sequence	1	0,045	0,045	0,343	0,56	Незначим Non-significant
	Период Period	1	0,123	0,123	1,940	0,17	Незначим Non-significant
	Лекарственный препарат Drug	1	0,254	0,254	3,991	0,05	Незначим Non-significant
	Доброволец * последовательность приема Subject * Sequence	40	7,954	0,199	3,125	<0,05	Значим Significant
	Остаточная дисперсия Residual	40	2,545	0,064			
ln $AUC_{(0–t)}$	Последовательность приема лекарственных препаратов Sequence	1	0,012	0,012	0,147	0,70	Незначим Non-significant
	Период Period	1	0,053	0,053	1,235	0,27	Незначим Non-significant
	Лекарственный препарат Drug	1	0,046	0,046	1,084	0,30	Незначим Non-significant
	Доброволец * последовательность приема Subject * Sequence	40	4,965	0,124	2,916	<0,05	Значим Significant
	Остаточная дисперсия Residual	40	1,703	0,043			

Примечание. Для фактора «Последовательность приема лекарственных препаратов» в качестве термина ошибки используется средний квадрат отклонений фактора «Доброволец * последовательность приема».

Note. For the factor "Sequence" Mean Square (MS) of "Subject * Sequence" factor is used as an error term.

Коэффициенты внутрииндивидуальной вариации (CV_{intra}) NHC, полученные в результате дисперсионного анализа, для фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0–t)}$ составили 25,63 и 20,85 %, соответственно. Полученные доверительные интервалы лежат в пределах 80,00–125,00 %, что позволило сделать вывод о том, что монокомпоненты препарата не оказывают влияние на фармакокинетику NHC (таблица 5).

Фавипиравир

Усредненные значения фармакокинетических параметров фавипиравира после приема препаратов JTBC00301 и Арепливир® приведены в таблице 3. Усредненные фармакокинетические профили в линейных и полулогарифмических координатах со стандартными отклонениями для фавипиравира приведены на рисунках 3–4.

Различия по фармакокинетическому параметру t_{max} между исследуемым препаратом JTBC00301 и препаратом сравнения Арепливир® статистически значимы ($p = 0,001$, U-критерий Манна – Уитни).

Результаты дисперсионного анализа значений фармакокинетических параметров фавипиравира приведены в таблице 4. Полученные результаты позволили для фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0–t)}$ принять нулевую гипотезу о том, что различия в средних значениях основных фармакокинетических параметров не вызваны различиями между сравниваемыми препаратами только для фактора «Период» для фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0–t)}$, а также для фактора «Лекарственный препарат» – для фармакокинетического параметра $AUC_{(0–t)}$.

Коэффициенты внутрииндивидуальной вариации (CV_{intra}) фавипиравира для фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{0–t}$ составили 20,40 и 24,35 %, соответственно. Полученные доверительные интервалы лежат в пределах 80,00–125,00 %, что позволило сделать вывод о том, что монокомпоненты препарата не оказывают влияние на фармакокинетику фавипиравира (таблица 5).

Таблица 3. Усредненные значения фармакокинетических параметров

Table 3. Summary data of pharmacokinetic parameters

Фармакокинетический параметр Pharmacokinetic parameter	Фавипиравир Favipiravir	
	JTBC00301	Арепливир® Areplivir®
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/mL	9293,34 (2780,23) [42]	9938,70 (3013,34) [42]
$AUC_{(0-t)}$, нг · ч/мл $AUC_{(0-t)}$, ng · h/mL	31607,57 (20374,99) [42]	29812,25 (15162,05) [42]
$AUC_{(0-\infty)}$, нг · ч/мл $AUC_{(0-\infty)}$, ng · h/mL	34324,82 (23244,08) [42]	31386,51 (16222,25) [42]
t_{max}, ч t_{max}, h	1,13 (0,5 – 3,5) [42]	0,75 (0,5 – 2) [42]
k_{el}, $ч^{-1}$ k_{el}, h^{-1}	0,396 (0,150) [42]	0,398 (0,127) [42]
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	2,18 (1,33) [42]	1,93 (0,63) [42]
$AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, % $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, %	93,75 (6,13) [42]	95,09 (1,82) [42]
$AUC_{(t-\infty)}$, % $AUC_{(t-\infty)}$, %	6,25 (6,13) [42]	4,92 (1,82) [42]

Примечание. Для всех параметров кроме t_{max} приведены значения Mean (SD) [*n*], для t_{max} приведены значения Median (Min – Max) [*n*].

Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, Median – медиана, Min – минимальное значение, Max – максимальное значение, *n* – количество субъектов для расчета фармакокинетического параметра.

Note. Parameters are expressed as Mean (SD) except for t_{max}, which is expressed as Median (Min – Max).

Mean – arithmetic mean, SD – standard deviation, Median – median, Min – minimum value, Max – maximum value, *n* – number of subjects for pharmacokinetic parameter calculation.

Таблица 5. Точечная оценка, 90 % доверительные интервалы фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ NHC и фавипиравира

Table 5. Point estimate, 90 % confidence intervals of NHC and favipiravir pharmacokinetic parameters C_{max} and $AUC_{(0-t)}$

Фармакокинетический параметр Pharmacokinetic parameter	Точечная оценка, % Point estimate, %	L-90, %	U-90, %
β-D-N4-гидроксицитидин (NHC) **β-D-N4-hydroxycytidine (NHC)**			
C_{max}	112,37	101,85	123,98
$AUC_{(0-t)}$	105,10	96,98	113,90
Фавипиравир **Favipiravir**			
C_{max}	90,49	83,64	97,90
$AUC_{(0-t)}$	98,43	89,67	108,04

Таблица 4. Результаты дисперсионного анализа фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ фавипиравира [DF – число степеней свободы; SS – Сумма квадратов отклонений; MS – средний квадрат отклонений]

Table 4. Analysis of variance results of favipiravir pharmacokinetic parameters C_{max} and $AUC_{(0-t)}$ [DF – degrees of freedom; SS – Sum of Squares; MS – Mean Squares]

Параметр Parameter	Источник вариации Source of variation	DF	SS	MS	F-статистика F-value	p-величина p-value	Значимость Significance
ln C_{max}	Последовательность приема лекарственных препаратов Sequence	1	1,875	1,875	28,390	<0,05	Значим Significant
	Период Period	1	0,064	0,064	1,563	0,22	Незначим Non-significant
	Лекарственный препарат Drug	1	0,187	0,186	4,575	<0,05	Значим Significant
	Доброволец * последовательность приема Subject * Sequence	40	3,536	0,088	2,169	<0,05	Значим Significant
	Остаточная дисперсия Residual	40	1,630	0,041			
ln $AUC_{(0-t)}$	Последовательность приема лекарственных препаратов Sequence	1	4,297	4,297	22,630	<0,05	Значим Significant
	Период Period	1	0,178	0,178	3,115	0,09	Незначим Non-significant
	Лекарственный препарат Drug	1	0,005	0,005	0,082	0,78	Незначим Non-significant
	Доброволец * последовательность приема Subject * Sequence	40	13,104	0,328	5,734	<0,05	Значим Significant
	Остаточная дисперсия Residual	40	2,285	0,057			

Примечание. Для фактора «Последовательность приема лекарственных препаратов» в качестве термина ошибки используется средний квадрат отклонений фактора «Доброволец * последовательность приема»

Note. For the factor "Sequence" Mean Square (MS) of "Subject * Sequence" factor is used as an error term.

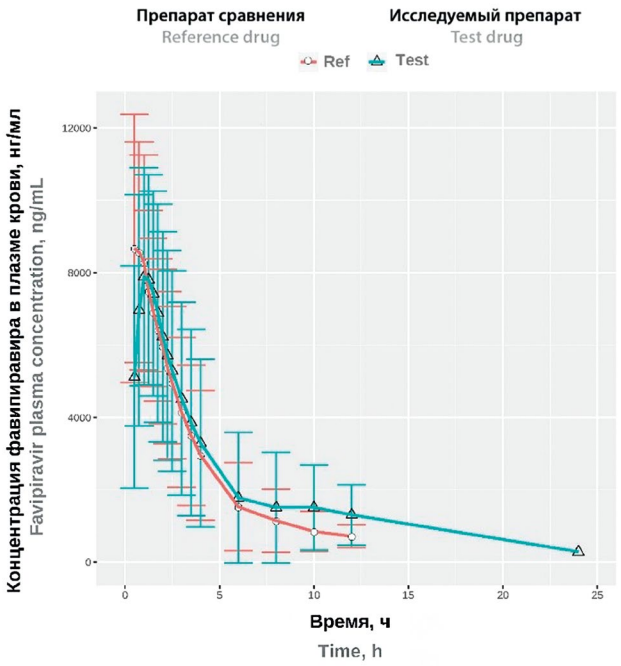


Рисунок 3. Усредненные фармакокинетические профили фавипиравира (в линейных координатах со стандартными отклонениями)

Figure 3. Average pharmacokinetic profiles of favipiravir (linear scale with standard deviations)

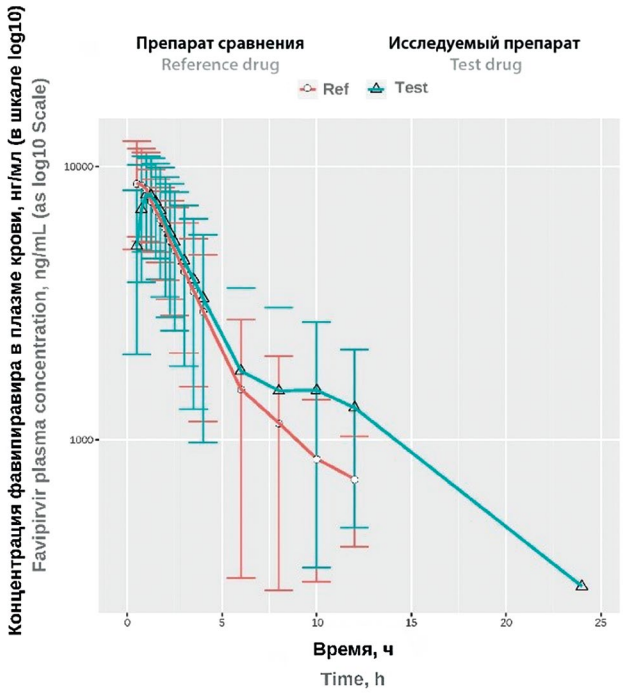


Рисунок 4. Усредненные фармакокинетические профили фавипиравира (в лог-линейных координатах со стандартными отклонениями)

Figure 4. Average pharmacokinetic profiles of favipiravir (log-linear scale with standard deviations)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По полученным значениям фармакокинетических параметров были построены усредненные фармакокинетические профили, проведен дисперсионный анализ. Полученные доверительные интервалы для NHC и фавипиравира позволяют признать гипотезу об отсутствии влияния монокомпонентов препарата на фармакокинетику друг друга.

Разработка лекарственного препарата на основе фиксированной комбинации «молнупиравир + фавипиравир» обладает большим потенциалом, так как может повысить профиль безопасности и улучшить переносимость терапии, а также способствовать увеличению эффективности противовирусной терапии. Результаты исследования определили возможность осуществить переход к последующим фазам клинических исследований препарата JTBC00301, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 400 + 400 мг (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Cui J., Li F., Shi Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(3):181–192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
2. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–1062.
3. Cheng Z. J., Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*. 2020;48(2):155–163. DOI: 10.1007/s15010-020-01401-y.
4. Cao Y., Cai K., Xiong L. Coronavirus disease 2019: A new severe acute respiratory syndrome from Wuhan in China. *Acta Virol*. 2020;64(2):245–250. DOI: 10.4149/av_2020_201.
5. Ciotti M., Ciccozzi M., Terrinoni A., Jiang W. C., Wang C. B., Bernardini S. The COVID-19 pandemic. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2020;57(6):365–388. DOI: 10.1080/10408363.2020.1783198.
6. Harapan H., Itoh N., Yufika A., Winardi W., Keam S., Te H., Megawati D., Hayati Z., Wagner A. L., Mudatsir M. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. Journal of Infection and Public Health. 2020;13(5):667–673. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.03.019.
7. Singh R. S. P., Toussi S. S., Hackman F., Chan P. L., Rao R., Allen R., Van Eyck L., Pawlak S., Kadar E. P., Clark F., Shi H., Anderson A. S., Binks M., Menon S., Nucci G., Bergman A. Innovative Randomized Phase I Study and Dosing Regimen Selection to Accelerate and Inform Pivotal COVID-19 Trial of Nirmatrelvir. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2022;112(1):101–111. DOI: 10.1002/cpt.2603.
8. González-Vázquez L. D., Arenas M. Molecular Evolution of SARS-CoV-2 during the COVID-19 Pandemic. *Genes*. 2023;14(2):407. DOI: 10.3390/genes14020407.
9. Синявин А. Э., Руссу Л. И., Васина Д. В., Шидловская Е. В., Кузнецова Н. А., Гущин В. А., Гинцбург А. Л. Эффективность фавипиравира и молнупиравира против новых вариантов SARS-CoV-2 в системах *in vitro* и *in vivo*. *Вестник РГМУ*. 2022;6:112–117. DOI: 10.24075/vrgmu.2022.071.
10. Воробьева П. А., ред. Рекомендации по ведению больных с коронавирусной инфекцией COVID-19 в острой фазе и при постковидном синдроме в амбулаторных условиях. *Проблемы стандартизации в здравоохранении*. 2021;7–8:3–96. DOI: 10.26347/1607-2502202107-08003-096.
11. Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β-D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плаз-

ме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):215–226. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.
12. Delang L., Neyts J. Medical treatment options for COVID-19. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care.* 2020;9(3):209–214. DOI: 10.1177/2048872620922790.
13. Jayk Bernal A., Gomes da Silva M. M., Musungaie D. B., Kovalchuk E., Gonzalez A., Delos Reyes V., Martín-Quirós A., Caraco Y., Williams-Diaz A., Brown M. L., Du J., Pedley A., Assaid C., Strizki J., Grobler J. A., Shamsuddin H. H., Tipping R., Wan H., Paschke A., Butterton J. R., Johnson M. G., De Anda C., MOVe-OUT Study Group. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *The New England Journal of Medicine.* 2022;386(6):509–520. DOI: 10.1056/NEJMoa2116044.
14. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacology & Therapeutics*. 2020;209:107512. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107512.
15. Леонова М. В. Фавипиравир как потенциальное средство противодействия при COVID-19. *Consilium Medicum*. 2020;22(11):56–60. DOI: 10.26442/20751753.2020.11.200368.
16. Li P., Wang Y., Lavrijsen M., Lamers M. M., de Vries A. C., Rottier R. J., Bruno M. J., Peppelenbosch M. P., Haagmans B. L., Pan Q. SARS-CoV-2 Omicron variant is highly sensitive to molnupiravir, nirmatrelvir, and the combination. *Cell Research*. 2022;32:322–324. DOI: 10.1038/s41422-022-00618-w.
17. Komarov T., Karnakova P., Archakova O., Shchelgacheva D., Bagaeva N., Popova M., Karpova P., Zaslavskaya K., Bely P., Shohin I. Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) Method for Quantification of Major Molnupiravir Metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) in Human Plasma. *Biomedicines*. 2023;11(9):2356. DOI: 10.3390/biomedicines11092356.
18. Sharaf Y. A., El Deeb S., Ibrahim A. E., Al-Harrasi A., Sayed R. A. Two Green Micellar HPLC and Mathematically Assisted UV Spectroscopic Methods for the Simultaneous Determination of Molnupiravir and Favipiravir as a Novel Combined COVID-19 Antiviral Regimen. *Molecules*. 2022;27(7):2330. DOI: 10.3390/molecules27072330.
19. Tian L., Pang Z., Li M., Lou F., An X., Zhu S., Song L., Tong Y., Fan H., Fan J. Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19. *Frontiers in immunology*. 2022;13:855496. DOI: 10.3389/fimmu.2022.855496.
20. Singh A. K., Singh A., Singh R., Misra A. Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2021;15(6):102329. DOI: 10.1016/j.dsx.2021.102329.
21. Syed Y. Y. Molnupiravir: First Approval. *Drugs*. 2022;82(4):455–460. DOI: 10.1007/s40265-022-01684-5.

REFERENCES

1. Cui J., Li F., Shi Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(3):181–192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
2. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–1062.
3. Cheng Z. J., Shan J. 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*. 2020;48(2):155–163. DOI: 10.1007/s15010-020-01401-y.
4. Cao Y., Cai K., Xiong L. Coronavirus disease 2019: A new severe acute respiratory syndrome from Wuhan in China. *Acta Virol*. 2020;64(2):245–250. DOI: 10.4149/av_2020_201.
5. Ciotti M., Ciccozzi M., Terrinoni A., Jiang W. C., Wang C. B., Bernardini S. The COVID-19 pandemic. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2020;57(6):365–388. DOI: 10.1080/10408363.2020.1783198.
6. Harapan H., Itoh N., Yufika A., Winardi W., Keam S., Te H., Megawati D., Hayati Z., Wagner A. L., Mudatsir M. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. Journal of Infection and Public Health. 2020;13(5):667–673. DOI: 10.1016/j.jiph.2020.03.019.
7. Singh R. S. P., Toussi S. S., Hackman F., Chan P. L., Rao R., Allen R., Van Eyck L., Pawlak S., Kadar E. P., Clark F., Shi H., Anderson A. S., Binks M., Menon S., Nucci G., Bergman A. Innovative Randomized Phase I Study and Dosing Regimen Selection to Accelerate and Inform Pivotal COVID-19 Trial of Nirmatrelvir. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2022;112(1):101–111. DOI: 10.1002/cpt.2603.
8. González-Vázquez L. D., Arenas M. Molecular Evolution of SARS-CoV-2 during the COVID-19 Pandemic. *Genes*. 2023;14(2):407. DOI: 10.3390/genes14020407.
9. Siniavin A. E., Russu L. I., Vasina D. V., Shidlovskaya E. V., Kuznetsova N. A., Gushchin V. A., Gintsburg A. L. Efficacy of favipiravir and molnupiravir against novel SARS-CoV-2 variants *in vitro* and *in vivo*. *Bulletin of RSMU*. 2022:6:112–117. (In Russ.) DOI: 10.24075/brsmu.2022.071.
10. Vorobyev P. A., editor. Recommendations for the management of patients with COVID-19 coronavirus infection in the acute phase and with postcovid syndrome in outpatient settings. *Problems of standardization in healthcare*. 2021;7–8:3–96. (In Russ.) DOI: 10.26347/1607-2502202107-08003-096.
11. Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Y., Bely P. A. Simultaneous Determination of Major Molnupiravir Metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) and Favipiravir in Human Plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(1):215–226. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.
12. Delang L., Neyts J. Medical treatment options for COVID-19. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care.* 2020;9(3):209–214. DOI: 10.1177/2048872620922790.
13. Jayk Bernal A., Gomes da Silva M. M., Musungaie D. B., Kovalchuk E., Gonzalez A., Delos Reyes V., Martín-Quirós A., Caraco Y., Williams-Diaz A., Brown M. L., Du J., Pedley A., Assaid C., Strizki J., Grobler J. A., Shamsuddin H. H., Tipping R., Wan H., Paschke A., Butterton J. R., Johnson M. G., De Anda C., MOVe-OUT Study Group. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *The New England Journal of Medicine.* 2022;386(6):509–520. DOI: 10.1056/NEJMoa2116044.
14. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacology & Therapeutics*. 2020;209:107512. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107512.
15. Leonova M. V. Favipiravir as a potential countermeasure for COVID-19. *Consilium Medicum*. 2020;22(11):56–60. (In Russ.) DOI: 10.26442/20751753.2020.11.200368.
16. Li P., Wang Y., Lavrijsen M., Lamers M. M., de Vries A. C., Rottier R. J., Bruno M. J., Peppelenbosch M. P., Haagmans B. L., Pan Q. SARS-CoV-2 Omicron variant is highly sensitive to molnupiravir, nirmatrelvir, and the combination. *Cell Research*. 2022;32:322–324. DOI: 10.1038/s41422-022-00618-w.
17. Komarov T., Karnakova P., Archakova O., Shchelgacheva D., Bagaeva N., Popova M., Karpova P., Zaslavskaya K., Bely P., Shohin I. Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) Method for Quantification of Major Molnupiravir Metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) in Human Plasma. *Biomedicines*. 2023;11(9):2356. DOI: 10.3390/biomedicines11092356.
18. Sharaf Y. A., El Deeb S., Ibrahim A. E., Al-Harrasi A., Sayed R. A. Two Green Micellar HPLC and Mathematically Assisted UV Spectroscopic Methods for the Simultaneous Determination of Molnupiravir and Favipiravir as a Novel Combined COVID-19 Antiviral Regimen. *Molecules*. 2022;27(7):2330. DOI: 10.3390/molecules27072330.
19. Tian L., Pang Z., Li M., Lou F., An X., Zhu S., Song L., Tong Y., Fan H., Fan J. Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19. *Frontiers in immunology*. 2022;13:855496. DOI: 10.3389/fimmu.2022.855496.
20. Singh A. K., Singh A., Singh R., Misra A. Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2021;15(6):102329. DOI: 10.1016/j.dsx.2021.102329.
21. Syed Y. Y. Molnupiravir: First Approval. *Drugs*. 2022;82(4):455–460. DOI: 10.1007/s40265-022-01684-5.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1764
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Изучение фармакокинетики препарата Арепливир® Цинк (МНН: фавипиравир + цинка глюконат) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования

Т. Н. Комаров[1, 2]✉, Н. С. Багаева[1], К. К. Карнакова[1], О. А. Арчакова[1], Д. С. Щелгачева[1], В. С. Щербакова[3], К. Я. Заславская[3], П. А. Белый[3], А. В. Таганов[2], И. Е. Шохин[1]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН). 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
[3] Общество с ограниченной ответственностью «ПРОМОМЕД РУС». 129090, Россия, г. Москва, пр-т Мира, д. 13 стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Комаров Тимофей Николаевич. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; К. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231; О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Д. С. Щелгачева – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001; В. С. Щербакова – https://orcid.org/0000-0002-7251-8744; К. Я. Заславская – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; П. А. Белый – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874; А. В. Таганов – https://orcid.org/0000-0001-5056-374X; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 19.01.2024 **Статья принята в печать:** 26.02.2024 **Статья опубликована:** 26.02.2024

Резюме

Введение. Фавипиравир является РНК-зависимым ингибитором РНК-полимеразы и обладает широкой активностью против РНК-вирусов, включая вирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). Компанией ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия разработан лекарственный препарат Арепливир® Цинк, являющийся комбинацией фавипиравира (200 мг) с глюконатом цинка (70 мг) в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Монокомпоненты данного комбинированного препарата дополняют фармакологические эффекты друг друга, усиливая противовирусное действие и обеспечивая более легкое течение коронавирусной инфекции.

Цель. Целью исследования является изучение фармакокинетики препарата Арепливир® Цинк (МНН: фавипиравир + глюконат цинка), 200 + 70 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в сравнении с препаратом Арепливир® (МНН: Фавипиравир), 200 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) с последующей проверкой гипотезы влияния цинка на фармакокинетику фавипиравира.

Материалы и методы. В рамках клинического исследования I фазы проводился клинический и аналитический этап исследования, анализ фармакокинетических параметров. Для фавипиравира хроматографическое разделение и детектирование проводили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)] Nexera XR с тандемным тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Аналитический диапазон методики для фавипиравира в плазме крови составил 50,00–15 000,00 нг/мл. Для определения концентрации цинка в плазме крови использовался биохимический метод с применением набора «Цинк-Ново (50)» (В-8370) (АО «Вектор-Бест», Россия). Расчет параметров описательной статистики проводился при помощи пакета Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Расчет фармакокинетических параметров, дисперсионный анализ и вычисление 90%-х доверительных интервалов проводились при помощи программного обеспечения R Project (версия 3.5.1, разработчики R Core Team) с расширением «bear» (версия 2.8.3-2, разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань).

Результаты и обсуждение. 90%-е доверительные интервалы для отношения значений C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ фавипиравира составили 86,48–100,38 % и 103,77–119,47 %. Полученные доверительные интервалы лежат в пределах 80,00–125,00 %, что позволило сделать вывод о том, что влияние цинка на фармакокинетику фавипиравира отсутствует. Коэффициенты внутрииндивидуальной вариации (CV_{intra}) фавипиравира для фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ составили 15,06 и 14,23 %.

Заключение. Результаты исследования определили возможность осуществить переход к последующим фазам клинических исследований препарата Арепливир® Цинк, 200 + 70 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия). Внедрение комбинированной формы фавипиравира с цинком на фармацевтический рынок позволит расширить ассортимент применяемых противовирусных препаратов при COVID-19.

Ключевые слова: фавипиравир, цинк, COVID-19, фармакокинетика

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

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева участвовали в проведении аналитического этапа исследования. Н. С. Багаева, К. К. Карнакова проводили статистическую обработку данных и расчет фармакокинетических параметров. В. С. Щербакова, К. Я. Заславская, П. А. Белый, И. Е. Шохин отвечали за организационную часть исследования. К. К. Карнакова, Н. С. Багаева, Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин, А. В. Таганов участвовали в написании статьи. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

© Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Щербакова В. С., Заславская К. Я., Белый П. А., Таганов А. В., Шохин И. Е., 2024
© Komarov T. N., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Shcherbakova V. S., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Taganov A. V., Shohin I. E., 2024

Финансирование. Клиническое исследование спонсировалось ООО «ПРОМОМЕД РУС». В. С. Щербакова, К. Я. Заславская и П. А. Белый являются представителями данной компании.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Щербакова В. С., Заславская К. Я., Белый П. А., Таганов А. В., Шохин И. Е. Изучение фармакокинетики препарата Арепливир® Цинк (МНН: фавипиравир + цинка глюконат) (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) в рамках фазы I клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):281–290. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1764

Phase I Pharmacokinetics Study of Drug Areplivir® Zinc (INN: Favipiravir + Zinc Gluconate) (LLC "PROMOMED RUS", Russia)

Timofey N. Komarov[1, 2]✉, Natalia S. Bagaeva[1], Kseniia K. Karnakova[1], Olga A. Archakova[1], Dana S. Shchelgacheva[1], Victoria S. Shcherbakova[3], Kira Ya. Zaslavskaya[3], Petr A. Bely[3], Alexey V. Taganov[2], Igor E. Shohin[1]

[1] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
[2] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
[3] LLC «PROMOMED RUS». 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ **Corresponding author:** Timofey N. Komarov. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Kseniia K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-4010-1231; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Dana S. Shchelgacheva – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001; Victoria S. Shcherbakova – https://orcid.org/0000-0002-7251-8744; Kira Ya. Zaslavskaya – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; Petr A. Bely – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874; Alexey. V. Taganov – https://orcid.org/0000-0001-5056-374X; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 19.01.2024 **Revised:** 26.02.2024 **Published:** 26.02.2024

Abstract

Introduction. Favipiravir is an antiviral compound that inhibits the RNA-dependent polymerase and possesses antiviral properties against RNA viruses, including SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). The new drug Areplivir® Zinc as a combination of favipiravir (200 mg) and zinc gluconate (70 mg) in the form of film-coated tablets has been developed by LLC "PROMOMED RUS", Russia. This combination of favipiravir and zinc gluconate could provide more effective treatment of COVID-19.

Aim. The aim of the pharmacokinetics study is comparison between Areplivir® Zinc (INN: favipiravir + zinc gluconate), film-coated tablets (the manufacturer is JSC "Biokhimic", LLC "PROMOMED RUS" as registration certificate holder) and Areplivir® (INN: favipiravir), film-coated tablets (the manufacturer is JSC "Biokhimic", LLC "PROMOMED RUS" as registration certificate holder) to evaluate the effect of zinc on the favipiravir pharmacokinetics.

Materials and methods. The clinical and analytical phases as well as pharmacokinetic analyses have been performed as a part of a phase I clinical trial. Chromatographic separation and detection of favipiravir were performed by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method using Nexera XR high-performance liquid chromatograph with triple quadrupole tandem mass spectrometer LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Japan). The validated analytical range of the method was 50.00–15 000.00 ng/mL in human plasma. The plasma zinc concentrations were measured by a biochemical method with the use of the kit «Zinc-Novo (50)» (JSC "Vector-Best", Russia). The descriptive statistics were calculated using Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA). The pharmacokinetic parameters, analysis of variance (ANOVA), 90 % confidence intervals (90 % CIs) and the intra-subject variability (CVintra) were calculated by R Project 3.5.1 software (package «bear», version 2.8.3-2), originally created by Hsin-ya Lee and Yung-jin Lee, Taiwan.

Results and discussion. The 90 % confidence intervals of the ratios for C_{max} and $AUC_{(0-t)}$ were 86.48–100.38 % and 103.77–119.47 %, respectively. The 90 % confidence intervals were all within the acceptance range of 80.00–125.00 % which means there is no effect of zinc on the favipiravir pharmacokinetics. The intra-subject variability (CV_{intra}) of favipiravir for the pharmacokinetic parameters C_{max} and $AUC_{(0-t)}$ were 15.06 % and 14.23 %.

Conclusion. The results justified the subsequent phases of clinical trials of Areplivir® Zinc (INN: favipiravir + zinc gluconate), film-coated tablets (LLC "PROMOMED RUS", Russia). This combination of favipiravir and zinc could expand the existing armamentarium of antiviral drugs for the treatment of COVID-19.

Keywords: favipiravir, zinc, COVID-19, pharmacokinetics

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

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova and Dana S. Shchelgacheva participated in the clinical phase of the study. Natalia S. Bagaeva and Kseniia K. Karnakova carried out statistical processing of the obtained results. Victoria S. Shcherbakova, Kira Ya. Zaslavskaya, Petr A. Bely and Igor E. Shohin carried out the organization of work in this direction. Kseniia K. Karnakova, Natalia S. Bagaeva, Timofey N. Komarov, Igor E. Shohin and Aleksey V. Taganov participated in writing the article. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

Funding. A clinical study was sponsored by LLC "PROMOMED RUS". Authors Victoria S. Shcherbakova, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely represent LLC "PROMOMED RUS".

For citation: Komarov T. N., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Shcherbakova V. S., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Taganov A. V., Shohin I. E. Phase I pharmacokinetics study of drug Areplivir® Zinc (INN: favipiravir + zinc gluconate) (LLC "PROMOMED RUS", Russia). *Drug development & registration*. 2024;13(1):281–290. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1764

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)], возбудителем которой является вирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), в 2020 году стала причиной пандемии[1] и вызвала необходимость разработки эффективных противовирусных средств [1–3].

Согласно утвержденной Министерством здравоохранения Российской Федерации 18 версии временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» от 26.10.2023 года в качестве этиотропной терапии рекомендуется использовать ряд противовирусных препаратов, в том числе фавипиравир. Фавипиравир является РНК-зависимым ингибитором РНК-полимеразы и обладает широкой активностью против РНК-вирусов, включая вирус SARS-CoV-2 [4–8]. На территории Российской Федерации зарегистрирован ряд[2] лекарственных препаратов, содержащих в своем составе фавипиравир, для лечения коронавирусной инфекции. Данные препараты также включены в перечень жизненно необходимых важнейших лекарственных препаратов (распоряжение Правительства РФ от 12.10.2019 № 2406-р (ред. от 09.06.2023) «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи»). Широко применяемый лекарственный препарат Арепливир®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия, РУ ЛП-№ (003060)-(РГ-RU) на основе фавипиравира, по данным клинических исследований, показал высокую эффективность и безопасность в сравнении со стандартной терапией у пациентов с COVID-19 [9–11].

Дыхательные пути постоянно подвергаются воздействию различных патогенов; поэтому поддержание структурной целостности эпителия очень важно в дыхательной системе, нарушение которой могут способствовать проникновению вирусов. Цинк является ключевым участником в антивирусной защите дыхательных путей. Он повышает уровень защиты дыхательных путей, поддерживая структуру и функцию дыхательного эпителиального барьера [12].

Цинк способствует нормальному развитию и функционированию клеток, опосредующих неспецифический иммунитет (NK-клетки, нейтрофилы и др.), оказывая влияние на репликацию ДНК, транскрипцию РНК, клеточное деление и активацию клеток, а также проявляет антиоксидантную активность, участвует в метаболизме и стабилизации клеточных мембран [13].

Скомпрометированная иммунная система является известным фактором риска для гриппа и других ОРВИ. В частности, недостаток цинка увеличивает уязвимость организма к различным вирусным инфекциям. Статус цинка тесно связан с факторами риска тяжелого течения ОРВИ, гриппа и COVID-19, включая пожилой возраст, иммунодефицит, ожирение, сахарный диабет, поскольку они являются известными группами риска дефицита цинка [14–16]. При вирусных инфекциях роль цинка в защите организма от РНК-вирусов значима и необходима, так как цинк способен ингибировать РНК-полимеразу, которая необходима для репликации РНК-вирусов, что позитивно влияет на симптомы ОРВИ [17, 18].

Противовирусные эффекты цинка реализуются через физические процессы (прикрепление вируса, инфицирование, снятие оболочки), защиту и/или стабилизацию клеточной мембраны, а также ингибирования вирусной репликации путем изменения протеолитического процессинга полипротеинов репликазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы при вирусных инфекциях (грипп, гепатит С, SARS-CoV-2) [13].

Доказано влияние цинка на усиление выработки интерферона-α, повышение противовоспалительной активностью, модуляции функции регуляторных Т-клеток, что позволяет снизить риск сочетанной бактериальной инфекции за счет улучшения мукоцилиарного клиренса и барьерной функции респираторного эпителия, а также прямого антибактериального действия [19].

Дефицит цинка может ухудшить функцию клеток Th1, интерлейкинов (IL-1, IL-2, IL-4), интерферона-γ (IFN-γ), уменьшить популяции В-клеток, ослабить активности NK-клеток и снизить популяцию CDS^+ Т-клеток [20].

Исследования, проведенные во время пандемии COVID-19, позволили предположить, что цинк повышает эффективность комбинированной терапии препаратами, рекомендованными для лечения COVID-19, оказывает положительное влияние на предотвращение острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) и повреждения легких после искусственной вентиляции легких [12].

Результаты исследований показали, что цинк может быть эффективен при лечении COVID-19 и повышать эффективность таких препаратов, как гид-

[1] Хронология действий ВОЗ по борьбе с COVID-19. Доступно по: https://www.who.int/ru/news-room/detail/29-06-2020-covidtimeline. Ссылка активна на 16.10.2023.

[2] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации: Список лекарственных препаратов, содержащих в составе фавипиравир. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%d1%84%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d0%bf%d0%b8%d1%80%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d1%80&lf=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&regtype=1%2c6&pageSize=10&order=Registered&orderType=desc&pageNum=1. Ссылка активна на 29.01.2024.

роксихлорохин и азитромицин. Исследование на 3473 пациентах с COVID-19 показало, что комбинация цинка и гидроксихлорохина может снизить уровень смертности на 24 % [21].

В связи с этим целесообразно рассматривать цинк в качестве адъювантного средства при лечении COVID-19, а его комбинация с фавипиравиром, представляющая собой координационный комплекс с расширенным фармакодинамическим потенциалом (прямое противовирусное, противовоспалительное, иммунотропное, антиоксидантное действие), способствует повышению терапевтической эффективности COVID-19 [19, 22].

Компанией ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия разработана новая комбинация фавипиравира с глюконатом цинка, 200 + 70 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой. Монокомпоненты данного комбинированного препарата обладают разнонаправленным действием, при этом дополняют фармакологические эффекты друг друга, усиливая противовирусное действие и обеспечивая более легкое течение коронавирусной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках открытого рандомизированного перекрестного сравнительного исследования фармакокинетики, безопасности и переносимости лекарственного препарата Фавипиравир + Цинка глюконат (Арепливир® Цинк), 200 + 70 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) и лекарственного препарата Арепливир® (МНН: Фавипиравир), 200 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, (ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) с участием здоровых добровольцев были проверены клинический, аналитический этапы исследования, а также анализ фармакокинетических параметров. Данное исследование было одобрено Министерством здравоохранения Российской Федерации РКИ № 857 от 17 декабря 2021 года, протокол № FAVZN-102021[1].

Исследуемым препаратом в данном исследовании являлся Арепливир® Цинк, 200 + 70 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) (далее – Арепливир® Цинк). В качестве препарата сравнения использовался Арепливир® (МНН: Фавипиравир), 200 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия) (далее – Арепливир®).

[1] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации: Реестр разрешений на проведение клинических исследований 857. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=52426725-88ec-40ed-a118-182c01a8aa68&CIPermGUID=2e833d3b-077a-467f-86ba-712149dba83a Ссылка активна на 06.12.2023.

Клинический этап исследования

В исследовании участвовали 26 здоровых добровольцев, которые были рандомизированы в две группы по 13 человек и принимали исследуемый препарат Арепливир® Цинк и препарат сравнения Арепливир® однократно перорально натощак. Все добровольцы воздерживались от приема пищи не менее чем за 10 часов до приема препаратов. Добровольцам на 13 часов устанавливался кубитальный гепаринизированный катетер, после снятия которого отбор крови проводился путем венепункции. После установки катетера за 5–10 минут до приема препарата отбиралась нулевая проба крови. Дальнейший отбор осуществлялся через 0,5 ч; 0,75 ч; 1 ч; 1,25 ч; 1,5 ч; 1,75 ч; 2 ч; 2,25 ч; 2,5 ч; 3 ч; 3,5 ч; 4 ч; 6 ч; 8 ч; 10 ч; 12 ч; 24 ч, 36 ч после приема препарата.

Образцы крови отбирались в пробирки с литий гепарином и разделительным гелем и центрифугировались при 3000 об/мин в течение 10 минут при температуре +4 °С. Полученная плазма для каждого определяемого вещества разделялась на аликвоту для анализа и аликвоту для повторных анализов в предварительно маркированные пробирки типа эппендорф, которые замораживались и хранились при температуре –20 °С и ниже. Транспортировка образцов для анализа в аналитическую лабораторию осуществлялась при контролируемом температурном режиме не выше –20 °С.

Аналитический этап исследования

Для фавипиравира хроматографическое разделение и детектирование проводили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)] на хроматографе Nexera XR с тандемным тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). Аналитический диапазон методики для фавипиравира в плазме крови составил 50,00–15 000,00 нг/мл [23].

Для определения концентрации цинка в плазме крови был выбран биохимический метод с применением набора «Цинк-Ново (50)» (В-8370) (АО «Вектор-Бест», Россия), основанный на взаимодействии в щелочной среде ионов цинка с 2-(5-бром-2-пиридилазо)-5-(N-пропил-N-сульфопропила-мино)-фенолом (5-Br-PAPS).

Статистическая обработка данных и анализ фармакокинетики

По концентрациям фавипиравира и цинка в плазме крови после перорального приема исследуемого препарата Арепливир® Цинк и препарата сравнения Арепливир® рассчитывались следующие фармакокинетические параметры:

- ✓ C_{max} – максимальная концентрация лекарственного вещества;
- ✓ t_{max} – время достижения максимальной концентрации лекарственного вещества;
- ✓ $AUC_{(0-t)}$ – площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке *t*;
- ✓ $AUC_{(0-\infty)}$ – площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности;
- ✓ k_{el} – константа скорости терминальной элиминации лекарственного вещества;
- ✓ $t_{1/2}$ – период полувыведения лекарственного вещества;
- ✓ $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$ – отношение значения площади под кривой «концентрация действующего вещества – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке *t* к значению площади под кривой «концентрация действующего вещества – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности;
- ✓ $AUC_{(t-\infty)}$ – экстраполируемая площадь под кривой «концентрация действующего вещества – время».

По логарифмированным значениям фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ фавипиравира проводился дисперсионный анализ (analysis of variance, далее – «ANOVA») при уровне значимости $\alpha = 0,05$ для проверки гипотез о статистической значимости вклада каждого фактора в наблюдаемую вариабельность. Использовалась процедура общей линейной модели с фиксированными факторами, которые могут вносить вклад в наблюдаемую вариацию данных: лекарственный препарат, последовательность приема лекарственных препаратов, доброволец, вложенный в фактор «последовательность приема лекарственных препаратов» (далее – доброволец * последовательность приема), период.

По результатам дисперсионного анализа вычислялись 90%-е доверительные интервалы, которые затем подвергались обратному преобразованию, и проверялась гипотеза влияния цинка на *фармакокинетику фавипиравира*. Нулевая гипотеза состояла в том, что если истинное отношение геометрического среднего исследуемого препарата Арепливир® Цинк к геометрическому среднему препарата сравнения Арепливир® для AUC и C_{max} менее 80,00 % или более 125,00 %, то влияние цинка на фармакокинетику фавипиравира у исследуемого препарата будет доказано. Альтернативная гипотеза состояла в том, что если истинное отношение геометрического среднего исследуемого препарата Арепливир® Цинк к геометрическому среднему препарата сравнения Арепливир® находилось в интервале 80,00–125,00 % для AUC и C_{max}, то влияние цинка на фармакокинетику фавипиравира у исследуемого препарата не будет доказано.

Расчет параметров описательной статистики проводился при помощи пакета Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Расчет фармакокинетических параметров, дисперсионный анализ и вычисление 90%-х доверительных интервалов проводились при помощи программного обеспечения R Project (версия 3.5.1, разработчики R Core Team) с расширением «bear» (версия 2.8.3-2, разработчики Hsin-ya Lee и Yung-jin Lee, Тайвань). Статистический анализ различий параметров t_{max} и $t_{1/2}$ проводился с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни для независимых выборок (непреобразованные данные, двусторонний тест) при уровне значимости $\alpha = 0,05$ с помощью программного обеспечения R Project (версия 3.5.1, разработчики R Core Team) с расширением «stats» (версия 3.5.1, разработчики R Core Team), функция wilcox.test). Предварительно проверялась гипотеза нормальности распределения параметра $t_{1/2}$ с помощью критерия Шапиро – Уилка при уровне значимости $\alpha = 0,05$ с помощью программного обеспечения R Project (версия 3.5.1, разработчики R Core Team) с расширением «stats» (версия 3.5.1, разработчики R Core Team), функция shapiro.test).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В анализ фармакокинетики были включены данные, полученные от 24 из 26 добровольцев, принявших исследуемый препарат Арепливир® Цинк, препарат сравнения Арепливир® и завершивших исследование согласно Протоколу. Один доброволец исключен из исследования по причине отказа от участия в клиническом исследовании, второй – в соответствии с подпунктом а) пункта 78 решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

Фавипиравир

После приема исследуемого препарата Арепливир® Цинк индивидуальные значения максимальных концентраций (C_{max}) фавипиравира находились в диапазоне [3110,75; 7370,96] нг/мл, после приема препарата сравнения Арепливир® – в диапазоне [3768,60; 10143,37] нг/мл. Средние значения C_{max} составили 5213,76 нг/мл после приема препарата Арепливир® Цинк и 5662,81 нг/мл после приема препарата Арепливир®.

Индивидуальные значения $AUC_{(0-t)}$ фавипиравира варьировались в диапазоне [7647,88; 50123,56] нг · ч/мл после приема исследуемого препарата Арепливир® Цинк и [8073,97; 56447,47] нг · ч/мл после приема препарата сравнения Арепливир®. Средние значения $AUC_{(0-t)}$ составили 14389,92 нг · ч/мл после приема препарата Арепливир® Цинк и 13405,88 нг · ч/мл после приема препарата Арепливир®.

Выполнение условия «$AUC_{(0-t)}$ перекрывает не менее 80 процентов $AUC_{(0-\infty)}$» (пункт 34 решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза») обеспечивает надежную оценку длительности экспозиции.

Усредненные значения фармакокинетических параметров фавипиравира после приема препаратов Арепливир® Цинк и Арепливир® приведены в таблице 1. Усредненные фармакокинетические профили в линейном и лог-линейном преобразовании со стандартными отклонениями для фавипиравира приведены на рисунках 1–2.

Таблица 1. Усредненные значения фармакокинетических параметров фавипиравира

Table 1. Summary data of favipiravir pharmacokinetic parameters

Фармакокинетические параметры Pharmacokinetic parameters	**Арепливир® Цинк** Areplivir® Zinc	**Арепливир®** Areplivir®
C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/mL	5213,76 (1108,90)	5662,81 (1526,96)
$AUC_{(0-t)}$, нг · ч/мл $AUC_{(0-t)}$, ng · h/mL	14389,92 (8105,40)	13405,88 (9724,93)
$AUC_{(0-\infty)}$, нг · ч/мл $AUC_{(0-\infty)}$, ng · h/mL	14577,28 (8263,75)	13585,28 (9768,93)
t_{max}, ч t_{max}, h	1 (0,5 – 1,5)	0,5 (0,5 – 1)
k_{el}, $ч^{-1}$ k_{el}, h^{-1}	0,436 (0,092)	0,479 (0,095)
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	1,79 (1,13)	1,52 (0,42)
$AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, % $AUC_{(0-t)}/AUC_{(0-\infty)}$, %	98,75 (0,38)	98,51 (0,44)
$AUC_{(t-\infty)}$, % $AUC_{(t-\infty)}$, %	1,25 (0,38)	1,49 (0,44)

Примечание. Для всех параметров, кроме t_{max}, приведены значения Mean (SD); для t_{max} приведены значения Median (Min – Max).

Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, Median – медиана, Min – минимальное значение, Max – максимальное значение.

Note. Parameters are expressed as Mean (SD) except for t_{max}, which is expressed as Median (Min – Max).

Mean – arithmetic mean, SD – standard deviation, Median – median, Min – minimum value, Max – maximum value.

Максимальная концентрация фавипиравира в плазме крови достигалась через 30 минут после приема препарата Арепливир® и через 1 час после приема препарата Арепливир® Цинк, что свидетельствует о быстрой абсорбции фавипиравира. Различия по фармакокинетическому параметру t_{max} между изучаемыми препаратами статистически значимы ($p = 8{,}331 \cdot 10^{-5}$; U-критерий Манна – Уитни).

Средний период полувыведения ($t_{1/2}$) препарата Арепливир® составляет 1,52 часов, для препарата Арепливир® Цинк составило 1,79 часов. Распределение фармакокинетического параметра $t_{1/2}$ отлично от нормального ($p = 1{,}185 \cdot 10^{-12}$; критерий Шапиро –

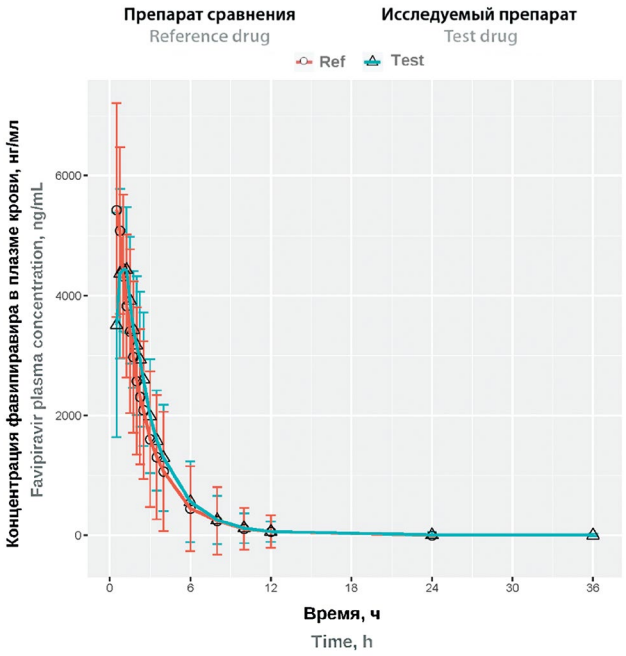


Рисунок 1. Усредненные фармакокинетические профили фавипиравира (в линейном преобразовании со стандартными отклонениями)

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles of favipiravir (linear scale with standard deviations)

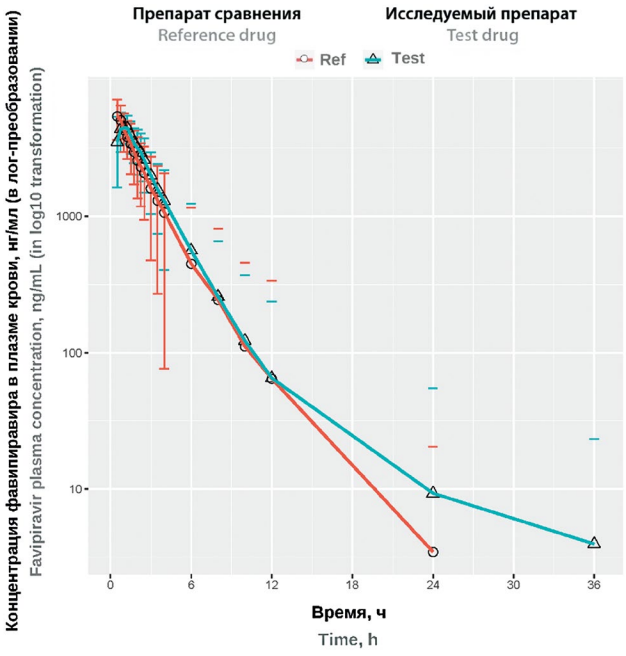


Рисунок 2. Усредненные фармакокинетические профили фавипиравира (в лог-линейном преобразовании со стандартными отклонениями)

Figure 2. Average pharmacokinetic profiles of favipiravir (log-linear scale with standard deviations)

Уилка). Различия между значениями $t_{1/2}$ изучаемых препаратов статистически не значимы ($p = 0{,}09$; U-критерий Манна – Уитни).

Среднеарифметические значения фармакокинетических параметров C_{max} и $t_{1/2}$, а также медианы фармакокинетического параметра t_{max} фавипиравира являются схожими с имеющимися литературными данными [24, 25].

По логарифмированным значениям фармакокинетических параметров фавипиравира при уровне значимости $\alpha = 0{,}05$ проводился дисперсионный анализ (ANOVA). Установлено, что только фактор «Лекарственный препарат» для фармакокинетического параметра $AUC_{(0-t)}$ ($p = 0{,}02$) и фактор «Доброволец * Последовательность приема» для фармакокинетических параметров C_{max} ($p = 0{,}001$) и $AUC_{(0-t)}$ ($p = 1{,}87 \cdot 10^{-8}$) вносят статистически значимый вклад в общую вариацию фармакокинетических параметров.

Коэффициенты внутрииндивидуальной вариации (CV_{intra}) фавипиравира для фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ составили 15,06 и 14,23 % соответственно.

90%-е доверительные интервалы для отношения значений C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ фавипиравира составили 86,48–100,38 % и 103,77–119,47 %. Полученные доверительные интервалы лежат в пределах 80,00–125,00 %, что позволило сделать вывод о том, что влияние цинка на фармакокинетику фавипиравира у исследуемого препарата отсутствует.

Цинк

По полученным концентрациям цинка в плазме крови после перорального приема исследуемого препарата Арепливир® Цинк и препарата сравнения Арепливир® возможно определение таких фармакокинетических параметров, как максимальная (C_{max}) и минимальная (C_{min}) концентрации.

Индивидуальные значения концентраций общего цинка (до поправки на эндогенный уровень) колебались в диапазоне [15,61; 57,09] мкмоль/л фона для исследуемого препарата Арепливир® Цинк и в диапазоне [16,03; 60,99] мкмоль/л фона – для препарата сравнения Арепливир®. Значения концентраций экзогенного цинка (после поправки на эндогенный уровень) находились в диапазоне [0,01; 36,44] мкмоль/л фона для исследуемого препарата Арепливир® Цинк и в диапазоне [0,003; 36,670] мкмоль/л фона – для препарата сравнения Арепливир®.

Значения фармакокинетических параметров C_{min} и C_{max} общего цинка после приема исследуемого препарата Арепливир® Цинк составили 18,09 ± 1,13 мкмоль/л и 31,12 ± 9,08 мкмоль/л, соответственно (Mean ± SD, где Mean – среднее арифметическое значение; SD – стандартное отклонение). Значения фармакокинетических параметров C_{min} и C_{max} общего цинка после приема препарата сравнения Арепливир® составили 17,68 ± 0,77 мкмоль/л и 30,36 ± 11,04 мкмоль/л, соответственно.

Усредненные фармакокинетические профили в линейном преобразовании со стандартными отклонениями для общего и экзогенного цинка приведены на рисунках 3–4.

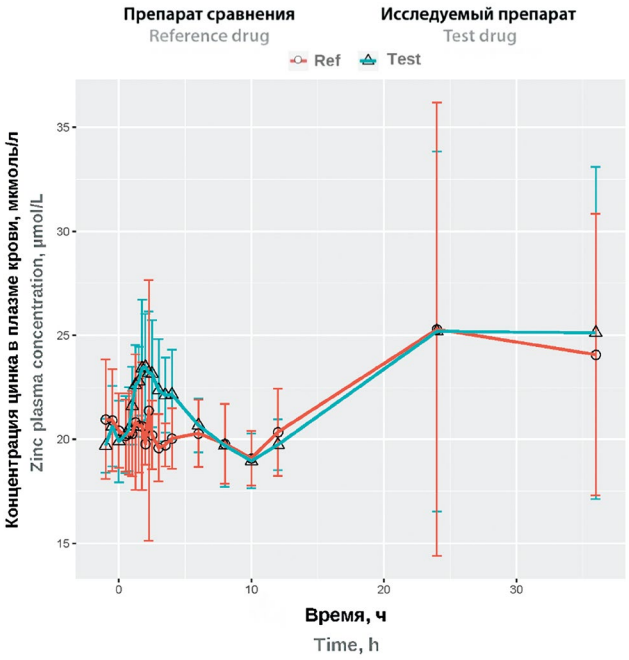


Рисунок 3. Усредненные фармакокинетические профили общего цинка (в линейном преобразовании со стандартными отклонениями)

Figure 3. Average pharmacokinetic profiles of total zinc without adjustment for endogenous level (linear scale with standard deviations)

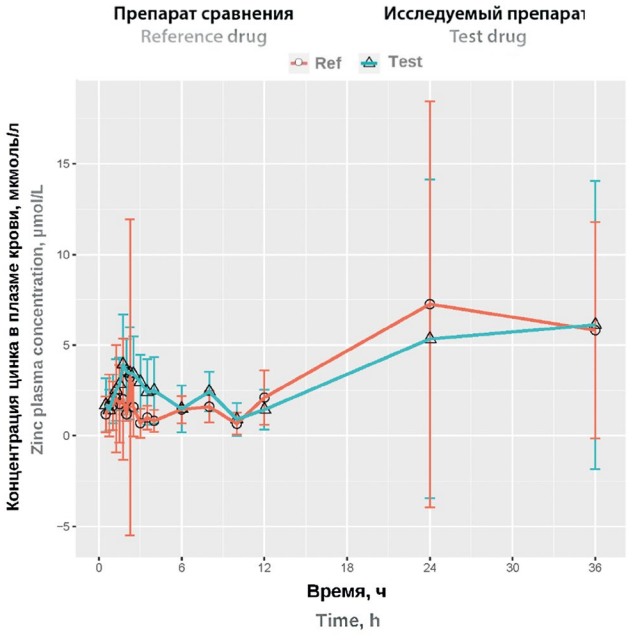


Рисунок 4. Усредненные фармакокинетические профили экзогенного цинка (в линейном преобразовании со стандартными отклонениями)

Figure 4. Average pharmacokinetic profiles of exogenous zinc (linear scale with standard deviations)

Эндогенный уровень цинка у всех добровольцев изменялся от 16,60 до 27,40 мкмоль/л. Полученные концентрации общего цинка, а также его минимальные и максимальные значения в плазме крови добровольцев во времени, зарегистрированные после приема исследуемых лекарственных средств Арепливир® Цинк и Арепливир®, значимо не отличались как между собой, так и от полученных значений эндогенного уровня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компанией ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия разработан лекарственный препарат Арепливир® Цинк, являющийся комбинацией фавипиравира (200 мг) с цинком (в форме цинка глюконата) (70 мг) в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой.

В рамках клинического исследования I фазы проведен клинический и аналитический этап исследования, анализ фармакокинетических параметров исследуемого препарата Арепливир® Цинк и препарата сравнения Арепливир®. Концентрации фавипиравира в плазме крови здоровых добровольцев после приема препаратов определялись методом ВЭЖХ-МС/МС (аналитический диапазон методики составил 50,00–15 000,00 нг/мл), концентрации цинка – биохимическим методом.

Полученные 90%-е доверительные интервалы для отношения геометрических средних C_{max} и $AUC_{(0-t)}$ фавипиравира составили 86,48–100,38 % и 103,77–119,47 % и находились в интервале 80,00–125,00 %, что позволило принять альтернативную гипотезу и сделать вывод об отсутствии влияния цинка на фармакокинетику фавипиравира.

Эндогенный уровень цинка у всех добровольцев изменялся от 16,60 до 27,40 мкмоль/л. Полученные концентрации общего цинка, а также его минимальные и максимальные значения в плазме крови добровольцев во времени, зарегистрированные после приема исследуемых лекарственных средств Арепливир® Цинк и Арепливир®, значимо не отличались как между собой, так и от полученных значений эндогенного уровня. Это может быть связано как с высоким уровнем эндогенного цинка, так и с возможным быстрым распределением экзогенного цинка между плазмой крови, эритроцитами и тканями органов.

Результаты исследования определили возможность осуществить переход к последующим фазам клинических исследований препарата Арепливир® Цинк, 200 + 70 мг, таблетки, покрытые пленочной оболочкой (АО «Биохимик», держатель регистрационного удостоверения ООО «ПРОМОМЕД РУС», Россия). Монокомпоненты данного комбинированного препарата обладают разнонаправленным действием, при этом дополняют фармакологические эффекты друг друга, усиливая противовирусное действие и обеспечивая более легкое течение коронавирусной инфекции. Внедрение комбинированной формы фавипиравира с цинком на фармацевтический рынок позволит расширить ассортимент применяемых противовирусных препаратов при COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ndwandwe D., Ndlovu M., Mayeye A., Luphondo N., Muvhulawa N., Ntamo Y., Dludla P. V., Shey Wiysonge C. Managing COVID-19 Variants: Mapping Data from the International Clinical Trials Registry Platform. In New COVID-19 Variants. London: IntechOpen. 2023. DOI: 10.5772/intechopen.1003262.
2. Siddique A., Shahzad A., Lawler J., Mahmoud K. A., Lee D. S., Ali N., Bilal M., Rasool K. Unprecedented environmental and energy impacts and challenges of COVID-19 pandemic. *Environmental Research*. 2021;193:110443. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110443.
3. Rutjes S. A., Vennis I. M., Wagner E., Maisaia V., Peintner L. Biosafety and biosecurity challenges during the COVID-19 pandemic and beyond. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1117316. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1117316.
4. Golan Y., Campos J. A. S., Woolson R., Cilla D., Hanabergh R., Gonzales-Rojas Y., Lopez R., Finberg R., Balboni A. Favipiravir in Patients With Early Mild-to-moderate Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Randomized Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;76(3):e10–e17. DOI: 10.1093/cid/ciac712.
5. Леонова М. В. Фавипиравир как потенциальное средство противодействия при COVID-19. *Consilium Medicum*. 2020;22(11):56–60. DOI: 10.26442/20751753.2020.11.200368.
6. Joshi S., Parkar J., Ansari A., Vora A., Talwar D., Tiwaskar M., Patil S., Barkate H. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021;102:501–508. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.10.069.
7. Hashemian S. M., Farhadi T., Velayati A. A. A review on favipiravir: the properties, function, and usefulness to treat COVID-19. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2021;19(8):1029–1037. DOI: 10.1080/14787210.2021.1866545.
8. Shalhoub S. PIONEER trial: favipiravir to treat moderate COVID-19. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2023;11(5):392–393. DOI: 10.1016/S2213-2600(22)00479-9.
9. Радаева О. А., Балыкова Л. А., Заславская К. Я., Таганов А. В., Белый П. А., Костина Ю. А., Негоднова Е. В., Машнина С. В., Бесшейнов Д. Д., Искандярова М. С., Еремеев В. В., Чумаков Н. М. Изучение отдаленных клинико-патогенетических эффектов противовирусного лекарственного препарата на основе фавипиравира в постковидном периоде у пациентов с метаболическим синдромом. Фармация и фармакология. 2022;10(2):217–228. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-2-217-228.
10. Балыкова Л. А., Грановская М. В., Заславская К. Я., Симакина Е. Н., Агафьина А. С., Иванова А. Ю., Колонтарев К. Б., Пушкарь Д. Ю. Новые возможности направленной противовирусной терапии COVID-19: результаты многоцентрового клинического исследования эффективности и безопасности применения препарата Арепливир. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2020;9(3):16–29. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-3-16-29.
11. Радаева О. А., Костина Ю. А. Анализ данных о механизме действия и эффективности препаратов, применяемых для лечения COVID-19. *Инфекционные болезни: новости. мнения. обучение*. 2021;10(3):106–117. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-106-117.
12. Sadeghsoltani F., Mohammadzadeh I., Safari M.-M., Hassanpour P., Izadpanah M., Qujeq D., Moein S., Vaghari-Tabari M. Zinc and Respiratory Viral Infections: Important Trace Element in Anti-viral Response and Immune Regulation. *Biological Trace Element Research*. 2022;200(6):2556–2571. DOI: 10.1007/s12011-021-02859-z.

13. Громова О. А., Торшин И. Ю., Моисеев В. С., Сорокина М. А., Лиманова О. А. Об использовании цинка и витамина С для профилактики и адъювантной терапии острых респираторных заболеваний. *Терапия*. 2017;1(11):36–46.
14. Nedjimi B. Can trace element supplementations (Cu, Se, and Zn) enhance human immunity against COVID-19 and its new variants? *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*. 2021;10(1):33. DOI: 10.1186/s43088-021-00123-w.
15. Wessels I., Rolles B., Rink L. The Potential Impact of Zinc Supplementation on COVID-19 Pathogenesis. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1712. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01712.
16. Трухан Д. И., Давыдов Е. Л., Чусова Н. А. Нутрицевтики в профилактике, лечении и на этапе реабилитации после новой коронавирусной инфекции (COVID-19). *Клинический разбор в общей медицине*. 2021;7:21–34. DOI: 10.47407/kr2021.2.7.00085.
17. Corrao S., Mallaci Bocchio R., Lo Monaco M., Natoli G., Cavezzi A., Troiani E., Argano C. Does Evidence Exist to Blunt Inflammatory Response by Nutraceutical Supplementation during COVID-19 Pandemic? An Overview of Systematic Reviews of Vitamin D, Vitamin C, Melatonin, and Zinc. *Nutrients*. 2021;13(4):1261. DOI: 10.3390/nu13041261.
18. Kaushik N., Subramani C., Anang S., Muthumohan R., Nayak B., Ranjith-Kumar C. T., Surjit M. Zinc Salts Block Hepatitis E Virus Replication by Inhibiting the Activity of Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of virology*. 2017;91(21):e00754-17. DOI: 10.1128/JVI.00754-17.
19. Skalny A. V., Rink L., Ajsuvakova O. P., Aschner M., Gritsenko V. A., Alekseenko S. I., Svistunov A. A., Petrakis D., Spandidos D. A., Aaseth J., Tsatsakis A., Tinkov A. A. Zinc and respiratory tract infections: Perspectives for COVID-19 (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2020;46(1):17–26. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4575.
20. Hojyo S, Fukada T. Roles of Zinc Signaling in the Immune System. *Journal of immunology research*. 2016;2016:6762343. DOI: 10.1155/2016/6762343.
21. Frontera J. A., Rahimian J. O., Yaghi S., Liu M., Lewis A., de Havenon A., Mainali S., Huang J., Scher E., Wisniewski T., Troxel A. B., Meropol S., Balcer L. J., Galetta S. L. Treatment with Zinc is Associated with Reduced In-Hospital Mortality Among COVID-19 Patients: A Multi-Center Cohort Study. Preprint. *Research square*. 2020;rs.3.rs-94509. DOI: 10.21203/rs.3.rs-94509/v1.
22. Asl S. H., Nikfarjam S., Majidi Zolbanin N., Nassiri R., Jafari R. Immunopharmacological perspective on zinc in SARS-CoV-2 infection. *International immunopharmacology*. 2021;96:107630. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107630.
23. Комаров Т. Н., Карпова П. А., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Карнакова П. К., Багаева Н. С., Заславская К. Я., Белый П. А., Шохин И. Е. Определение фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):229–239. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-229-239.
24. Morsy M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Zainelabdeen M. A., Darwish M. M., Hassan A. Y., Gouda A. S., Rezk M. R., Abdel-Megied A. M., Marzouk H. M. A novel LC-MS/MS method for determination of the potential antiviral candidate favipiravir for the emergency treatment of SARS-CoV-2 virus in human plasma: Application to a bioequivalence study in Egyptian human volunteers. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2021;199:114057. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114057.
25. Sağlam O., Demiray G., Güney B., Doğan-Kurtoğlu E., Ulusoy M. G., Saraner N., Sevici G., Nacak M., Erenmemişoğlu A., Tüzer V. Single Dose, Two-way Crossover Bioequivalence Study of Favipiravir Tablet in Healthy Male Subjects. *Journal of Pharmacy and Drug Development*. 2020;2(2):1–9. DOI: 10.5281/zenodo.4361817.

REFERENCES

1. Ndwandwe D., Ndlovu M., Mayeye A., Luphondo N., Muvhulawa N., Ntamo Y., Dludla P. V., Shey Wiysonge C. Managing COVID-19 Variants: Mapping Data from the International Clinical Trials Registry Platform. In New COVID-19 Variants. London: IntechOpen. 2023. DOI: 10.5772/intechopen.1003262.
2. Siddique A., Shahzad A., Lawler J., Mahmoud K. A., Lee D. S., Ali N., Bilal M., Rasool K. Unprecedented environmental and energy impacts and challenges of COVID-19 pandemic. *Environmental Research*. 2021;193:110443. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110443.
3. Rutjes S. A., Vennis I. M., Wagner E., Maisaia V., Peintner L. Biosafety and biosecurity challenges during the COVID-19 pandemic and beyond. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1117316. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1117316.
4. Golan Y., Campos J. A. S., Woolson R., Cilla D., Hanabergh R., Gonzales-Rojas Y., Lopez R., Finberg R., Balboni A. Favipiravir in Patients With Early Mild-to-moderate Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Randomized Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;76(3):e10–e17. DOI: 10.1093/cid/ciac712.
5. Leonova M. V. Favipiravir as a potential countermeasure for COVID-19. *Consilium Medicum*. 2020;22(11):56–60. (In Russ.) DOI: 10.26442/20751753.2020.11.200368.
6. Joshi S., Parkar J., Ansari A., Vora A., Talwar D., Tiwaskar M., Patil S., Barkate H. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021;102:501–508. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.10.069.
7. Hashemian S. M., Farhadi T., Velayati A. A. A review on favipiravir: the properties, function, and usefulness to treat COVID-19. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2021;19(8):1029–1037. DOI: 10.1080/14787210.2021.1866545.
8. Shalhoub S. PIONEER trial: favipiravir to treat moderate COVID-19. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2023;11(5):392–393. DOI: 10.1016/S2213-2600(22)00479-9.
9. Radaeva O. A, Balykova L. A., Zaslavskaya K. Ya., Taganov A. V., Bely P. A., Kostina Yu. A., Negodnova E. V., Mashnina S. V., Bessheinov D. D., Iskandyarova M. S., Eremeev V. V., Chumakov N. M. Study of long-term clinical and pathogenetic effects of favipiravir-based anti-viral drug in patients with metabolic syndrome in post-covid period. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(2):217–228. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-2-217-228.
10. Balykova L. A., Granovskaya M. V., Zaslavskaya K. Ya., Simakina E. N., Agaf'ina A. S., Ivanova A. Yu., Kolontarev K. B., Pushkar D. Yu. New possibilities for targeted antiviral therapy for COVID-19. Results of a multicenter clinical study of the efficacy and safety of using the drug Areplivir. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2020;9(3):16–29. (In Russ.) DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-3-16-29.
11. Radaeva O. A., Kostina Yu. A. Analysis data of mechanism of drugs recommended for the treatment of COVID-19. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2021;10(3):106–117. (In Russ.) DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-3-106-117.
12. Sadeghsoltani F., Mohammadzadeh I., Safari M.-M., Hassanpour P., Izadpanah M., Qujeq D., Moein S., Vaghari-Tabari M. Zinc and Respiratory Viral Infections: Important Trace Element in Anti-viral Response and Immune Regulation. *Biological Trace Element Research*. 2022;200(6):2556–2571. DOI: 10.1007/s12011-021-02859-z.
13. Gromova O. A., Torshin I. Yu., Moiseev V. S., Sorokina M. A., Limanova O. A. The use of zinc and vitamin c for the prevention and adjuvant therapy of acute respiratory diseases. *Therapy*. 2017;1(11):36–46. (In Russ.)
14. Nedjimi B. Can trace element supplementations (Cu, Se, and Zn) enhance human immunity against COVID-19 and its new variants? *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*. 2021;10(1):33. DOI: 10.1186/s43088-021-00123-w.
15. Wessels I., Rolles B., Rink L. The Potential Impact of Zinc Supplementation on COVID-19 Pathogenesis. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1712. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01712.

16. Trukhan D. I., Davydov E. L., Chusova N. A. Nutriceutics in prevention, treatment and at the stage of rehabilitation after new coronavirus infection (COVID-19). *Clinical review for general practice*. 2021;7:21–34. (In Russ.) DOI: 10.47407/kr2021.2.7.00085.
17. Corrao S., Mallaci Bocchio R., Lo Monaco M., Natoli G., Cavezzi A., Troiani E., Argano C. Does Evidence Exist to Blunt Inflammatory Response by Nutraceutical Supplementation during COVID-19 Pandemic? An Overview of Systematic Reviews of Vitamin D, Vitamin C, Melatonin, and Zinc. *Nutrients*. 2021;13(4):1261. DOI: 10.3390/nu13041261.
18. Kaushik N., Subramani C., Anang S., Muthumohan R., Nayak B., Ranjith-Kumar C. T., Surjit M. Zinc Salts Block Hepatitis E Virus Replication by Inhibiting the Activity of Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of virology*. 2017;91(21):e00754-17. DOI: 10.1128/JVI.00754-17.
19. Skalny A. V., Rink L., Ajsuvakova O. P., Aschner M., Gritsenko V. A., Alekseenko S. I., Svistunov A. A., Petrakis D., Spandidos D. A., Aaseth J., Tsatsakis A., Tinkov A. A. Zinc and respiratory tract infections: Perspectives for COVID-19 (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2020;46(1):17–26. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4575.
20. Hojyo S, Fukada T. Roles of Zinc Signaling in the Immune System. *Journal of immunology research*. 2016;2016:6762343. DOI: 10.1155/2016/6762343.
21. Frontera J. A., Rahimian J. O., Yaghi S., Liu M., Lewis A., de Havenon A., Mainali S., Huang J., Scher E., Wisniewski T., Troxel A. B., Meropol S., Balcer L. J., Galetta S. L. Treatment with Zinc is Associated with Reduced In-Hospital Mortality Among COVID-19 Patients: A Multi-Center Cohort Study. Preprint. *Research square*. 2020;rs.3.rs-94509. DOI: 10.21203/rs.3.rs-94509/v1.
22. Asl S. H., Nikfarjam S., Majidi Zolbanin N., Nassiri R., Jafari R. Immunopharmacological perspective on zinc in SARS-CoV-2 infection. *International immunopharmacology*. 2021;96:107630. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107630.
23. Komarov T. N., Karpova P. A., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Karnakova P. K., Bagaeva N. S., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Shohin I. E. Determination of Favipiravir in Human Blood Plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(3):229–239. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-229-239.
24. Morsy M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Zainelabdeen M. A., Darwish M. M., Hassan A. Y., Gouda A. S., Rezk M. R., Abdel-Megied A. M., Marzouk H. M. A novel LC-MS/MS method for determination of the potential antiviral candidate favipiravir for the emergency treatment of SARS-CoV-2 virus in human plasma: Application to a bioequivalence study in Egyptian human volunteers. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2021;199:114057. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114057.
25. Sağlam O., Demiray G., Güney B., Doğan-Kurtoğlu E., Ulusoy M. G., Saraner N., Sevici G., Nacak M., Erenmemişoğlu A., Tüzer V. Single Dose, Two-way Crossover Bioequivalence Study of Favipiravir Tablet in Healthy Male Subjects. *Journal of Pharmacy and Drug Development*. 2020;2(2):1–9. DOI: 10.5281/zenodo.4361817.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1593
УДК 615.37; 616-097

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Влияние признаков штамма микроорганизма на объем исключительных прав

Ф. С. Иванов[1, 2]✉, К. В. Насонова[3]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Патентно-правовая фирма «НЕВА-ПАТЕНТ». 195112, Россия, г. Санкт-Петербург, Новочеркасский пр., д. 33, корп. 2
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. (ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России). 191015, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41
[3] Адвокатское бюро г. Москвы «Лидингс». 123112, Россия, г. Москва, Пресненская наб., д. 6, стр. 2

✉ **Контактное лицо:** Иванов Федор Сергеевич. **E-mail:** fedorivanovspb@gmail.com

ORCID: Ф. С. Иванов – https://orcid.org/0009-0009-8104-1501; К. В. Насонова – https://orcid.org/0000-0003-0600-7740.

Статья поступила: 05.10.2023 **Статья принята в печать:** 22.02.2024 **Статья опубликована:** 22.02.2024

Резюме

Введение. Появление все большего числа лекарственных средств на основе рекомбинантных продуктов и биотехнологий определяет стратегию охраны исключительных прав на все объекты, входящие в производственную цепочку, включая штаммы микроорганизмов-продуцентов.

Цель. Определить возможность и объем охраны штаммов микроорганизмов в качестве объектов интеллектуальной собственности на этапе разработки и выпуска на рынок лекарственных препаратов, в том числе биотехнологических продуктов.

Материалы и методы. В качестве материалов исследования выступали доступные публикации в рецензируемых журналах по тематическим запросам, составленным по ключевым словам выбранной тематики, официальные интернет-сайты, нормативно-правовые акты (НПА), регламентирующие порядок патентования объектов в РФ и зарубежных странах.

Результаты и обсуждение. Представлен кратко обзор нормативных документов по вопросам регистрации штамма в качестве объекта интеллектуальных прав. Определены характеристики для патентования штамма микроорганизма и в случаях нарушения патентных прав на территории РФ и других стран. Обозначен возможный объем правовой охраны патентов на штаммы.

Заключение. Определены проблемы, возникающие при охране штаммов как объектов интеллектуальной собственности, а также возможности их регистрации в качестве объектов исключительных прав.

Ключевые слова: патентование штаммов, нарушение патента, рекомбинантные препараты

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

Вклад авторов. Авторы совместно продумывали концепцию статьи, проводили поиск и сбор фактического материала в доступных публикациях в рецензируемых журналах, официальных интернет-сайтах, нормативно-законодательных актах, готовили текст статьи и оформляли его в соответствии с общемедицинским профилем журнала. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Иванов Ф. С., Насонова К. В. Влияние признаков штамма микроорганизма на объем исключительных прав. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):291–297. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1593

Affect of Features of a Microorganism Strain on a Scope of Exclusive Rights

Fedor S. Ivanov[1, 2]✉, Ksenia V. Nasonova[3]

[1] LLC "Patent and legal firm "NEVA-PATENT". 33/2, Novocherkassky pr., St. Petersburg, 195112, Russia
[2] Mechnikov North-West State Medical University. 41, Kirochnaya str., St. Petersburg, 191015, Russia
[3] Moscow Law Office "Lidings". 6/2, Presnenskaya naberezhnaya, Moscow, 123112, Russia

✉ **Corresponding author:** Fedor S. Ivanov. **E-mail:** fedorivanovspb@gmail.com

ORCID: Fedor S. Ivanov – https://orcid.org/0009-0009-8104-1501; Ksenia V. Nasonova – https://orcid.org/0000-0003-0600-7740.

Received: 05.10.2023 **Revised:** 22.02.2024 **Published:** 22.02.2024

Abstract

Introduction. A launch of larger number of pharmaceutical preparations based on recombinant products and biotechnologies leads to determine a strategy for protection of exclusive rights for subjects implemented into manufacturing process, including strains of microorganism-producers.

Aim. To define a possibility and a protection scope of microorganism strain as intellectual property subjects at a step of research, development and launch of pharmaceutical preparations, including biotechnological products.

Materials and methods. The materials of the study were available publications in peer-reviewed journals on thematic queries based on keywords of the selected topic, official websites, regulatory legal acts, regulating the procedure for patenting subjects in the Russian Federation and foreign countries.

© Иванов Ф. С., Насонова К. В., 2024
© Ivanov F. S., Nasonova K. V., 2024

Results and discussion. A brief review of regulatory acts on registration of a strain as an intellectual property subject is presented. It was defined features of a microorganism strain for patenting and for establishing an infringement of patent rights in the territory of Russian and foreign countries. A possible scope of patent rights for strains is indicated.
Conclusion. The problems raised upon protecting strains as intellectual property subjects as well as possibilities of strain registration as exclusive right subjects are defined.

Keywords: strain patenting, infringement of patent, recombinant pharmaceutical preparations

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

Contribution of the authors. The authors jointly thought out the concept of the article, searched for and collected actual material in available publications in peer-reviewed journals, official Internet sites, regulatory and legislative acts, wrote the text of the article and designed it in accordance with the general medical profile of the journal. All the authors participated in the discussion

For citation: Ivanov F. S., Nasonova K. V. Affect of features of a microorganism strain on a scope of exclusive rights. *Drug development & registration*. 2024;13(1):291–297. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-1-1593

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы играют важнейшую роль в современной науке и технике, оказывая глубокое влияние на различные области. Одним из важных аспектов в области медицины и фармацевтики является биотехнология рекомбинантных лекарственных препаратов. Микроорганизмы в этом случае служат инструментами для получения самого активного вещества, например фармакологически активного вещества или антигена для вакцин. В частности, с помощью штаммов бактерий *Escherichia coli* получают различные виды аналогов инсулина, используемых для лечения диабета. Открытие и изучение микроорганизмов и вариантов их модификации привело к значительным прорывам в понимании природы инфекционных заболеваний. Идентифицируя возбудителей и разрабатывая антибиотики, наука спасла бесчисленное количество жизней и сдерживала эпидемии. В биотехнологии микроорганизмы также используют для производства ферментов, белков и биотоплива. Кроме того, микроорганизмы могут быть использованы во многих областях, например в сельском хозяйстве для получения удобрений и агрохимикатов.

Высокая значимость микроорганизмов для науки и техники обуславливает актуальность вопросов, связанных с правовой охраной таких разработок. В настоящее время различают 2 вида микроорганизмов: природные (выделенные из природного источника), например вирусы для дальнейшего создания вакцин и диагностических препаратов, и генно-модифицированные, например полученные рекомбинантными или другими методами. В зависимости от вида штамма возможна его охрана в различном виде: как изобретения или как объекта авторских прав.

Согласно патентному законодательству большинства стран, в том числе России, объекты, относящиеся к микроорганизмам, могут быть запатентованы в качестве изобретений. В статье 1350 Гражданского кодекса Российской Федерации (далее – ГК РФ)[1] в качестве изобретения охраняется техническое решение в любой области, относящееся к продукту, в частности к штамму микроорганизма, культуре клеток растений или животных, а также к способу их применения (например, для получения биологически активного вещества) и способу получения (например, рекомбинантными методами) или выделения. Кроме того, согласно статье 27 раздела 5 соглашения по торговым аспектам прав интеллектуальной собственности, участницей которого является Россия, его члены не могут исключить микроорганизмы из охраняемых в качестве изобретений объектов[2].

Однако по статье 1350 ГК РФ открытия, в частности природные штаммы, не являются изобретениями. Данное положение также соответствует зарубежной практике, в частности положениям по патентованию микроорганизмов в США и Европе [1], включая штаммы бактерий и вирусов, например вирусы

[1] Гражданский кодекс Российской Федерации. Часть четвертая. Федеральный закон «О введении в действие части четвертой Гражданского кодекса Российской Федерации» от 18 декабря 2006 г. № 231-ФЗ (ред. 13.06.2023). Доступно по: https://www.fips.ru/documents/npa-rf/kodeksy/grazhdanskiy-kodeks-rossiyskoy-federatsii-chast-chetvertaya.php. Ссылка активна на 25.09.2023.

[2] Соглашение по торговым аспектам прав интеллектуальной собственности (ТРИПС) (ВТО, Уругвайский раунд многосторонних торговых переговоров, 15 апреля 1994 г.) (с изменениями и дополнениями) Доступно по: https://www1.fips.ru/documents/international-documents/soglasheniya/soglashenie-po-torgovym-aspektam-prav-intellektualnoy-sobstvennosti.php Ссылка активна на: 25.09.2023.

гриппа. Как следует из экспертного отчета, подготовленного Всемирной организацией интеллектуальной собственности (ВОИС) для Всемирной организации здравоохранения[1], природные субстанции, в том числе выделенные из природного источника, не подвергавшиеся модификациям или каким-либо вмешательствам человека, не являются изобретениями и не патентуются.

Таким образом, в данном вопросе следует четко отделять изобретения от открытий. Так, патентованию будут подлежать именно те штаммы микроорганизмов, которые были получены путем каких-либо модификаций, но не те, которые были обнаружены в природе и всего лишь изучены исследователями. При разработках, связанных с микроорганизмами, могут быть получены различные потенциально охраноспособные объекты, такие как соединения (химические соединения, пептиды, белки, антитела и др.), генетические конструкции, применение, композиции и способы. Однако в данной статье авторы планируют осветить только штаммы микроорганизмов как объекты патентных прав.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследования выступали доступные публикации в рецензируемых журналах по тематическим запросам, составленным по ключевым словам выбранной тематики, официальные интернет-сайты, нормативные правовые акты (НПА), регламентирующие патентование и порядок регистрации штаммов в РФ и зарубежных странах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Требования к штаммам при патентовании

В большинстве стран при патентовании штаммов микроорганизмов от заявителей требуется прохождение процедуры депонирования. Депонирование – это в общем случае процедура сдачи штамма на хранение в уполномоченный орган, в котором в течение определенного времени (срока действия патента) данный штамм будет поддерживаться в жизнеспособном состоянии. Депонирование, как правило, применяется в двух случаях: для обеспечения независимого резервного источника штамма, когда штамм может быть истребован самим заявителем в случае утраты основного источника штамма, а также в целях установления свойств штамма в спорных ситуациях.

В Российской Федерации процедура патентного депонирования является обязательным требованием для большинства штаммов микроорганизмов, за исключением штаммов, полученных с помощью генно-инженерных методик, то есть рекомбинантных штаммов, которые могут быть сконструированы и осуществлены на основании сведений, приведенных в описании[2]. Последние могут быть охарактеризованы через указание нуклеотидных последовательностей гена, отвечающего за экспрессию интересующего белка, или даже полную нуклеотидную последовательность микроорганизма. Для патентования штаммов микроорганизмов без раскрытия генетической последовательности необходимо пройти процедуру патентного депонирования в международном органе по депонированию, предусмотренном Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры[3], или в российской коллекции, уполномоченной осуществлять депонирование для целей патентной процедуры. Количество участниц Будапештского договора в настоящее время составляет 86 стран, и все они являются также участницами договора о патентной кооперации (PCT). Организация, осуществляющая патентное депонирование, обеспечивает хранение штамма в течение не менее двадцати лет с даты депонирования.

Следует отметить, что в настоящее время в России для целей международного патентования доступны 2 коллекции: Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (ВКПМ) и Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ). Обе данные коллекции находятся в Московском регионе. Депонирование штамма микроорганизма в БРЦ ВКПМ может осуществляться как физическим, так и юридическим лицом. Как правило, для депонирования требуется заполнить паспорт на штамм на русском и английском языке и официальную заявку, в некоторых случаях – прило-

[1] The Expert Report "Patent issues related to influenza viruses and their genes" was commissioned by the World Health Organization from the World Intellectual Property Organization (WIPO) pursuant to WHA Resolution 60.28. Geneva, 20–23 November, 2007. Available at: https://www.wipo.int/export/sites/www/policy/es/global_health/pdf/influenza.pdf. Accessed: 25.09.2023.

[2] Требования к документам заявки на выдачу патента на изобретение, утвержденные приказом Минэкономразвития России от 21.02.2023 № 107. Доступно по: https://rospatent.gov.ru/ru/documents/prikaz-minekonomrazvitiya-107-21022023#2. Ссылка активна на: 25.09.2023.

[3] Будапештский договор о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры от 28 апреля 1977 г. / Ратифицирован Указом Президиума Верховного Совета СССР от 24 декабря 1980 г. № 3615-X «О ратификации Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры». Доступно по: https://www.fips.ru/documents/international-documents/dogovory/budapeshtskiy-dogovor-o-mezhdunarodnom-priznanii-deponirovaniya-mikroorganizmov-dlya-tseley-patentno.php. Ссылка активна: 25.09.2023.

жить отчет об идентификации штамма, и только после проверки всех документов будет предложено привезти штаммы для проверки чистоты и жизнеспособности. Для депонирования в ВКПМ штаммов, выделенных из природных источников, обязательно требуется наличие заключения об идентификации, основанной на анализе 16(18)S РНК. Данные об этой идентификации должны быть приложены к паспорту. В таком случае должна быть представлена нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК, кодирующего ген 16(18)S РНК, размером не менее 500 пар оснований, а также приведены использованные праймеры и таблица сравнения гомологии секвенированного фрагмента ДНК депонированного штамма с ожидаемым видом и наиболее близкими видами при условии, что гомология секвенированного фрагмента ДНК с заявленным видом составляет не менее 97 %. Если нуклеотидная последовательность секвенированного фрагмента ДНК депонированного штамма имеет гомологию 97 % и более с несколькими видами близкородственных микроорганизмов, то соответствие ожидаемому виду необходимо подтвердить дополнительно с помощью оценки биохимических и физиологических признаков. Для генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов (ГИММ) требуется предоставить обоснованное заключение комиссии по генно-инженерной деятельности, которое указывает на уровень потенциально вредного воздействия на здоровье человека. Это заключение должно быть подкреплено соответствующими данными. Следовательно, для депонирования штамма необходимо не только выделить его, но и привести характеристику с использованием ДНК-анализа.

Отдельно следует указать в заявке и в паспорте на штамм, предусматривается ли выдача данного штамма третьим лицам и в каких случаях. Зачастую заявители при депонировании в патентных целях не рассматривают возможность свободной выдачи разработанного штамма третьим лицам и осуществляют депонирование только с целью дальнейшего патентования штамма и соблюдения требований к нему как патентному объекту. Таким образом, не всегда штамм, раскрытый в виде признаков в патенте и депонированный в коллекцию, доступен для третьих лиц, в том числе и для исследований.

После проверки всех документов куратором сами культуры штаммов в зависимости от коллекции и самого вида микроорганизма могут быть сданы на агаризованной среде в пробирке, в виде лиофилизата, в пробирке с жидким азотом (криопробирки) или в форме лизата с определенным титром. Ввиду того, что, помимо самого штамма, для депонирования нужны дополнительные заключения о принадлежности штамма определенному виду, вся процедура депонирования именно для целей международного патентования может занимать 1–2 месяца. При этом, как следует из п. 56 требований к документам заявки на выдачу патента на изобретение[1], дата справки о депонировании должна быть ранее даты подачи приоритетной заявки на изобретение на этот штамм. Данное обстоятельство следует учитывать при разработке стратегии охраны биотехнологического продукта, патентовании штамма, а также при разработке стратегии международного патентования.

Влияние признаков штамма по патенту на объем охраны

Важной особенностью патентования штаммов микроорганизмов является влияние процедуры депонирования штамма на объем правовой охраны изобретения. В России, согласно требованиям, если штамм микроорганизма или линия клеток растений или животных депонированы, в формуле изобретения приводят вид культуры, название или аббревиатуру коллекции-депозитария и регистрационный номер, присвоенный коллекцией депонированному объекту[2]. В формуле изобретения также необходимо указать назначение (продуцент, для диагностики, как антиген или для получения иммуногенных композиций (вакцин) и др.).

Примеры:

Патент RU 2756794

Штамм нового генотипа *Escherichia coli* 1654-1 для молекулярно-генетического типирования бактерий рода *Escherichia*, депонированный в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под номером В-8794 [2].

Патент RU 2790669

1. Штамм *Leuconostoc* mesenteroides ВКПМ В-14022, продуцент декстрана.
2. Применение штамма по п. 1 для получения полисахарида декстрана.
3. Способ получения декстрана, включающий культивирование штамма по п. 1 и выделение декстрана из ферментационной среды [3].

Патент RU 2787392

Штамм бактерий *Gallibacterium anatis*, предназначенный для получения моно- и поливалентных иммуногенных композиций, направленных на специфическую профилактику галлибактериоза сельскохозяйственных птиц, депонирован в ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН под номером В-1364 [4].

[1] Требования к документам заявки на выдачу патента на изобретение, утвержденные приказом Минэкономразвития России от 21.02.2023 № 107. Доступно по: https://rospatent.gov.ru/ru/documents/prikaz-minekonomrazvitiya-107-21022023#2. Ссылка активна на: 25.09.2023.

[2] Там же.

Как следует из примеров выше, номер, полученный при депонировании штамма в коллекцию, может заменять собой некоторые дополнительные характеристики штамма, в том числе необходимые для определения штамма, но указанные только в паспорте при депонировании.

Согласно патентному законодательству, статья 1354 ГК РФ, охрана интеллектуальных прав на изобретение предоставляется на основании патента в объеме, определяемом содержащейся в патенте формулой изобретения. Для толкования формулы изобретения могут использоваться описание и чертежи, а также трехмерные модели изобретения в электронной форме. Как видно из приведенных примеров, объем охраны в этом случае достаточно сложно установить и он определяется, по сути, свойствами штамма, приведенными в описании и в паспорте при депонировании. Таким образом, как видно из примеров, правовая охрана такого изобретения сводится к одному конкретному депонированному микроорганизму и его свойствам. Признаки изобретения в таком виде достаточно сложно интерпретировать при установлении патентоспособности и нарушении прав третьими лицами. Согласно статье 1358 ГК РФ изобретение признается использованным в продукте или способе, если продукт содержит, а в способе использован каждый признак изобретения, приведенный в независимом пункте содержащейся в патенте формулы изобретения, либо признак, эквивалентный ему и ставший известным в качестве такового в данной области техники до даты приоритета изобретения. Таким образом, при определении нарушения необходимо установить, использован ли каждый признак, приведенный в независимом пункте формулы изобретения, или его эквивалент в рассматриваемом продукте. Под признаком изобретения в данном случае понимается культура штамма, его свойства (например, как продуцента), а также его номер в коллекции. С учетом того, что культуры штаммов, их свойства, полученные при их модификации, равно как и номер в коллекции, являются уникальными, то в данном случае определить эквивалентные признаки практически невозможно и объем изобретения определяется буквально признаками, приведенными в независимом пункте формулы изобретения. Таким образом, объем изобретения представляется достаточно узким и определен без каких-либо отличительных признаков по сравнению с признаками штаммов, известными из уровня техники или из описания.

Дополнительно ввиду краткости признаков штамма в формуле изобретения для целей установления нарушения представляется необходимой характеризация штамма, используемого третьими лицами, в чистом виде. Штамм в чистом виде необходим для того, чтобы достоверно установить использование всех признаков, приведенных в независимом пункте в патенте. Получение штамма в этом случае будет достаточно затруднительно, так как, как правило, на рынке присутствует уже готовый продукт – лекарственный препарат, полученный с помощью этого штамма, подвергнутый неоднократной очистке от микроорганизмов и их веществ, а также содержащий вспомогательные вещества, в виде определенной лекарственной формы. Как пример можно привести аналог инсулина – инсулин лизпро, получаемый с помощью рекомбинантных методов из культуры дрожжей или бактерий *E. coli* и полностью соответствующий своей структуре, принятой под международным непатентованным названием (МНН), независимо от источника выделения. При этом по конечному продукту, белку, входящему в состав препарата, инструкции по медицинскому применению не представляется возможным установить штамм-продуцент. В этом случае для установления нарушения необходимо истребовать документы по производству у потенциального нарушителя или выдержки из регистрационного досье, которое находится на хранении у регистрирующего органа – Министерства здравоохранения. В любом случае требуемые документы являются конфиденциальной информацией и охраняются в том числе в режиме коммерческой тайны. Таким образом, установление нарушения по патенту на изобретение, признаки которого охарактеризованы через номер коллекции при депонировании, является достаточно нетривиальной задачей и требует усилий.

В случае же проверки соответствия на условия патентоспособности, в частности новизны и изобретательского уровня, необходима проверка данного штамма по свойствам, указанным в справке, полученной при депонировании, или паспорту. Однако данные свойства могут не содержать в себе исчерпывающих сведений о штамме, и могут быть приведены свойства только в отношении производственных свойств как штамма – продуцента определенного белка. С учетом развития рекомбинантных технологий можно получить микроорганизм – продуцент одного и того же требуемого белка, но из разных источников, например, как уже было показано выше на примере инсулина лизпро. Однако при внесении в формулу изобретения номера штамма, полученного в коллекции при депонировании, формируется объем охраны, ключевым признаком которого является этот номер, но не свойства штамма как таковые. Это обстоятельство также необходимо учитывать при разработке своих собственных штаммов-продуцентов в целях обеспечения патентной чистоты, а также при разработке патентной стратегии продукта.

Следует отдельно подчеркнуть, что в России, несмотря на присутствие производителей рекомбинантных препаратов на основе штаммов-продуцентов с полным циклом производства, в практике неизвестны случаи аннулирования патентов, вклю-

чающих признак номера штамма в коллекции, или признаки установления нарушения. Единственный случай судебного разбирательства, касающийся установления нарушения в отношении штамма, – дело № А40-66073/09-51-579, постановление АС г. Москвы № КГ-А40/3145-11 от 19.05.2011[1], – касается установления эквивалентности признаков штамма, охарактеризованного через номер коллекции в патенте № 2238105. Как следует из патента, в нем приведены способы получения рекомбинантной вакцины для профилактики вирусного гепатита В. Как указано в материалах дела, в апелляционной инстанции на рассмотрение экспертов был вынесен вопрос об эквивалентности признака п. 1 формулы изобретения патента РФ № 2238105, «полученного путем культивирования штамма дрожжей *Pichia angusta* ВКПМ Y-2412», и признака, «полученного путем культивирования штамма дрожжей *Hansenula polimorpha* К3/8-1», как указано в нормативной документации, на основании которой была осуществлена регистрация вакцины в качестве лекарственного средства. При этом признаки, относящиеся к виду микроорганизмов (различные виды дрожжей) и номеру штамма, были признаны эквивалентными одним из экспертов: «*Свои выводы по поводу эквивалентности признаков эксперт В. З. Тарантул основывал на том, что один и тот же результат (поверхностный антиген вируса гепатита В) достигается одинаковым путем с применением рекомбинантных штаммов одного вида. Штаммы по патенту и штамм ответчика как штаммы-продуценты одного и того же действующего начала вакцины для профилактики вирусного гепатита В эквивалентны*». Данные выводы были положены в основу решения апелляционной инстанции. При этом других дел, опровергавших такую логику, суды более не рассматривали. Следует отметить, что данное дело не следует считать прецедентным ввиду давности (2011 г.), несовременного законодательства, а также изменений в подходах к эквивалентности признаков. Таким образом, вопрос об эквивалентности признаков при установлении объема охраны по патентам, включающим признаки номера штамма, а также вопрос об установлении нарушения в таком случае остается пока открытым.

В зарубежной практике патентования штаммов также известно всего лишь несколько кейсов по патентованию штаммов. Данные дела стали прецедентными и привлекающими внимание с юридической точки зрения.

Согласно европейской статистике, до 45 % патентов, выданных Европейским патентным ведомством в период 2019–2022 гг., от общего количества патентов на микроорганизмы составляют патенты с номером штамма в коллекции при депонировании [5]. Также были сделаны выводы, аналогичные выводам выше. Так, при рассмотрении материалов дел Shanghai Finc vs Tianjin Lvshengpengyuan and Hongbinhesheng в Пекинском суде по интеллектуальной собственности[2], Pharmaq vs Intervet в Европейской ассоциацией свободной торговли[3] и Eli Lilly vs Actavis в Верховном суде Великобритании[4] были сделаны выводы о том, что признаки, характеризующие регистрационный номер и коллекцию депонированного штамма, действительно приводят к кардинальному сужению объема правовой охраны на изобретение. При этом отмечается, что наличие других признаков, характеризующих свойства штамма, способ его получения и т. д., в ряде случаев позволяет расширить правовую охрану изобретения за пределы одного конкретного депонированного микроорганизма. Так, в деле Shanghai Finc vs Tianjin Lvshengpengyuan and Hongbinhesheng решающую роль сыграло совпадение аминокислотных последовательностей спорного и запатентованного микроорганизмов. При этом единственный пункт формулы в спорном патенте CN103503780 выражен следующим образом «*чисто белый новый штамм Hypsizigus Finc-W-247, регистрационный номер CCTCC NO: M 2012378*» [6]. В рамках разбирательств была проведена экспертиза, включающая анализ аминокислотных последовательностей штаммов. В заключение было принято решение о том, что спорный и запатентованный штамм являются одинаковыми, так как их специфические фрагменты были одинаковыми на 99,9 %, а также свойства обоих штаммов, полученные с помощью морфологического анализа, были по существу одинаковыми [7]. Таким образом, очевидно, что для установления нарушения необходима не только формула изобретения и описание, но также и сам штамм и штамм потенциального нарушителя для проведения анализа на гомологию.

В деле Pharmaq vs Intervet, касающемся вопроса о нарушении патента Норвегии, интересным является то, что правовая охрана распространялась на штамм F93-125 (депонированный в аккредитованной в соответствии с Будапештским договором организации) и близкие штаммы, которые имеют сходные генотипические и/или фенотипические характеристики

[1] A40-66073/09-51-579. Доступно по: https://kad.arbitr.ru/Document/Pdf/996f79e8-740c-490f-bcaa-ceb6b65dc21c/e95f2891-957f-4cd1-99bf-4f87509d0d76/A40-66073-2009_20110519_Reshenija_i_postanovlenija.pdf?isAddStamp=True. Ссылка активна на 05.10.2023.

[2] Shanghai Finc v. Tianjin LSPY Beijing 73 civil preliminary case no. 555 CN103503780B. 2017. Available at: https://wenshu.court.gov.cn/website/wenshu/181107ANFZ0BXSK4/index.html?docId=61cea31a2c5a46bc8a4daca1000c6c4f. Accessed: 05.10.2023.

[3] Pharmaq AS v. Intervet International B.V Borgarting Court of Appeal 15-170539ASD-BORG/01 and 15-204605ASD-BORG/01. 2016. Available at: https://eftacourt.int/cases/e-16-14/ Accessed: 05.10.2023.

[4] Eli Lilly v Actavis UKSC 48. 2017. Available at: https://www.supremecourt.uk/cases/uksc-2015-0181.html. Accessed: 05.10.2023.

и реагируют серологически с F93-125. Штамм F93-125 относится к подтипу PD SAV1, который встречается в основном в Ирландии и Шотландии. Компанией Pharmaq была создана вакцина с таким же назначением на основе штамма вируса, выделенного из лосося, обитающего в норвежских водах (подтип SAV-3). В рамках рассмотрения дела были проведены масштабные исследования в отношении того, представляют ли два разных штамма вируса один и тот же антиген, используемый в вакцине. В результате исследований было выявлено, что все-таки штаммы различаются по активности, и нарушение патентных прав установлено не было. Интересно отметить, что вакцина предполагаемого «нарушителя» Pharmaq оказалась более эффективной, что сыграло значительную роль при принятии решения.

Результаты анализа вышеприведенного дела Pharmaq vs Intervet, а также дела Eli Lilly v Actavis UKSC 48. 2017 говорят о том, что при отсутствии указания в патенте на необходимость использования исключительно только депонированного штамма, а также при наличии аналогичных эффектов у запатентованного (депонированного) и спорного штаммов суд может вынести решение о нарушении патента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С учетом положений российского законодательства и зарубежной судебной практики можно сделать вывод о том, что необходимо выбирать оптимальную стратегию охраны штамма. Так, включение в патент большого количества признаков, относящихся к штамму микроорганизма, в том числе аминокислотной последовательности, свойств и особенностей получения, может сыграть ключевую роль при установлении нарушения патента, несмотря на то, что данная информация не всегда в таком объеме является необходимой для соответствия требованиям достаточности раскрытия. Однако при этом, если в патенте указан только номер штамма микроорганизма, этого может быть недостаточно для установления нарушения. Так, невключение данных по характеризации штамма методами ДНК-анализа, которые могли бы дополнить описание в патентной заявке, но не являются необходимыми для получения патента, может сыграть не в пользу патентообладателя в будущем для установления возможного нарушения. Важно отметить, что отечественная судебная практика по данному вопросу отсутствует, но суды в Российской Федерации, так же как и зарубежные, учитывают доктрину эквивалентов. Таким образом, по мнению авторов статьи, принятие во внимание описанных выше аспектов может повысить качество правовой охраны изобретений, относящихся к штаммам микроорганизмов, и положительно повлиять на инновационную политику биотехнологических компаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carlos M. Carrera, editor. A Guide To Pharmaceutical Patents. Geneva: South Centre; 2012. 310 p.
2. Катаева Л. В., Колотова О. Н., Степанова Т. Ф., Богун А. Г., Кисличкина А. А. Штамм нового генотипа *Escherichia coli* 1654-1 для молекулярно-генетического типирования бактерий рода *Escherichia*. Патент РФ на изобретение № RU 2756794 C1. 05.10.2021. Доступно по: https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2756794&TypeFile=html. Ссылка активна на 25.09.2023.
3. Белый П. А., Лопатухин Э. Ю., Заславская К. Я., Федоров С. В., Земсков Д. Н., Нигматова Д. Н. Новый штамм *Leuconostoc mesenteroides* продуцент декстрана. Патент РФ на изобретение № RU 2790669 C1. 28.02.2023. Доступно по: https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2790669&TypeFile=html. Ссылка активна на 25.09.2023.
4. Петкович Д. Д., Лаишевцев А. И., Капустин А. В., Зулькарнеев Э. Р., Якимова Э. А., Шастин П. Н., Супова А. В., Хабарова А. В., Савинов В. А., Феклисова В. Н., Ковалева Е. Н. Штамм бактерий *Gallibacterium anatis*, предназначенный для получения моно- и поливалентных иммуногенных композиций, направленных на специфическую профилактику галлибактериоза сельскохозяйственных птиц. Патент РФ на изобретение № RU 2787392 C1. 09.01.2023. Доступно по: https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2787392&TypeFile=html. Ссылка активна на 25.09.2023.
5. MacLeod I. The scope and infringement of patents claiming strains of bacteria. *Access Microbiol*. 2022;4(8):acmi000449. DOI: 10.33380/acmi.0.000449.
6. Yu L. New pure white hypsizigus marmoreus strain. China patent CN103503780. 15.01.2014. Available at: https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/049887639/publication/CN103503780A?q=CN103503780. Accessed: 25.09.2023.
7. Xiaodong Z. Research on the Scope of Deposit Number Limited Claim of Strain Patents and the Furnishing of Deposited Strain. *International Journal of Law and Society*. 2021;4(1):47–53. DOI: 10.33380/j.ijls.20210401.16.

REFERENCES

1. Carlos M. Carrera, editor. A Guide To Pharmaceutical Patents. Geneva: South Centre; 2012. 310 p.
2. Kataeva L. V., Kolotova O. N., Stepanova T. F., Bogun A. G., Kislichkina A. A. *Escherichia coli* 1654-1 new genotype strain for molecular genetic typing of Escherichia bacteria. Patent RUS № 2756794 C1. 05.10.2021. Available at: https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2756794&TypeFile=html. Accessed: 25.09.2023. (In Russ.)
3. Beliy P. A., Lopatukhin E. Yu., Zaslavskaya K. Ya., Fedorov S. V., Zemskov D. N., Nigmatova D. N. New *Leuconostoc mesenteroides* dextran producer strain. Patent RUS № 2790669 C1. 28.02.2023. Available at: https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2790669&TypeFile=html. Accessed 25.09.2023. (In Russ.)
4. Petkovich D. D., Laishedcev A. I., Kapustin A. V., Zulkarneev E. R., Yakimova E. A., Shastin P. N., Supova A. V., Khabarova A. V., Savinov V. A., Feklisova V. N., Kovaleva E. N. Bacterial strain *Gallibacterium anatis* intended for obtaining mono- and polyvalent immunogenic compositions aimed for the specific prevention of Gallibacterium Anatis in farm poultry. Patent RUS № 2787392 C1. 09.01.2023. Available at: https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2787392&TypeFile=html. Accessed 25.09.2023. (In Russ.)
5. MacLeod I. The scope and infringement of patents claiming strains of bacteria. *Access Microbiol*. 2022;4(8):acmi000449. DOI: 10.33380/acmi.0.000449.
6. Yu L. New pure white hypsizigus marmoreus strain. China patent CN103503780. 15.01.2014. Available at: https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/049887639/publication/CN103503780A?q=CN103503780. Accessed: 25.09.2023.
7. Xiaodong Z. Research on the Scope of Deposit Number Limited Claim of Strain Patents and the Furnishing of Deposited Strain. *International Journal of Law and Society*. 2021;4(1):47–53. DOI: 10.33380/j.ijls.20210401.16.

pharmtech & ingredients

26-Я МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА ОБОРУДОВАНИЯ, СЫРЬЯ И ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

19–22.11.2024

МОСКВА,
КРОКУС ЭКСПО

ЗАБРОНИРУЙТЕ СТЕНД

PHARMTECH-EXPO.RU

+7 495 799 55 85
pharmtech@ite.group

ITE ОРГАНИЗАТОР
ORGANISER

0+

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этичного поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля **«Разработка и регистрация лекарственных средств»** является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале **«Разработка и регистрация лекарственных средств»**, должно соответствовать науке:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармаколо- гия (медицинские науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.
2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

   Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – http://www.consort-statement.org

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате А4 Microsof Word (*doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах, и не повторять название статьи.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы Х1, Х2 и Х3 придумали и разработали эксперимент, авторы Х4 и Х5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. Х3 и Х4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы Х1 и Х6 участвовали в обработке данных. Автор Х7 проводил теоретические расчеты. Авторы Х1, Х2 и Х7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: http://elibrary.ru

Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя и страну происхождения [пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдранол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацеутикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, страну происхождения [пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете, в прослеживаемом формате, с четкими, разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т. д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n. Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т. д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте http://www.translit.ru

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychophar-macogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: http://www. nlm.nih.gov/citingmedicine.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B . Obesity among individuals with serious mental illness. Acta Psychiatr Scand. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/

Варианты библиографического описания патентов: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте http://search.crossref.org/ или https://www. citethisforme.citethisforme.com.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *tif, *jpg, *cdr, *ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.

научно-производственный журнал

РРЛС

разработка и регистрация лекарственных средств

Журнал является Open Access изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений.

Основные пять тематических разделов журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», соответствует отраслям науки:

- ✓ 3.2.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).
- ✓ 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки).
- ✓ 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНИТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- ➢ Услуга комплексного перевода.
- ➢ Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- ➢ При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.

Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: **info@cpha.ru**

научно-производственный журнал

РРЛС

разработка и регистрация лекарственных средств

Электронный журнал

Печатный журнал

Информационный ресурс

Фармацевтический журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Это научный журнал международного уровня и интернет-ресурс 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

info@chpa.ru