WWW.PHARMJOURNAL.RU

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ
ВАК Scopus

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

SC powder – отечественный порошок для приготовления биорелевантных сред растворения

Scientific Compliance

FaSSGF
желудок натощак
FaSSIF
кишечник натощак
FeSSIF
кишечник после еды

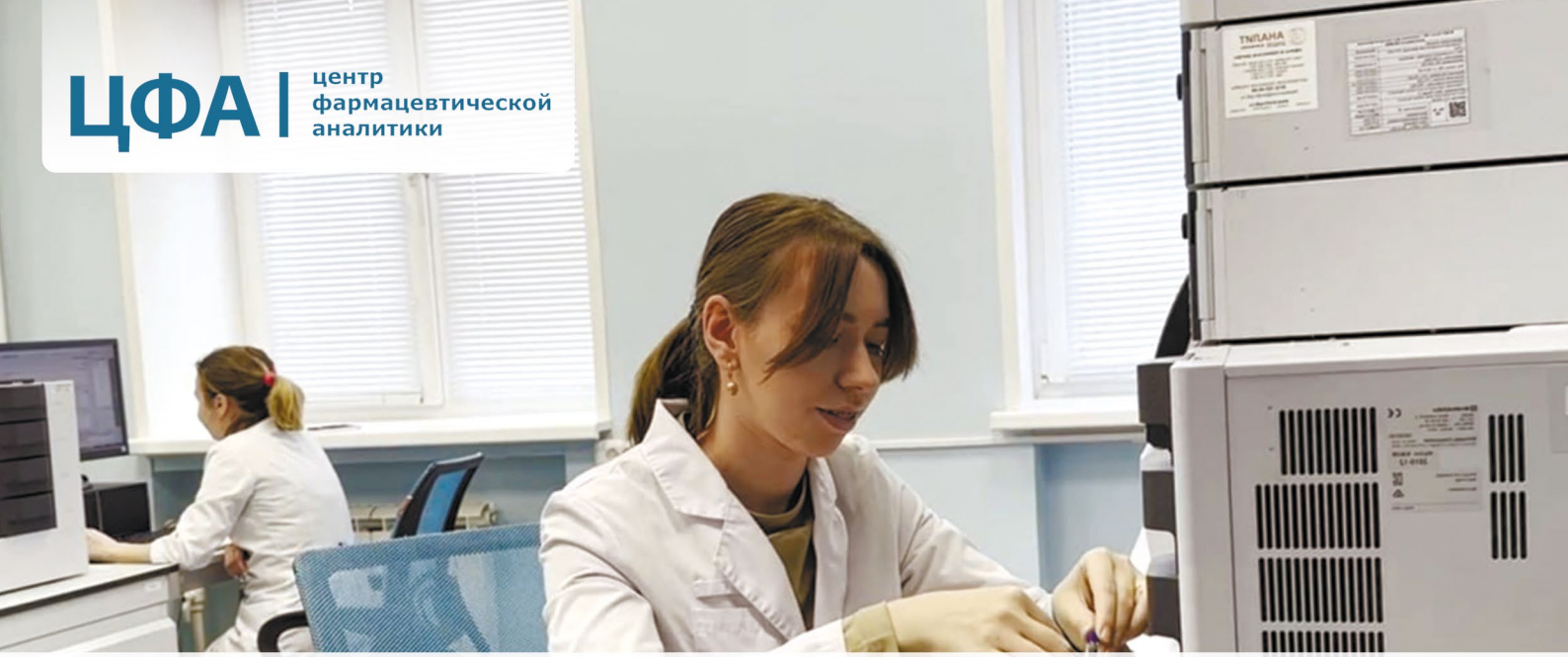
INFO@PHARMJOURNAL.RU

Том 13, № 2. 2024
Volume 13, No. 2. 2024

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, № 2

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2024. Volume 13, No. 2

Цели и задачи журнала

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

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

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

Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества.

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

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

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

Скорик Ю. А. – доц., к. х. н., руководитель лаборатории природных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН; заведующий научно-исследовательским химико-аналитическим отделом Национального медицинского исследовательского центра имени В. А. Алмазова, 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

Бобкова Н. В. – доц., д. фарм. н., профессор кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

Ваизова О. Е. – доцент, д. м. н., профессор кафедры фармакологии ФБГОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, 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., АО «Бинергия»; руководитель отдела разработки, профессор кафедры промышленной фармации НИЯУ МИФИ, Москва, Россия

Зарубина И. В. – профессор, д. биол. н., старший преподаватель, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Министерства обороны Российской Федерации, Москве, 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., доцент, профессор кафедры управления и экономики фармации ФБГОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, Россия

Комаров Т. Н. – к. фарм. н., директор исследовательского центра ООО «ЦФА», Москва, Россия

Крикова А.В. – д. фарм. н., доцент, зав. кафедрой управления и экономики фармации, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск, 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

Малашенко Е. А. – к. фарм. н., доц. 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 им. А. П. Арзамасцева Института фармации им. А. П. Нелюбина Сеченовского университета, Москва, Россия

Мельников Е. С. – к. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

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

Напалкова С. М. – профессор, д. биол. н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

Оборотова Н. А., проф., д. фарм. н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина», Москва, Россия

Ордабаева С. К. – проф., д. фарм. н., заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии АО «Южно-Казахстанская медицинская академия», Шымкент, Казахстан

Пожарицкая О. Н. – к. фарм. н., старший научный сотрудник Мурманского морского биологического института РАН (ММБИ РАН), Мурманск, Россия
Попов В. В. – д. м. н., профессор кафедры терапии с курсом фармации Медицинского института непрерывного образования, ФГБОУВО «РОСБИОТЕХ». Врач – Клинический фармаколог ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» имени Н. А. Семашко», 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
Селиванова И. А. – проф., д. фарм. н., профессор кафедры химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия
Сливкин А. И. – проф., д. фарм. н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологи ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия
Смехова И. Е. – доц., профессор кафедры технологии лекарственных форм ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Станишевский Я. М. – проф., д. х. н., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, Москва, Россия
Сысуев Б. Б. – доц., д. фарм. н., руководитель Центра фармацевтической разработки и инновационных лек. форм Сеченовского университета, Москва, Россия
Тернинко И. И. – доцент, д. фарм. н., начальник Испытательной лаборатории, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Тринеева О. В. – д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологи ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия
Шиков А. Н. – д. фарм. н., профессор кафедры технологии фармацевтических препаратов ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия
Wrood S. Al-Khfajy (Ирак) – д. фарм. н., Assistant professor, Department of Pharmacology and toxicology, College of Pharmacy. Mustansiriyah University, Багдад, Ирак

ISSN 2305-2066 (Print)	
ISSN 2658-5049 (Online)	
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
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 "CPHA"), Moscow, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Vitaliy V. Khutoryanskiy – Prof., Cand. of Sci. (Chem.), University of Reading, Reading, United Kingdom

Rouslan I. Moustafine – as., Cand. of Sci. (Chem.), Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia

Yury A. Skorik – as., Cand. of Sci. (Chem.), Institute of Macromolecular Compounds of RAS; Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Editorial board

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

Vladimir L. Beloborodov – Dr. of Sci. (Pharm.), 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

Natalia V. Bobkova – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, Moscow, Russia

Olga E. Vaizova – as., Dr. of Sci. (Med.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Konstantin S. Guzev – Dr. of Sci. (Pharm.), Retinoids Pharmaceutical Research and Production Company (Retinoids JSC), Moscow, Russia

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

Irina A. Dzhuparova – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Svetlana V. Emshanova – Dr. of Sci. (Pharm.), JSC "Binergy"; National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

Irina V. Zarubina – Prof., Dr. of Sci. (Biol.), S. M. Kirov Military Medical Academy, Moscow, Russia

Dmitry Yu. Ivkin – Cand. of Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Elena I. Kalenikova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Elena V. Karakulova – Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Timofey N. Komarov – Cand. of Sci. (Pharm.), LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", Moscow, Russia

Anna V. Krikova – Dr. of Sci. (Pharm.), Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

Vladimir A. Kurkin – Dr. of Sci. (Pharm.), Samara State Medical University, Samara, Russia

Larisa I. Lavrenteva – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

Evgeniya A. Malashenko – Cand. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Yury V. Medvedev – Cand. of Sci. (Pharm.), Institute of Pharmacy named after A. P. Nelyubina Sechenov University, Moscow, Russia

Evgeny S. Melnikov – Cand. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Igor I. Miroshnichenko – Dr. of Sci. (Med.), Mental Health Research Center , Moscow, Russia

Svetlana M. Napalkova – Prof., Dr. of Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Natalia A. Oborotova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), National Medical Research Center for Oncology named after N. N. Blokhin, Moscow, Russia

Saule K. Ordabaeva – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), JSC «South Kazakhstan Medical Academy», Shymkent, Kazakhstan

Olga N. Pozharitskaya – Cand. of Sci. (Pharm.), Murmansk Marine Biological Institute of the RAS, Murmansk, Russia

Vladimir V. Popov – Dr. of Sci. (Med.), Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH). Clinical Hospital "RZD-Medicine" named after N. A. Semashko", Moscow, Russia

Vladimir L. Rusinov – RAS c.-m., Dr. of Sci. (Chem.), Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia

Irina A. Selivanova – Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

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

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

Yaroslav M. Stanishevskiy – Prof., Dr. of Sci. (Chem.), Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia

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

Inna I. Terninko – as., Dr. of Sci. (Pharm.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

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

Alexander N. Shikov – Dr. of Sci. (Pharm.), Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Wrood S. Al-Khfajy – Dr. of Sci. (Pharm.), Assistant professor, Department of Pharmacology and toxicology, College of Pharmacy. Mustansiriyah University, Baghdad, Iraq

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

Современные аспекты наружного применения и перспективы использования секретома мезенхимальных стволовых клеток (обзор)
Е. О. Бахрушина, И. В. Гравель, О. С. Филиппова, В. Н. Тычинин, А. А. Попова, О. Б. Добровольский 34

Профиль биологически активных веществ листьев аронии мичурина, произрастающей в условиях Центрального Черноземья
О. В. Тринеева, О. В., Пугачева 48

Изучение потенциала фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* Mill.) как ценного лекарственного растения (обзор)
С. Буракба, А. И. Марахова, Я. М. Станишевский, И. А. Василенко, В. Ю. Жилкина 59

Анализ *цис*-изомер-обогащенного образца дигидрокверцетина путем 1D- и 2D-ЯМР-спектроскопии
Р. П. Терехов, А. Х. Тальдаев, Э. В. Бочаров, Д. И. Панков, А. Д. Савина, И. А. Селиванова 68

Индукторы ферроптоза – эрастин и его аналоги (обзор)
Е. В. Санарова, А. В. Ланцова, Л. Л. Николаева, Н. А. Оборотова, Л. М. Борисова 77

Фармацевтическая технология

Технология сухого экстракта лабазника вязолистного и первичная оценка профиля его безопасности
Е. Ю. Авдеева, М. Г. Скороходова, В. В. Шейкин, Т. В. Кадырова, М. В. Белоусов 84

Алгоритм разработки комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения с антимикробным действием: от научного поиска до лекарственной формы
В. А. Филатов, О. Ю. Куляк, Е. И. Каленикова 94

Методы анализа лекарственных средств

Идентификация и количественное определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот ветреницы лютичной (*Anemone ranunculoides* L.) методом UHPLC-DAD-HESI/MS
А. Н. Луферов, Н. В. Бобкова, Д. О. Боков, М. Н. Родин, Е. В. Сергунова, Т. Ю. Ковалёва, Т. Д. Рендюк, А. В. Стреляева, А. М. Анцышкина, Т. В. Простодушева, С. Г. Зайчикова, В. М. Баева, И. Б. Перова, К. И. Эллер, В. В. Бессонов 106

Растровая электронная микроскопия в анализе растительного сырья девичьего винограда (Parthenocissus quinquefolia (L.) Planch.)
Ф. Д. Евсиков, А. А. Гудкова, А. И. Сливкин 118

Изучение органических кислот и аминокислотного состава каштана конского цветков
А. С. Чистякова, А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, А. С. Болгов, А. А. Гудкова, А. И. Сливкин 125

Разработка и валидация методики количественного определения полипренолов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии
Н. С. Попов, А. А. Антипина, С. В. Савинцев, В. Ю. Балабаньян 133

Анализ сортовых преимуществ листовой формы *Apium graveolens* L. по содержанию хлорогеновой кислоты
Е. С. Сурбеева, У. А. Ефремова, В. С. Шуракова, Е. В. Вишняков, И. И. Тернинко 142

Выделение, идентификация и количественное определение флавоноидов из цветков клекачки перистой
А. Ю. Соколова, А. М. Полуянов, А. И. Бардаков, С. С. Сологова, Н. В. Бобкова 155

Разработка и аттестация стандартного образца надропарина кальция
А. В. Зыкова, С. В. Кривощеков, Д. А. Исаков, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов 164

Доклинические и клинические исследования

Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС
М. А. Токарева, Е. С. Мельников, М. В. Белова, Е.Н. Фишер, Т. А. Родина, И. Е. Шохин 171

Валидация тест-системы на основе метода иммуноферментного анализа для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях
В. В. Писарев, А. В. Иванов 181

Фармакологический скрининг нового производного вальпроевой кислоты с использованием метода фармакоэнцефалографии у крыс
Ю. И. Сысоев, Д. Д. Шиц, М. М. Пучик, Т. А. Гутий, Е. В. Федорова, В. А. Приходько, И. А. Титович, А. С. Мелехова, А. Я. Беспалов, И. С. Князева, Е. Б. Шустов, С. В. Оковитый 190

Изучение влияния ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) на характеристики репродуктивной системы самцов крыс
Р. Г. Фархутдинов, К. А. Пупыкина, Л. А. Шарафутдинова, А. М. Федорова, З. Р. Хисматуллина, М. И. Гарипова, Е. Ф. Королева, А. А. Ямалеева, Т. Д. Рендюк 208

Влияние *in vitro* на параметры фибринолиза водных экстрактов грибов, произрастающих на древесных растениях
Н. М. Фаустова, Д. Н. Ведерников, В. В. Баканов, Е. Н. Павлова, Е. Н. Власова, Ю. А. Скорик 217

Разработка и валидация методики количественного определения тофацитиниба в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией
Е. С. Ветрова, П. К. Карнакова, Н. С. Багаева, К. К. Карнакова, М. О. Попова, А. А. Попова, О. А. Арчакова, Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин 233

Регуляторные вопросы

Устаревшие латинские названия лекарственных растений в монографиях Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (обзор)
М. Н. Повыдыш, М. Ю. Гончаров 245

CONTENTS

Introduction 10

Research and development of new drug products

Modern aspects of external application and prospects of using the secretome of mesenchymal stem cells (review)
Elena O. Bakhrushina, Irina V. Gravel, Olga S. Filippova, Valery N. Tychinin, Anna A. Popova, Oleg B. Dobrovolsky 34

Profile of biologically active substances of *Aronia mitschurinii* leaves growing in the conditions of the Central Black Earth region
Olga V. Trineeva, Olga V. Pugacheva 48

Exploring the potential of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) as a valuable medicinal plant: a comprehensive (review)
Safa Bourakba, Anna I. Marakhova, Yaroslav M. Stanishevskiy, Ivan A. Vasilenko, Vera Y. Zhilkina 59

Analysis of *cis*-isomer-enriched dihydroquercetin sample by 1D and 2D NMR spectroscopy
Roman P. Terekhov, Amir Taldaev, Eduard V. Bocharov, Denis I. Pankov, Anastasiya D. Savina, Irina A. Selivanova 68

Ferroptosis inducers – erastin and analogues (review)
Ekaterina V. Sanarova, Anna V. Lantsova, Lyudmila L. Nikolaeva, Nataliia A. Oborotova, Larisa M. Borisova 77

Pharmaceutical Technology

Technology of dry extract from the *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and preliminary assessment of its safety profile
Elena Yu. Avdeeva, Marina G. Skorokhodova, Vladimir V. Sheikin, Tatyana V. Kadyrova, Mikhail V. Belousov 84

Algorithm for the development of a multicomponent pharmaceutical substance of plant origin with antimicrobial action: from science search to dosage form
Viktor A. Filatov, Olesya Yu. Kulyak, Elena I. Kalenikova 94

Analytical Methods

Identification and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in yellow wood anemone (*Anemone ranunculoides* L.) by UHPLC-DAD-HESI/MS analysis
Alexander N. Luferov, Natalia V. Bobkova, Dmitrii O. Bokov, Mikhail N. Rodin, Ekaterina V. Sergunova, Tatiana Yu. Kovaleva, Tamara D. Rendyuk, Angelina V. Strelyaeva, Alla M. Antsyshkina, Tatiana V. Prostodusheva, Svetlana G. Zaichikova, Vera M. Baeva, Irina B. Perova, Konstantin I. Eller, Vladimir V. Bessonov 106

Raster electron microscopy in the analysis of plant raw materials of virgin grapes (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.)
Fedor D. Evsikov, Alevtina A. Gudkova, Alexey I. Slivkin 118

Studying the acids and amino acid composition of horse chestnut flowers
Anna S. Chistyakova, Alexander D. Dunilin, Olga V. Trineeva, Alexei S. Bolgov, Alevtina A. Gudkova, Alexei I. Slivkin 125

Development and validation of the chromatography-mass spectrometry technique for polyprenols quantitative assessment
Nikita S. Popov, Anastasiia A. Antipina, Sergey V. Savintsev, Vadim Y. Balabanyan 133

Analysis of varietal advantages of leaf form *Apium graveolens* L. according to chlorogenic acid content
Elizaveta S. Surbeeva, Ulyana A. Efremova, Valeria S. Shurakova, Evgeniy V. Vishnyakov, Inna I. Terninko 142

Isolation, identification and quantification of flavonoids from the flowers of *Staphylea pinnata* L.
Anna Y. Sokolova, Andrey M. Poluyanov, Alexandr I. Bardakov, Susanna S. Sologova, Natalia V. Bobkova 155

Development and attestation of a standard sample of calcium nadroparin
Anastasia V. Zykova, Sergei V. Krivoshchekov, Denis A. Isakov, Artem M. Guryev, Mikhail V. Belousov 164

Preclinical and clinical study

HPLC-MS/MS method development and validation for the determination of tetradecapeptide in human plasma
Margarita A. Tokareva, Evgeny S. Melnikov, Maria V. Belova, Elizaveta N. Fisher, Tatiana A. Rodina, Igor E. Shohin 171

Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay test-system for bevacizumab concentration determing in biological fluids
Vladimir V. Pisarev, Andrei V. Ivanov 181

Pharmacological screening of a new valproic acid derivative using the pharmacoencephalography method in rats
Yuriy I. Sysoev, Darya D. Shits, Maria M. Puchik, Timur A. Gutiy, Elizaveta V. Fedorova, Veronika A. Prikhodko, Irina A. Titovich, Aleksandra S. Melekhova, Aleksandr Ya. Bespalov, Irina S. Knyazeva, Evgeniy B. Shustov, Sergey V. Okovityi 190

The study of the influence of *Thlaspi arvense* L. on the characteristics of the reproductive system of male rats
Rashit G. Farkhutdinov, Kira A. Pupykina, Lucia A. Sharafutdinova, Albina M. Fedorova, Zuhra R. Hismatullina, Margarita I. Garipova, Ekaterina F. Koroleva, Anna A. Yamaleeva, Tamara D. Rendyuk 208

***In vitro* influence on fibrinolysis parameters of aqueous extracts of mushrooms growing on woody plants**
Natalia M. Faustova, Dmitrii N. Vedernikov, Viacheslav V. Bakanov, Ekaterina N. Pavlova, Elena N. Vlasova, Yurii A. Skorik 217

Development and validation of a high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for quantification of tofacitinib in human plasma
Evgeniya S. Vetrova, Polina K. Karnakova, Natalia S. Bagaeva, Kseniia K. Karnakova, Mariia O. Popova, Anna A. Popova, Olga A. Archakova, Timofey N. Komarov, Igor E. Shohin 233

Regulatory Issues

Outdated latin names of medicinal plants in the monographs of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition (review)
Maria N. Povydysh, Mikhail Yu. Goncharov 245

Редакционная статья / Editorial article

Генеральный директор ООО «ЦФА» Игорь Шохин получил премию «ЛЮДИ ГОДА-2024» в Торгово-промышленной палате РФ

31 мая 2024 года, в шестой раз в Конгресс-Центре ТПП РФ состоялась премия «Russian Business Guide. ЛЮДИ ГОДА». Торжественное мероприятие проводится при поддержке Торгово-промышленной палаты РФ.

General Director of LLC «Center of Pharmaceutical Analytics» Igor Shohin received the PEOPLE OF THE YEAR 2024 award at the Chamber of Commerce and Industry of the Russian Federation

On May 31, 2024, for the sixth time, the "Russian Business Guide. PEOPLE OF THE YEAR" award was held at the Congress Center of the Russian Chamber of Commerce and Industry. The gala event is held with the support of the Chamber of Commerce and Industry of the Russian Federation.

Церемония награждения в ТПП РФ собрала на своей площадке более 50 номинантов. Премию поддерживают большинство иностранных палат и деловых советов, отраслевых объединений бизнеса.

Генеральный директор ООО «ЦФА» **Игорь Шохин** получил премию в номинации *«Медицина: бизнес на защите здоровья»*.

Почетную награду вручил директор ГИЛСиНП Минпромторга РФ **Шестаков Владислав Николаевич**.

Стало традицией, что это масштабное мероприятие всегда привлекает внимание представителей бизнеса и общественности. В церемонии награждения приняли участие представители правительственных структур, послы дружественных государств, руководители отраслевых ассоциаций и региональных ТПП, торговые представители, эксперты и общественные деятели.

Памятными статуэтками и дипломами Russian Business Guide традиционно наградили лучших представителей отраслей и регионы, ведущие эффективную и плодотворную деятельность в области экспорта и привлечения инвестиций.

Редакционная коллегия и редакция журнала поздравляет Игоря Евгеньевича со столь значимой наградой, отражающей его вклад в развитие наукоемкой части фармацевтической отрасли России, и желает успехов в дальнейших свершениях!

Редакционная статья / Editorial article

Интервью в рамках цикла «Мнение лидеров»

Представляем вашему вниманию новое интервью в рамках цикла «Мнение лидеров». Вторым гостем цикла стал руководитель медицинского департамента ГЕРОФАРМ Игорь Евгеньевич Макаренко.

Interview as Part of the "Leadership Opinion" Series

We present to your attention a new interview as part of the Leaders' Opinion series. The second guest of the series was the head of the medical department of GEROPHARM Igor E. Makarenko.

В рамках проекта «Мнение Лидеров» вышло наше второе интервью с Макаренко Игорем Евгеньевичем. Игорь Евгеньевич является руководителем медицинского департамента ГЕРОФАРМ. В роли интервьюера выступила Кульджанова Наталья Вячеславовна, директор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Спикеры обсудили российский фармацевтический рынок и самочувствие российских компаний в рамках санкционного режима. Как российские фармацевтические компании относятся к уходу некоторых западных игроков рынка, читайте в нашем новом интервью.

Наталья Вячеславовна: ***Мы все знаем, что введенные санкции, уход с российского рынка некоторых западных фармацевтических компаний, безусловно, сказался на деятельности российских компаний. С какими сложностями столкнулся медицинский департамент ГЕРОФАРМ во время санкционного режима?***

Игорь Евгеньевич: Это очень интересный вопрос. Вопрос очень откликается эмоционально в душе. Как руководитель медицинского департамента, отвечу на вопрос в контексте проведения клинических исследований, не только клинических операций, но и планирования, связи с лабораториями. Во время санкционного режима, безусловно, у нас были опасения из-за прерванной логистики, проблем с реактивами для проведения наших исследований. Как показывает практика, мы, как ГЕРОФАРМ в целом, и как российская фармацевтическая отрасль, неплохо преодолеваем вызовы. Недавно на конференции мы говорили о проблемах с реагентикой. При помощи наших партнеров проблему решили переориентированием на другие рынки. Часть реагентов мы покупаем не только в Европе, но и в Китае. Да, мы также видим, что многие западные компании перестают работать с Российской Федерацией. Интересный момент, когда мы общаемся с врачами в неформальной обстановке, мы слышим очень много разных историй от них. В том числе, что западные компании перестают работать с клиническими исследованиями не совсем тактичным образом. Они уходят во время проведения исследования, когда пациенты уже включены в исследование, когда им нужен препарат, но по определённым принятым решениям этих пациентов исключают из исследования, что является не этично. Уточню, что это касается не всех западных компании, но есть такие кейсы. Если коротко ответить на Ваш вопрос: да, есть некоторые изменения. Они касаются всего, но мы выравниваем эту ситуацию.

Кульджанова Наталья Вячеславовна
Директор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Наталья Вячеславовна: ***Спасибо за Ваш интересный рассказ. Скажите, в какое направление компания ГЕРОФАРМ сделала большой упор во время санкций? Изменилось ли направление развития компании в связи с текущими реалиями?***

Игорь Евгеньевич: Компания ГЕРОФАРМ, как социально ответственная компания, в основном занимается социально значимыми нозологиями. Одно из самых сильных направлений – эндокринология. Во время санкций нозологию не меняли, направление тоже не меняли. Мы активно смотрим за препаратами, которые стоят под угрозой ухода с российского рынка. Мы страхуем наших пациентов, обеспечивая бесперебойную поставку таких препаратов. Например, когда датская компания Novo Nordisk сообщила, что их препарат Оземпик уходит с российского рынка, мы были первой компанией, которая оперативно провела полный цикл исследований и регистрации препарата. По итогу наши пациенты имеют доступ к этому препарату несмотря на то, что оригинатор принял решение уйти из Российской Федерации. Это наш пример, которым мы гордимся.

Наталья Вячеславовна: ***Продолжая тему Семавика, скажите, за счет чего получилось так быстро вывести препарат на рынок? Я знаю, что были некоторые дискуссии на эту тему.***

Игорь Евгеньевич: Семавик был выведен так быстро на рынок, потому что все возможные процессы были максимально сокращены и оптимизированы, а какие-то проводились именно в ручном режиме. Если говорить про клинические исследования, то есть

определённый устоявшийся формат проведения. Как это происходит: сначала пишется пакет документов для проведения клинического исследования, потом подается в Минздрав РФ, заявку рассматривают, далее Минздрав и Совет по этике выдают разрешение. Разрешение первоначально выдается в электронном виде на сайте, спустя 1,5–2 недели разрешение выдается в печатном виде. С этого документа снимается скан, далее скан прикрепляется к договорам, которые отправляются в клинические центры и так далее. Очень много бумажной волокиты. В данном случае мы оптимизировали процессы. Все договора заключали заранее. У медицинского сообщества, которое принимает участие в клиническом исследовании, есть определенная настороженность, поскольку очень многие заключают договор после РКИ. Мы не нарушаем закон, если заключаем договор до РКИ. В данном случае мы провели заключение договоров, получили заключение этических экспертиз заранее. Этические экспертизы являются независимыми по GCP. Согласно №79 Решению ЕЭК это также абсолютно в правовом поле. Ряд активностей, которые занимают огромное время, мы провели до РКИ. Это один из примеров, как мы смогли оптимизировать наши процессы, чтобы ускорить выведение данного препарата на рынок.

Наталья Вячеславовна: ***Мы все является представителями пациентского сообщества. Нас волнует вопрос доступа к современной терапии в связи с текущей ситуацией на рынке. Хотелось бы услышать Ваше мнение, как компетентного специалиста именно с позиции компании ГЕРОФАРМ.***

Игорь Евгеньевич: Я бы разделил современный препарат на два момента. Первое – препараты, которые уже есть на российском рынке. Второе – современные препараты, которые буду появляться в будущем на рынке. Первый момент – это защита наших пациентов от таких ситуаций, что препарат, который необходим пациентам, вдруг уходит из России. Многие российские фармацевтические компании над этим работают. Мы делаем биосимиляры по тем препаратам, которые потенциально могут уйти с российского рынка, чтобы защитить наших пациентов. Согласитесь, это, мягко говоря, неприятная, а в ряде случаев даже жизнеугрожающая ситуация для пациентов. Мы, как фармацевтический рынок, предохраняемся, обеспечиваем бесперебойное наличие таких препаратов. Второй момент – это именно создание новых препаратов. До 2010 года в России не было даже дженериков. Буквально спустя 10 лет после появления № 61-ФЗ мы научились очень хорошо делать дженерики, биосимиляры. Сейчас мы, как фарма в целом, идем к тому, что учимся делать очень хорошо оригинальные препараты. Компании, имеющие наибольший опыт в этом, как BIOCAD, Генериум, ГЕРОФАРМ продолжают выпускать оригинальные препараты. В этом плане мы можем быть спокойны, что наши пациенты будут получать качественное лечение не только сейчас, но и в будущем.

Наталья Вячеславовна: Спасибо, Игорь Евгеньевич. Это внушает надежду. Как Вы оцениваете уход некоторых западных компаний? С Вашей точки зрения это плюс или минус? Мы понимаем, что подобное может происходить и в дальнейшем. Какое Ваше мнение на этот счет?

Игорь Евгеньевич: Здесь есть свои плюсы и свои минусы. Одна сторона, как мы с Вами проговорили по поводу тех препаратов, которые необходимы нашим пациентам. Безусловно, уход западных фармацевтических компаний мог бы быть большим минусом для пациентов, если бы наши отечественные фармацевтические компании не были в состоянии данный уход скорректировать выпуском своих дженериков и биосимиляров. Многие не воспринимали серьезно заявление о том, что мы должны обеспечить лекарственную безопасность Российской Федерации в целом. Сейчас мы видим, что и пациенты, и врачи рады присутствию таких компаний, как ГЕРОФАРМ, которые могут обеспечить лекарственную безопасность страны. Условно, если наши коллеги совсем нас покинут, то наши пациенты не останутся без качественных лекарств. Поэтому здесь есть свои плюсы и свои минусы. Для российской фармы все-таки есть свои плюсы. Наши врачи видят, что бывает абсолютно разная западная фарма. Ранее были такие нарративы – есть русская фарма и «они все плохо работают» (до 2010 года), есть западная фарма и «они все очень хорошо работают». Сейчас мы видим, как эти нарративы меняются. Врачи понимают, что есть разные компании вне зависимости российская или западная компания. Кто-то ответственно подходит к пациентам, к своей работе, а кто-то абсолютно нет. Изменение этого в сознании, изменение взглядов, на мой взгляд, позитивно отразится на всем нашем обществе в вообразимом будущем.

Наталья Вячеславовна: ***Хочется сказать Вам огромное спасибо за заботу о нас, как о пациентах, за то, что Вы есть, за Ваш ответственный подход к тому, что Вы делаете. Это достойно уважения. В качестве напутствия Вы хотели бы что-то пожелать Вашим коллегам?***

Игорь Евгеньевич: С коллегам по цеху мы активно общаемся на конференциях, в том числе тех, которые вы проводите, обсуждаем сложившуюся ситуацию и другие рабочие моменты. Мы видим, что российский фармацевтический рынок очень активно растет и развивается. До № 61-ФЗ у нас в РФ не было людей, которые проводят физически исследования. Сейчас же мы видим, что на рынке появляются даже медицинские советники. Это люди, которые планируют исследования, и они у нас есть в большом количестве. Они переходят из компании в компанию, тем самым формируется опыт, экспертиза по планированию, оценке результатов клинических исследований. Это, действительно, очень интересно. Некоторое время назад оценкой клинических исследований в РФ мало кто мог экспертно заниматься. Мы могли верить только отчетам от коллег. Как показывает опыт, за пределами России могут быть зарегистрированы препараты ненадлежащего качества. Если бы мы внутри страны не имели экспертизу, то могли бы зарегистрировать у себя и продавать нашим пациентам препарат ненадлежащего качества. Но сейчас я лично вижу, что экспертная оценка результатов в клинике очень сильно выросла и продолжает расти. Это очень здорово. Мы растем, развиваемся в этом направлении.

Посмотреть интервью можно на нашем YouTube-канале.

Мнение Лидеров®

Редакционная статья / Editorial article

УДК 615.11

Аптекарский приказ – зарождение и становление. Часть 1

К. С. Гузев✉

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

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

Резюме

В первой части работы представлены известные, ставшие хрестоматийными, а также новые, установленные в последнее время факты об истории возникновения и становления Аптекарского приказа как структуры государственного управления отечественной медициной. Отмечены ученые – историки медицины, внесшие особый вклад в изучение истории российской фармации и Аптекарского приказа, в частности. Указана особая роль В. Рихтера, Н. Е. Мамонова и Н. Я. Новомбергского в поиске, исследовании, подготовке к печати документов Аптекарского приказа. Несмотря на более чем 200-летнее изучение корпуса документов Приказа, споры о времени его организации продолжаются до настоящего времени. До сих пор обсуждаются структура и функции этой организации в общей структуре Московского государства.

The apothecary prikaz – the origin and formation. Part 1

Konstantin S. Guzev✉

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

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

Abstract

The paper presents well-known iconical, as well as new, recently discovered facts about the history of the creation and formation of the Apothecary prikaz as a structure of Russian state administration of medicine. This paper makes references to the scientists-historians of medicine who have made a special contribution to the study of the history of Russian pharmacy and the Apothecary prikaz. In particular the special role of V. Richter, N. E. Mamonov and N. Ya. Novombergsky in search, research, and preparing for publishing documents of the Apothecary prikaz is noted. Despite more than 200 years of studying of Apothecary prikaz's documents, many disputes about the time of its setting up continue to the present day. The structure and functions of this organization in common structure of the Moscow state are still being discussed.

ВВЕДЕНИЕ

Аптекарский приказ представлял собой структурную единицу системы центрального управления Русского государства на протяжении XVI–XVII вв. Он выполнял ряд особых функций, не свойственных другим ведомствам, в частности функцию организации сложной системы государственного управления медициной, включая аптечное дело. С Аптекарским приказом неразрывно связана история фармацевтического дела в России. За более чем 200 лет своего существования Аптекарский приказ накопил огромный опыт, который передал Медицинской коллегии, образованной по указу Петра I.

Время начала работы Аптекарского приказа представляется довольно неопределенным и спорным. Связано это с отсутствием архивных документов, описывающих его зарождение и становление. Большинство исследователей считают, что Аптекарский приказ возник для «чисто личной государевой надобности». На начальном этапе, когда врачебное дело исполнялось одним или двумя докторами, здоровье государя контролировалось ближним боярином, и поначалу наблюдение заключалось в выполнении личных поручений государя. Когда же появляется большое количество врачей, лекарей и аптекарей, возникает необходимость появления руководителя медицинской части. Чем больше медицинского персонала, тем сложнее порядок отношений, ведущий к нормальному приказному делопроизводству. Во главу новой канцелярии, как и ранее, ставят наиболее надежного боярина, рядом с которым всем врачебным персоналом ведают приказные служители – дьяки и подьячие. То есть с последовательным усложнением дел появляется несколько исполнителей, а затем и управляющих.

Изучению истории возникновения и периодов становления Аптекарского приказа посвятило свои труды множество отечественных ученых – историков медицины. В таблице 1 представлены признанные корифеи, внесшие особый вклад в изучение истории российской медицины.

Как видно из таблицы 1, активное изучение документов Аптекарского приказа началось с 1814 г. и продолжается до сегодняшнего дня. Среди исследователей Аптекарского приказа особо следует отметить три фамилии: Вильгельм Михайлович Рихтер (1767–1822), Николай Евграфович Мамонов (1829–1888) и Николай Яковлевич Новомбергский (1871–1949). Заслуга этих ученых состоит в том, что, работая в архивах, они смогли обнаружить подлинные исторические документы, относящиеся к функционированию Аптекарского приказа, расшифровать их, расположить в хронологическом порядке и опубликовать в многотомных изданиях, которыми до сих пор пользуются историки медицины.

Вильгельм Михайлович Рихтер первым начал изучать лежавшие без употребления оригинальные документы по истории отечественной медицины, включая источники, касающиеся деятельности Аптекарского приказа. Эти документы были обнаружены им в Московском главном архиве Министерства иностранных дел (Посольский приказ), Медицинской конторе, писцовых монастырских книгах, а также летописях, печатных указах и извлечениях из сочинений иностранных путешественников о России. В. М. Рихтер впервые опубликовал документы, датируемые 1581–1642 гг., в том числе жалованные грамоты, указы, письма титулованных особ (датского короля Фридриха III, императора Священной Римской им-

Таблица 1. Отечественные историки, разрабатывавшие тему Аптекарского приказа

Table 1. Domestic historians who developed the topic of the Pharmacy Order

№ п/п No.	ФИО исследователя Full name of the researcher	Название работы Job title	Место и год издания Place and year of publication
1	В. М. Рихтер V. M. Rikhter	История медицины в России History of medicine in Russia	СПб., 1814 St. Petersburg, 1814
2	В. Н. Берх V. N. Berkh	Царствование царя Михаила Федоровича и взгляд на междуцарствие The reign of Tsar Mikhail Fedorovich and a look at the interregnum	СПб., 1832 St. Petersburg, 1832
3	К. А. Неволин K. A. Nevolin	Образование управления в России от Иоанна III до Петра Великого Management education in Russia from Ioanna III to Peter the Great	СПб., 1844 St. Petersburg, 1844
4	Н. Е. Мамонов N. E. Mamonov	Материалы по истории медицины в России. Вып. 1–3 и др. Materials on the history of medicine in Russia. Vol. 1–3, etc.	СПб., 1881–1883 St. Petersburg, 1881–1883
5	Я. А. Чистович Ya. A. Chistovich	История первых медицинских школ в России History of the first medical schools in Russia	СПб., 1883 St. Petersburg, 1883
6	В. Х. Эккерман V. Kh. Ekkerman	Материалы по истории медицины в России (История эпидемий X–XIII вв.) Materials on the history of medicine in Russia (History of epidemics in the X–XIII centuries)	Казань, 1884 Kazan, 1884
7	Ф. Л. Герман F. L. German	Врачебный быт допетровской Руси Medical life in pre-Petrine Rus'	Харьков, 1891 Kharkov, 1891
8	Л. Ф. Змеев L. F. Zmeev	Чтения по врачебной истории России Readings on the medical history of Russia	СПб., 1896 St. Petersburg, 1896
9	Д. В. Цветаев D. V. Tsvetaev	Медики в Московской России и первый русский доктор Doctors in Moscow Russia and the first Russian doctor	Варшава, 1896 Warsaw, 1896
10	Н. П. Лихачев N. P. Likhachev	Палеографическое значение бумажных водяных знаков Paleographic significance of paper watermarks	СПб., 1899 St. Petersburg, 1899
11	М. К. Соколовский M. K. Sokolovsky	Характер и значение деятельности Аптекарского приказа The nature and significance of the activities of the Pharmacy Order	СПб., 1904 St. Petersburg, 1904
12	М. Ю. Лахтин M. Yu. Lakhtin	Медицина и врачи в Московском государстве и др. Medicine and doctors in the Moscow state, etc.	М., 1906 Moscow, 1906
13	Н. Я. Новомбергский N. Ya. Novombergsky	Врачебное строение в допетровской Руси Medical building in pre-Petrine Rus'	Томск, 1907 Tomsk, 1907
14	Д. М. Российский D. M. Rossiysky	Первый русский доктор медицины и др. The first Russian doctor of medicine, etc.	1951
15	Г. В. Жаринов G. V. Zharinov	Записи о расходе лекарственных средств Drug consumption records	1994
16	М. Б. Мирский M. B. Mirsky	Медицина в России X–XX веков Medicine in Russia of the X–XX centuries	М., 2005 Moscow, 2005
17	Е. А. Савельев E. A. Savelev	Каталог книг из собрания Аптекарского приказа Catalog of books from the collection of the Pharmacy Order	СПб., 2006 St. Petersburg, 2006

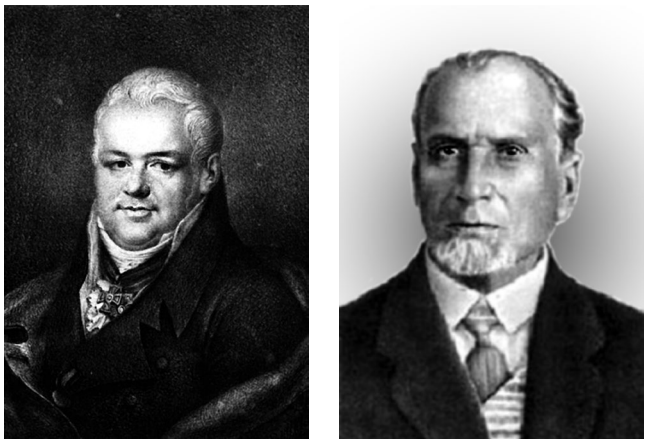
перии Леопольда I, английской королевы Елизаветы I, английского короля Карла I) к российским царям, императорам и императрицам (Алексею Михайловичу, Петру I, Екатерине I, Елизавете Петровне), патенты и рецепты – всего более 200 документов.

Николай Евграфович Мамонов способствовал публикации самого большого массива документов. В предисловии к первому тому его «Материалов по истории медицины в России», изданных Медицинским департаментом Министерства внутренних дел, написано, что «...*под руководством Н. Е. Мамонова были скрупулезно разобраны, приведены в хронологический порядок и подготовлены к печати подлинные столбцы, книги и другие старинные документы Аптекарского приказа, хранившиеся в архиве Министерства внутренних дел. Эти неизвестные до 1880 года документы содержали в себе сведения о докторах, лекарях, аптекарях, о лекарствах, выписываемых из чужих краев, о лекарственных травах, собираемых в России, о врачебной помощи во время войн и вообще о всем круге тогдашней деятельности первого центрального управления медицинской частью в России*»[1]. В четырех томах его «Материалов…» впервые были опубликованы тексты 1679 оригинальных исторических документов.

> О непростой судьбе этой публикации мы узнали из диссертации К. С. Худина. Оказывается, в подборе, разборе, расшифровке и описании этих документов большое участие принял Людвиг Рудольфович Ретлингер. После подготовки документов он «в течение пяти лет тщетно хлопотал о напечатании их», пока в 1881–1885 гг. эти документы не напечатал Медицинский департамент Министерства внутренних дел по ходатайству своего вице-директора Н. Е. Мамонова. И что примечательно, о роли Л. Р. Ретлингера в этой работе текст предисловия умалчивает[2]. Несмотря на этот факт, опубликованные документы пользуются большим спросом у любителей истории медицины и с момента их выхода из печати весьма востребованы.

Николай Яковлевич Новомбергский продолжил работу предшественников. Неизвестные документы, касающиеся работы Аптекарского приказа, обнаруженные им в архивах Министерства императорского двора, Министерства юстиции, Министерства иностранных дел, а также в архиве Оружейной палаты в количестве 787 единиц, изданы им в четырех томах, состоящих в сумме из 2076 страниц. За этот труд Николай Яковлевич был удостоен полной большой премии графа А. С. Уварова.

На рисунке 1, представляя портреты В. М. Рихтера и Н. М. Новомбергского, с досадой отмечаем, что портрета Н. Е Мамонова нам обнаружить не удалось.



Рихтер Вильгельм Михайлович (1767–1822)

Новомбергский Николай Яковлевич (1871–1949)

Рисунок 1. Исследователи Аптекарского приказа

Figure 1. Researchers of the Pharmacy Order

Необходимо сказать, что изучение деятельности Аптекарского приказа продолжается до настоящего времени: появляются новые документы, на основании которых делаются неожиданные выводы и выдвигаются смелые предположения. Из наиболее интересных работ середины XX в., касающихся деятельности Аптекарского приказа, можно отметить диссертации на соискание ученой степени кандидата исторических наук В. В. Томашевского («Аптекарский приказ в XVII веке», Л., 1952), М. Г. Королёвой («История аптек города Москвы (до 1917 г.)», М., 1955), а из последних работ, защищенных в XXI в., – труды филолога О. Г. Олехнович («Медицинская терминология в «Делах Аптекарского Приказа» XVII в.», М., 2000), историков Н. Н. Коротеевой («Становление и развитие аптечной службы в России в XVI – начале XX вв.», Курск, 2011) и К. С. Худина («Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник», М., 2021), а также труды М. Б. Мирского («Медицина в России X–XX веков: очерки истории», М., 2005), О. Г. Печниковой («Создание и функционирование Аптекарского приказа», 2013) и др. Однако в профессиональной печати фармацевтического сообщества об этом нет ни строчки.

Поэтому целью этой работы является донесение до специалистов, интересующихся историей отечественной фармации, известных, ставших хрестоматийными сведений об Аптекарском приказе, а также новых, установленных в последнее время фактов, касающихся деятельности этого учреждения.

[1] Мамонов Н. Е. Материалы для истории медицины в России. Вып. 1. Санкт-Петербург; 1881. С. 4.

[2] Худин К. С. Документы аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. 2021. С. 52. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/dissertation_pdfs/000/000/039/original/5ea675ae2d3360e948e599716479b7aa279a0423.pdf?1614584656. Ссылка активна на 27.02.2024.

Время возникновения Аптекарского приказа

Прежде чем обсудить время возникновения Аптекарского приказа, следует пояснить причину возникновения приказов как государственных учреждений. По мнению Н. Я. Новомбергского «приказы возникли по большей части случайно. Не в значении коллегиальных присутственных мест, но просто по началу личных поручений царя того или другого рода дел заведыванию какому-либо боярину или окольничему. С течением времени, с последовательным усложнением дела, там, где раньше ведал «один человек, мы видим несколько товарищей, из которых один назначается для организации взаимодействия, другой – для совета, третий – для контроля» и т. д. Только таким путем создается приказ-учреждение»[1]. Таким образом, появление приказа – это процесс динамический, связанный не только с его возникновением, но и с расширением его деятельности, установлением отношений с другими приказами, а также связей с иностранными государствами.

О времени появления Аптекарского приказа специалисты спорят уже более 200 лет. В монографии Н. Я. Новомбергского «Врачебное строение в допетровской Руси» представлены наиболее вероятные, с точки зрения историков медицины, даты начала функционирования Аптекарского приказа. Так, В. М. Рихтер утверждает, что Аптекарский приказ существовал прежде 1607 г., профессор М. Я. Владимирский-Буданов считает, что он возник около 1620 г. К этому же времени относят зарождение Аптекарского приказа В. Н. Берх и К. А. Неволин. По мнению М. К. Соколовского, временем организации Приказа следует считать 1613–1645 гг.[2] Л. Ф. Змеев относит время учреждения Аптекарского приказа к 1627 г., обосновывая это тем, что первые документы (столбцы) Аптекарского приказа, обнаруженные им в Московском главном архиве Министерства иностранных дел, начинаются с 9 августа этого года. В документах 1628 г. имеется упоминание о переводчике Аптекарского приказа Захарьеве, который был послан в Англию. От 30-х годов XVII в. сохранились уже многочисленные материалы, обрисовывающие приказную организацию врачебно-аптечного дела в допетровской Руси[3].

В работе К. С. Худина представлены и другие точки зрения на время возникновения Аптекарского приказа. Так, к датам, перечисленным ранее, добавлено предположение о том, что Приказ мог появиться в первой половине XVII в., после эпохи Смутного времени и воцарения династии Романовых в 1613 г. Это предположение основывается на факте слабого здоровья первого царя из этой династии – Михаила Федоровича. В 1888 г. Н. П. Лихачев обнаружил запись об Аптекарском приказе в списке с приправочных книг Холмецкого стана Вяземского уезда с 1594 по 1595 год. В нем имеется запись: «*в преж того было за Дмитрием за Михайловым сыном Быкова, а осталось за мерою Обтекарскаго Приказу у подьячем Никифоре Гаврилове*». Наличие подьячего в приказе свидетельствует о наличии настоящей канцелярии, существовавшей уже при Федоре Ивановиче Годунове (отце царя Бориса Годунова). А. П. Павлов, Д. В. Лисейцев и Н. В. Рыбалко связывают время появления Аптекарского приказа со временем правления последнего из Рюриковичей – царя Федора Иоанновича (1584–1598), объясняя это тем, что он, так же как и первый Романов, не отличался хорошим здоровьем[4].

Важное значение для определения времени возникновения этой структуры имеет работа Г. В. Жаринова, опубликованная в 1992 г. В ней автор обратил внимание на упоминание «Оптекарской избы» в опубликованной еще в XIX в. «Описи домашнему имуществу царя Ивана Васильевича». Этот перечень был подготовлен в 1584 г. на основании описей Казенного двора 1582/1583–1584 гг., и в нем среди прочего имущества упоминается «третий травник в Оптекарской избе Ивановской Михайлова». Жаринов трактует эту запись так, что Аптекарская изба находилась в ведении дьяка Ивана Михайлова, который упоминается в источниках с 1571/1572 годов[5].

Издавна повелось, что за здоровьем великих князей и царей наблюдали специально назначенные люди. Так, при Василии III (1462–1505) за лечением больного князя наблюдал боярин Михаил Юрьевич Глинский. Он ведал медицинским персоналом, а также апробировал методы и средства, употребляемые медиками. За весьма многочисленным медицинским штатом Ивана Грозного (1547–1584) присматривал князь Афанасий Вяземский, а в конце царствования царской аптекой и врачами ведал любимец и фаворит царя Богдан (Андрей) Яковлевич Бельский. Под его присмотром находились 6 иностранных врачей, их помощники и аптекарь. Ответственный боярин следил за выплатой врачам, лекарям и аптекарям «государева жалования», наблюдал за их поведением и контролировал выполнение ими своих обязанностей. Кроме того, дополнительно в его компетенцию входило приглашение новых иностранных врачей и аптекарей, урегулирование с ними различных хозяйственных вопросов, пополнение запасов царской аптеки и т. п. Эти охранители царского здоровья занимали довольно высокое положение

[1] Новомбергский Н. Врачебное строение в допетровской Руси. Томск; 1907. С. 74.

[2] Соколовский М. К. Характер и значение деятельности Аптекарского приказа. Санкт-Петербург; 1904. 32 с.

[3] Там же. С. 73.

[4] Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. М.; 2021. 280 с. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/dissertation_pdfs/000/000/039/original/5ea675ae2d3360e948e599716479b7aa279a0423.pdf?1614584656. Ссылка активна на 27.02.2024.

[5] Жаринов Г. В. О происхождении так называемой «Описи домашнему имуществу царя Ивана Васильевича...». Архив русской истории. Вып. 2. М.: Археографический центр; 1992. С. 179–184.

среди представителей русской знати. Так, по свидетельству Жака Маржерета (Jacques Margeret), капитана немецкой роты при Борисе Годунове (1600–1601 гг.), «*важнейшее в России достоинство есть сан конюшенного боярина, за ним следует аптекарский боярин, главный начальник медиков и аптекарей*». Один боярин, даже с особыми полномочиями, не мог уследить за всем. Это привело к тому, что в помощь аптекарскому боярину были назначены помощники – два или несколько подьячих. Появление такой системы придворной медицинской организации и можно считать рождением Аптекарского приказа. Этот Приказ как одно из отделений Приказа Большого дворца как бы выделился из Большого приказа, подобно Конюшенному, Сытенному, Кормовому, Хлебному и другим приказам, оставаясь в течение нескольких десятков лет в полной зависимости от него[1, 2].

На основании исторических фактов становится понятно, что Аптекарский приказ мог быть организован до 1580 г., то есть во времена правления Ивана IV. Упоминание об «Оптекарской избе» свидетельствует о формировании в структуре государственной власти России прообраза Аптекарского приказа. Эта новая организация из «Избы» трансформировалась в «Двор», а затем и в «Приказ». О ее государственной значимости свидетельствует тот факт, что ею руководил дьяк (от греч. διάκονος, *diakonos* – начальник (служитель) органа управления (приказа) или младший чин в Боярской думе Русского царства XVI – начала XVIII столетий).

Основываясь на данных, обнаруженных в работе К. С. Худина, мы представили историю развития учреждения, руководящего аптекарской службой России, по дате первого упоминания.

Примерные годы реорганизации Аптекарского приказа:

Аптекарская изба (двор) – 1581 г.
Аптекарская палата – 1613 г.
Аптекарский приказ – 1615 г.
Аптекарская канцелярия – 1707 г.
Медицинская коллегия – 1721 г.[3]
Медицинская канцелярия – 1803 г.

Примечание. В 1712 г. Аптекарский приказ переводят в Петербург.

Таким образом, за более чем 220 лет функционирования царской аптечной службы название ее руководящего органа изменилось от Избы и Двора до Палаты, а от Палаты до Приказа и Коллегии, и в конечном итоге трансформировалось в Медицинскую канцелярию.

[1] Томашевский В. В. Аптекарский приказ в XVII веке. Дис. ... канд. ист. наук. Л.; 1952. 347 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/aptekarskii-prikaz-v-xyii-veke. Ссылка активна на 27.02.2024.

[2] Новомбергский Н. Я. Врачебное строение в допетровской Руси. Томск; 1907. С. 75.

[3] Полное собрание законов Российской Империи. Т. 6. № 3811. С. 412.

Рекламная статья / Sponsored article

Лабконцепт

ИК-Фурье спектрометры серии i-Red 7800 марки SILab для контроля качества на фармацевтических предприятиях

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке ООО «Лабконцепт»

Использование ИК-спектроскопии в контроле качества лекарственных средств регламентировано Государственной Фармакопеей РФ, Фармакопеей США и Европейской Фармакопеей. ГК «Лабконцепт» – ведущий поставщик и производитель аналитического и общелабораторного оборудования предлагает ИК-Фурье спектрометры серии i-Red 7800 под собственным брендом SILab. ИК-фурье спектрометры серии i-Red 7800 поставляются с широким набором дополнительных принадлежностей – кюветами для жидких, газообразных проб, приставками НПВО и МНПВО, приставкой диффузного отражения, пресс-формой для изготовления таблеток, держателем твердых образцов и пленок, ИК-микроскопом и др., позволяющих решать любые задачи по идентификации, оценке качества фармацевтической субстанции, проведению количественного анализа.

IR spectrometer i-Red 7800 series «SILab» for quality control in pharmaceutical plants

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

The use of IR spectroscopy in the quality control of medicines is regulated by the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, the Pharmacopoeia of the USA and the European Pharmacopoeia. Labconcept Group, a leading supplier and manufacturer of analytical and general laboratory equipment, offers IR spectrometers i-Red 7800 series under its own brand SILab. The IR spectrometers of the i-Red 7800 series are supplied with a wide range of additional accessories allowing to solve any identification and quality assessment tasks pharmaceutical substance, quantitative analysis.

Современные нормативные документы по анализу фармацевтических препаратов предполагают широкое использование метода Инфракрасной спектроскопии в испытаниях на подлинность. Использование ИК-спектроскопии в контроле качества лекарственных средств регламентировано Государственной Фармакопеей РФ, Фармакопеей США и Европейской Фармакопеей.

Инфракрасные спектры (колебательные спектры) возникают при переходах между дискретными энергетическими состояниями колеблющихся молекул, которые сопровождаются изменением дипольных моментов, и представляют собой зависимость пропускания или поглощения от длины волны (λ). Под инфракрасной областью спектра подразумевают электромагнитное излучение в области длин волн от 0,78 до 400 мкм. В ИК-спектроскопии чаще используют не длину волны (λ, мкм), а волновое число ($\bar{\nu}$, $см^{-1}$), которое связано соотношением:

$$\bar{\nu} = 10^4/\lambda.$$

Область от 12 800 до 4000 $см^{-1}$ рассматривается как ближняя ИК-область, область от 4000 до 400 $см^{-1}$ относится к средней ИК-области спектра и область от 400 до 25 $см^{-1}$ относится к дальней ИК-области.

Для установления структуры новых биологически активных веществ, изучения строения метаболитов, идентификации фармацевтических субстанций наиболее часто используется средняя ИК-область спектра (4000 – 400 $см^{-1}$), включающая «область отпечатков пальцев» (~1500–650 $см^{-1}$) и позволяющая проводить качественный, количественный анализ и определять микроколичества примесей. Регистрация спектров в ИК-спектроскопии осуществляется преимущественно двумя способами: регистрацией спектров поглощения/пропускания и регистрацией спектров на отражение.

Жидкие образцы или образцы в виде суспензии (твердый образец, перетертый в небольшом количестве вазелинового масла или другой подходящей жидкости) снимают на поглощение/пропускание в разборных кюветах или в кюветах с фиксированной длиной оптического пути. Аналогичный способ регистрации спектров используется для измерения твердых образцов в виде спрессованного диска диаметром 13 мм (исследуемое вещество перетирают с галогенидом щелочного металла, обычно, бромидом калия).

Метод нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) представляет собой пример регистрации спектров на отражение. Основным преимущест-

вом данного метода являются скорость, легкость проведения измерения, отсутствие пробоподготовки и универсальность. С помощью приставки НПВО можно снимать ИК-спектры жидких и твердых образцов. Образец просто помещают на поверхность кристалла, что позволяет исключить искажение спектра исследуемого образца в результате его смешения, например, с бромидом калия или вазелиновым маслом, его растворения или наличия примесей в них, либо возможного изменения исследуемой пробы в процессе пробоподготовки. Метод диффузного отражения в средней ИК-области также нашел применение в анализе лекарственных средств. Данный метод используется только для регистрации спектров твердых образцов и требует тщательной подготовки пробы к измерению, поскольку спектр отражения веществ существенно зависит от степени однородности частиц.

Для исследования газообразных веществ в лекарственных препаратах применяется совмещенный анализ методами термогравиметрии и инфракрасной спектроскопии. Все перечисленные способы регистрации спектров в средней ИК-области широко применяются в контроле качества субстанций и лекарственных форм.

ГК «Лабконцепт» – ведущий поставщик и производитель аналитического и общелабораторного оборудования предлагает ИК-Фурье спектрометры серии i-Red 7800, выпускаемые в Китае под собственным брендом SILab. Наличие собственной лаборатории позволяет нашей компании в тесном сотрудничестве с производителем не только русифицировать программное обеспечение, но и вносить в него доработки, а также модифицировать сам прибор. В частности, применив наш многолетний опыт работы с ведущим японским производителем аналитического оборудования, компанией Shimadzu, нам удалось добиться увеличения соотношения сигнал/шум в стандартном исполнении ИК-Фурье спектрометров практически в два раза, например для моделей, оснащенных $LiTaO_3$-детектором с 20000:1 до 30000:1. Монополистами по производству более чувствительных детекторов DLAGTS являются европейские страны, но на настоящий момент поставки приборов в такой комплектации затруднены, поэтому ООО «Лабконцепт» делает ставку в этом аспекте на научно-технический потенциал российского производителя. В частности, на текущий момент прорабатывается возможность организации мелкосерийного производства DLAGTS-детекторов на базе разработок российских ученых при производственно-техническом участии ГК «Лабконцепт».

Вся продукция под маркой SILab до отгрузки конечному потребителю проходит тестирование в собственном отделе технического контроля на соответствие метрологическим и спецификационным критериям. Серия i-Red 7800 предназначена для работы в средней инфракрасной области спектра и представлена четырьмя моделями – i-Red 7800, i-Red 7800-L, i-Red 7800u, i-Red 7800u-L.

ИК-Фурье спектрометры серии i-Red 7800 состоят из следующих модулей: источника ИК-излучения, интерферометра, кюветного отделения для анализируемых проб, детектора и управляющей электроники (рисунок 1). При этом, каждый из модулей можно заменять независимо, к примеру, замена де-

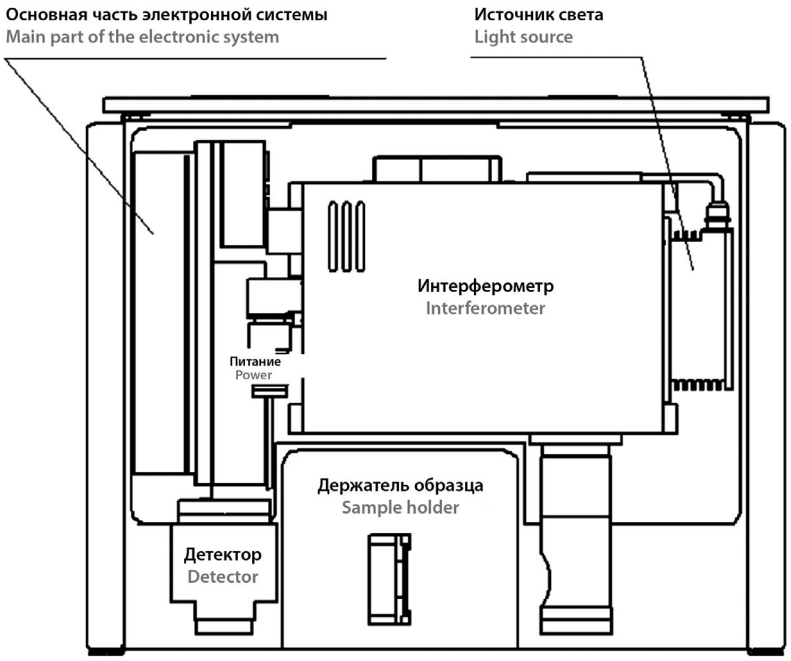


Рисунок 1. Общий вид ИК-Фурье спектрометров серии i-Red 7800 марки SILab

Figure 1. IR spectrometer i-Red 7800 series, SILab

тектора с $LiTaO_3$ на DLAGTS позволяет использовать спектрометр для более требовательных анализов, а возможность расширения функционала прибора за счет добавления ИК-микроскопа позволяет изучать дефекты, инкорпорированные частицы и другого рода загрязнения в готовых лекарственных формах.

В ИК-Фурье спектрометрах серии i-Red 7800 используется кубический угловой интерферометр Майкельсона, в котором вместо плоских зеркал, используемых в традиционном интерферометре Майкельсона, используются девяностоградусные кубические угловые зеркала (рисунок 2), что уменьшает влияние внешних факторов и повышает стабильность интерференции. Данный тип интерферометра обладает теми же преимуществами, что и традиционный интерферометр Майкельсона: малым объемом, компактной структурой и т. д.

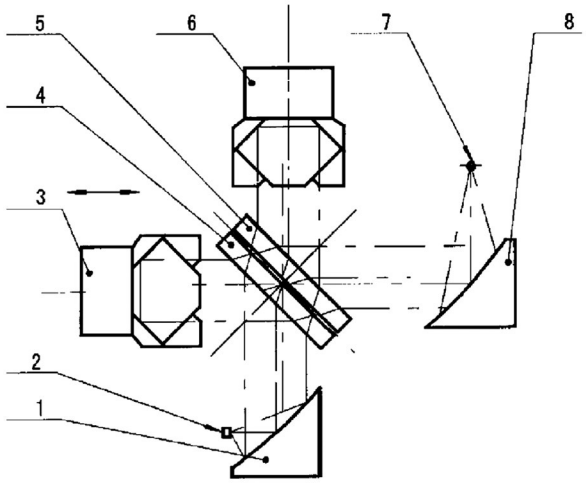


Рисунок 2. Кубический угловой интерферометр Майкельсона:

1 – коллимирующее зеркало; 2 – детектор; 3 – подвижное зеркало; 4 – делитель луча; 5 – компенсатор; 6 – неподвижное зеркало; 7 – источник; 8 – коллимирующее зеркало

Figure 2. Corner-cube Michelson interferometer

1 – collimating mirror; 2 – detector; 3 – movable mirror; 4 – beam divider; 5 – compensator; 6 – fixed mirror; 7 – source; 8 – collimating mirror

Интерферометр ИК-Фурье спектрометров серии i-Red 7800 полностью герметичен и защищен от попадания влаги. Герметичность интерферометра достигается за счет наличия окна, изготовленного из KBr и уплотнительного кольца. Это позволяет предотвратить поглощение влаги из воздуха делителем луча.

В таблице 1 приведены основные технические характеристики ИК-Фурье спектрометров серии i-Red 7800 (сертификат об утверждении типа средств измерений № 89710-23).

ИК-Фурье спектрометры серии i-Red 7800 поставляются с широким набором дополнительных принадлежностей – кюветами для жидких, газообразных проб, приставками НПВО и МНПВО, приставкой диффузного отражения, пресс-формой для изготовления таблеток, держателем твердых образцов и пленок, ИК-микроскопом и др., позволяющих решать любые задачи по идентификации, оценке качества фармацевтической субстанции, проведению количественного анализа.

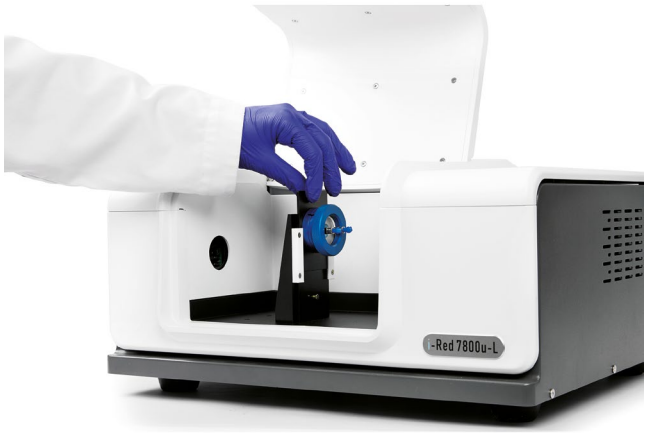
Таблица 1. Основные технические характеристики

Table 1. Technical specifications

Наименование характеристики Characteristic name	**Значение** Meaning
Спектральный диапазон показаний, $см^{-1}$ Spectral range of readings, cm^{-1}	От 7800 до 350 From 7800 to 350
Максимальное спектральное разрешение (без аподизации), $см^{-1}$, не более Maximum spectral resolution (without apodization), cm^{-1}, no more	0,85
Отношение сигнал/шум, не менее: • модификации i-Red 7800L, i-Red 7800u-L • модификации i-Red 7800, i-Red 7800u Signal to noise ratio, not less than: • modifications i-Red 7800L, i-Red 7800u-L • modifications i-Red 7800, i-Red 7800u	 30000:1 42000:1

Операционное программное обеспечение SILab WSI включает в себя все основные функции анализа инфракрасного спектра. В отличие от некоторых японских и западных производителей ИК-Фурье спектрометров, поставляющих в стандартной конфигурации библиотеки ИК-спектров, насчитывающие от нескольких сотен до нескольких тысяч ИК-спектров, стандартное программное обеспечение SILab WSI содержит более 17 000 ИК-спектров органических, неорганических соединений, полимеров и полимерных добавок, наркотических и лекарственных препаратов и др., может работать совместно с программным обеспечением сторонних производителей, включая сторонние библиотеки спектров.

Программное обеспечение SILab WSI соответствует требованиям целостности и прослеживаемости данных, 21 CFR part 11,GMP/GLP.



ИК-Фурье спектрометр серии i-Red 7800 марки SILab

IR spectrometer i-Red 7800 series, SILab

Лабконцепт

SILAB
Simply Intelligent

ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОМЕТР
серии i-Red 7800 марки SILab

- **Экспрессный метод идентификации лекарственных средств** при проведении контроля качества
- **Возможность оснащения прибора приставками НПВО / МНПВО** для проведения анализа без предварительной пробоподготовки
- **Высокое качество оптической схемы и детектора** обеспечивают соотношение S/N до 42 000:1
- **ПО соответствует требованиям целостности и прослеживаемости данных** 21 CFR part 11, GMP/GLP
- **Тестирование каждой единицы прибора** в собственном отделе технического контроля перед отгрузкой

Внесен в Государственный реестр СИ. Номер: 89710-23

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

Москва
+7 (495) 136-21-74
msk@labconcept.ru

Нижний Новгород
+7 (831) 228-80-02
op_nn@labconcept.ru

Уфа
+7 (347) 246-23-97
op_yfa@labconcept

Казань
+7 (843) 205-48-85
op_kzn@labconcept.ru

Владивосток
+7 (423) 230-22-23
op_dv@labconcept.ru

Подробнее о приборе

Рекламная статья / Sponsored article

SC Powder – отечественный порошок для приготовления биорелевантных сред от компании Scientific Compliance

Авторы подготовили статью при финансовой поддержке Scientific Compliance

Применение биорелевантных сред растворения позволяет воспроизвести условия, как в желудочно-кишечном тракте человека. Это расширяет возможности лабораторий, занимающихся анализом твердых лекарственных форм и позволяет получать физилогически релевантные результаты в ходе исследований.

SC Powder – domestic powder for the preparation of biorelevant media from the company Scientific Compliance

The authors prepared the article with the financial support of Scientific Compliance

The use of biorelevant dissolution media makes it possible to reproduce conditions as in the human gastrointestinal tract. This expands the capabilities of laboratories involved in the analysis of solid dosage forms and allows obtaining physiologically relevant results during research.

Такие *in vitro* испытания твердых дозированных лекарственных форм, как тест «Растворение» и тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР) – незаменимые инструменты в фармацевтической индустрии, которые решают ряд критически важных задач: *оценка эквивалентности лекарственных форм, контроль качества, разработка новых лекарственных препаратов.* Однако эксперимент в фармакопейных средах растворения имеет недостатки для некоторых изучаемых объектов: он не всегда информативен для веществ II и IV классов биофармацевтической классификационной системы (БКС) ввиду низкой дискриминативности методик, а также недостаточно релевантен реальному содержимому желудочно-кишечного тракта. Для целей биопредикции были разработаны биорелевантные среды растворения (БРС).

БРС – это среды растворения, приближенные к внутренним жидкостям человеческого организма (кишечный, желудочный сок) по химическому составу и по физико-химическим свойствам (pH, осмолярность, буферная емкость, поверхностное натяжение). Использование данных сред позволяет максимально приблизить результаты испытаний *in vitro* к условиям *in vivo*.

В состав БРС входят эндогенные поверхностно-активные вещества, которые образуют мицеллы, способствующие повышению растворимости веществ. На данный момент существует ряд различных БРС (рисунок 1). Отдельно хочется отметить плавное повышение солюбилизации, в отличие от синтетических ПАВ, которые зачастую могут слишком резко увеличивать растворимость, что ведет к ложной трактовке результатов эксперимента.

Наиболее распространенными БРС являются: FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF (таблица 1).

КАКИЕ ЗАДАЧИ МОЖНО РЕШИТЬ С ПОМОЩЬЮ БРС?

1. Прогнозирование поведения лекарственных препаратов в желудочно-кишечном тракте человека на ранних стадиях разработки.
2. Изучение влияния пищи на растворимость лекарственных веществ.
3. Проведение сравнительного анализа различных лекарственных форм и составов в физиологических условиях.

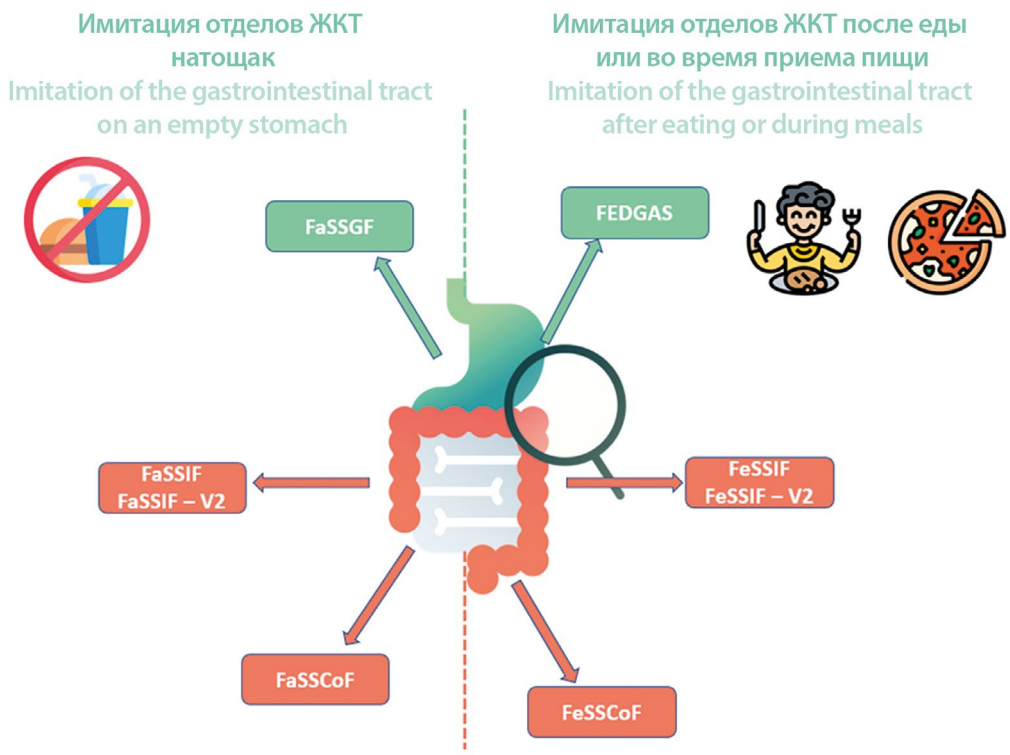


Рисунок 1. **Классификация биорелевантных сред**

Figure 1. **Classification of biorelevant media**

Таблица 1. **Виды и характеристика основных биорелевантных сред растворения**

Table 1. **Types and characteristics of the main biorelevant dissolution media**

БРС BRM	**Характеристика** Characteristic	**Состав** Compound	**Применение** Application
FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid)	Имитация кишечного сока человека натощак Imitation of human intestinal juice on an empty stomach	• фосфатный буферный раствор со значением pH 6,5; • физиологические сурфактанты 2,24 г/л • phosphate buffer solution with value of pH 6.5; • physiological surfactants 2.24 g/l	Для оценки растворимости пероральных препаратов, преимущественно относящихся ко II и IV, b и c подклассов БКС, для которых планируется дальнейшее проведение КИ по протоколу натощак To assess the solubility of oral drugs, mainly belonging to BCS subclasses II and IV, b and c, for which further CT is planned according to the fasting protocol
FeSSIF (Fed State Simulated Intestinal Fluid)	Имитация кишечного сока человека после приема пищи Imitation of human intestinal juice after eating	• ацетатный буферный раствор со значением pH 5,0 • физиологические сурфактанты 11,2 г/л • acetate buffer solution with value of pH 5.0 • physiological surfactants 11.2 g/l	Для оценки растворимости пероральных препаратов, преимущественно относящихся ко II и IV, b и c подклассов БКС, для которых планируется дальнейшее проведение КИ по протоколу после приема пищи To assess the solubility of oral drugs, mainly belonging to BCS subclasses II and IV, b and c, for which further CT is planned according to the postprandial protocol
FaSSGF (Fasted State Simulated Gastric Fluid)	Имитация желудочного сока человека натощак Imitation of human gastric juice on an empty stomach	• раствор хлористоводородной кислоты со значением pH 2,0 • натрия хлорид • физиологические сурфактанты 60 мг/л раствора • hydrochloric acid solution with value of pH 2.0 • sodium chloride • physiological surfactants 60 mg/l solution	Для оценки растворимости пероральных препаратов, преимущественно относящихся ко II и IV, a и c подклассам БКС, для которых планируется дальнейшее проведение КИ по протоколу натощак To assess the solubility of oral drugs, mainly belonging to II and IV, a and BCS subclasses, for which further CT is planned according to the fasting protocol

Использование коммерческого порошка является оптимальным и эффективным способом работы с БРС в лаборатории. Несмотря на то, что порошок состоит лишь из двух компонентов: лецитин и таурохолат натрия, самостоятельное приготовление БРС путем растворения отдельных веществ затруднительно и дает невоспроизводимые результаты испытаний из-за разного числа образованных мицелл. Изготовление порошка требует особых технологических подходов, в результате которых происходит образование иных кристаллических модификаций компонентов.

В настоящее время особую проблему представляет процесс доставки порошков зарубежного производства, в том числе из дружественных стран. В рамках обеспечения технологического суверенитета Российской Федерации в сфере испытаний твердых лекарственных форм был создан универсальный порошок для приготовления БРС FaSSIF, FeSSIF и FaSSGF отечественного производства SC Powder. С проектом, посвященным данному продукту, компания Сайнтифик Комплайнс стала победителем стартап-программы «Fast Track» фонда Сколково в апреле 2024 года.

Качество порошка SC Powder относительно других коммерческих аналогов было, доказано в ряде исследований, выполненных на базе Scientific Compliance и партнерских организаций, все поступающее сырье для приготовления порошков проходит оценку подлинности методом ЯМР ^{1}H. Кроме того, высокое качество готового продукта обеспечивается многофакторной стандартизацией, которой нет у аналогов: динамическое рассеяние света (DSL) для оценки размера и количества частиц, высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC) для количественного определения компонентов.

Мы рады объявить официальный старт продаж порошка SC Powder для приготовления биорелевантных сред! Присоединяйтесь к растущему числу лабораторий, оценивших преимущества SC Powder. Сделайте шаг навстречу научному подходу, точности и релевантности своих испытаний!

Информационная статья / Informational article

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

Двухдневный конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» прошел 27 и 28 февраля 2024 года в Сеченовском университете в Москве. Организаторами конгресса традиционно выступают Центр Фармацевтической Аналитики и журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств». Мероприятие посетили 170+ слушателей, с нами были более 60 докладчиков, нас поддержали 20+ партнеров.

Drug development and registration congress was held in Moscow on February 27 and 28

The two-day congress "Drug development and registration" was held on February 27 and 28, 2024 at Sechenov University in Moscow. The organizers of the congress are the Center of Pharmaceutical Analytics and the journal "Drug development and registration". The event was attended by 170+ listeners, more than 60 speakers were with us, and we were supported by 20+ partners.

Двухдневный конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» прошел 27 и 28 февраля 2024 года в Сеченовском университете в Москве. Организаторами конгресса традиционно выступают Центр Фармацевтической Аналитики и журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Мероприятие посетили 170+ слушателей, с нами были более 60 докладчиков, нас поддержали 20+ партнеров.

Конгресс проводится ежегодно, начиная с 2012 года. Это площадка для встречи регуляторов, представителей фармацевтических компаний, профессиональных ассоциаций, научных организаций и экспертов отрасли. Конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» – это всегда дружественная, теплая атмосфера, располагающая к открытому диалогу между всеми участниками мероприятия.

Главными темами конгресса этого года стали: регистрация лекарственных средств и регуляторные вопросы; надлежащие практики и система менеджмента качества; надлежащая публикационная практика; клинические и доклинические исследования; трансфер фармацевтических технологий; upstream-downstream: разработка и масштабирование.

Открывала мероприятие **Наталья Вячеславовна Кульджанова**, директор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». *«Наши конгрессы проводятся с 2012 года и это уже третье мероприятие с подобным размахом. Как организаторам, нам крайне приятно, что интерес к нашим мероприя-*

тиям со стороны слушателей и докладчиков растет. Это значит, что мы создаем, действительно, качественный продукт, востребованный у потребителя», – отметила **Наталья Вячеславовна**.

Кульджанова Наталья Вячеславовна

С приветственной речью также выступил генеральный директор Центра Фармацевтической Аналитики, главный редактор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» **Игорь Евгеньевич Шохин**. Организаторы пожелали слушателям продуктивной работы в рамках конгресса, новых знаний и интересных знакомств. Следом выступил почетный гость конгресса – академик РАН, заместитель директора по научной работе, НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи **Логунов Денис Юрьевич** с темой доклада «Новые разработки НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи».

Логунов Денис Юрьевич

Шохин Игорь Евгеньевич

Первая секция конгресса была посвящена стратегическому развитию фармацевтической отрасли. Модератором секции выступила **Закирова Светлана Анатольевна**, директор по развитию бизнеса, Герофарм.

«За последние несколько лет была создана стратегия развития фармацевтической индустрии, которая способна вывести отрасль на новый уровень. В течение 2022 и 2023 года фармацевтическая отрасль адаптировалась к жизни в условиях новых санкционных реалий. В этот период было создано достаточно много инициатив, которые уверенно поддерживали российские компании», – отметила **Светлана Анатольевна**.

Закирова Светлана Анатольевна

В рамках пленарной сессии особое внимание спикеры уделили увеличению инвестиционного потенциала, усилению правовой базы, увеличению инновационного потенциала отрасли, обсудили уже существующие и необходимые меры поддержки.

С **Кедриным Алексеем Леонидовичем**, Ассоциация фармацевтических производителей ЕАЭС мы поговорили о том, как внедрить модель инновационного развития фармацевтической отрасли. Спикер подчеркнул, что только плотное взаимодействие производителей, научных и образовательных учреждений, институтов развития, органов государственной власти позволит повысить качество и продолжительность жизни населения, обеспечить технологическую независимость РФ. С целью содействия развитию инноваций в АФПЕАЭС была создана инициатива формирования Навигатора – специальной платформы для обзора нормативных актов, платформ, институтов, в рамках которых возможна финансовая поддержка инноваций в фармацевтическом секторе.

В проекте обновленной стратегии научно-технического развития зафиксировано, что по ключевым направлениям Россия должна обеспечить себя собственными технологиями, материалами и средствами производства. О том, какие механизмы необходимы для реализации данной стратегии мы подробно поговорили с **Тарасовым Вадимом Владимировичем**, директором института трансляционной медицины и биотехнологии Сеченовского университета.

Филатова Ирина Анатольевна, депутат Государственной думы Федерального собрания Российской Федерации VIII созыва, Руководитель Экспертного совета по защите конкуренции в сфере фармацевтической деятельности в своем докладе раскрыла тему развития экспортного потенциала в страны БРИКС и Африки. Спикер отметила, что экспортное развитие продолжается, и есть большое число инициатив как с российской стороны, так и с африканской.

Стецюк Максим Викторович, генеральный директор, Бинергия затронул тему механизмов, которые необходимо дополнительно внедрять для развития фармацевтической отрасли. Спикер подчеркнул, что необходимо углублять защиту отечественных производителей, делать долгосрочную ставку на отечественные разработки совместно с научными институтами и развивать сопутствующую индустрию.

Про регуляторные вызовы подробно рассказал **Меркулов Вадим Анатольевич**, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ.

Во второй части пленарной сессии «Стратегическое развитие фармацевтической отрасли: реалии и перспективы» спикерами была затронута важная тема коллаборации науки и фармацевтической отрасли, призванная повысить инновационный потенциал.

Зарубина Камила Башировна, вице-президент, исполнительный директор Кластера биологических и медицинских технологий, Фонд Сколково в своем докладе отметила те инициативы, которые уже были созданы государством с целью поддержания и ускорения темпа разработок, а также внесла ряд важных предложений, как создание программ государственной поддержки для разработчиков ЛС и трансфера; привлечение средств в виде венчурного капитала и частных инвесторов, гибкое регистрационное регулирование, трансфер технологий, бесшовное взаимодействие ВУЗов, НИИ и институтов развития.

Доклад **Бурнашева Константина Геннадьевича**, Фонд «Московский инновационный кластер был посвящен мерам поддержки проектов и компании из сферы фармацевтической отрасли и отрасли медицинских технологий со стороны Московского инновационного кластера. Спикер представил успешные кейсы, озвучил суммы поддержки, которые получили компании в 2023 г.

Нельзя не отметить, что крайне важным фактором развития фармацевтической отрасли является время и скорость. С генеральным директором

Московского центра инновационных технологий в здравоохранении **Шулениным Вячеславом Вячеславовичем** мы поговорили о скорости вывода продукта на рынок, скорости клинических исследований, скорости обеспечения пациентов необходимой терапией, а также про грантовую поддержку клинических исследований, проводимых на базе московских учреждений.

Тема вызовов и барьеров с точки зрения российского производителя биотехнологического оборудования остается актуальной на сегодняшний день. **Соловьев Роман Андреевич**, заместитель директора, Биотехно подчеркнул, что одной из главных проблем является отсутствие развитого кластера фармацевтического и биотехнологического машиностроения, отсутствие необходимого полимера для производства одноразовых систем в России. Спикер также выступил с инициативой о необходимости создания инструмента гарантированного спроса на российское оборудование для фармпроизводства со стороны государства с целью поддержки отечественного производителя.

В завершении дискуссии **Ли Елена Эдуардовна**, основатель и учредитель Dolce-Pharm рассказала об опыте Казахстана в борьбе с теми вызовами, с которыми они столкнулись. **Елена Эдуардовна** особенно отметила, что урок пандемии показал важность поддержки отечественного производителя. Спикером было предложено выйти на единый стандарт и сертификацию лекарственных средств и медицинских изделий в ЕАЭС, а также ускорить процесс признания регистрационных удостоверений на территории стран ЕАЭС.

В рамках секции конгресса, посвященной регуляторным вопросам, были раскрыты следующие темы: изменение состава регистрационного досье согласно праву Союза в 2023 году, основные направления развития регулирования обращения лекарственных средств в рамках ЕАЭС в 2024 году, различия и сходства фармакопеи ЕАЭС и России, сближение национального регулирования и ЕАЭС – что значит для отрасли масштабное изменение 61-ФЗ? Модератором секции выступил **Калиниченко Вадим Валентинович**, Департамент регулирования обращения лекарственных средств и медицинских изделий Минздрава России.

Секцию, посвященную вопросам надлежащей практики и системе менеджмента качества, открывала **Гремякова Полина Владиславовна**, генеральный директор «Поверие». **Полина Владиславовна** рассказала о типах несоответствий, работе с ними. Было отмечено, что отсутствие несоответствий приравнивается к отрицательным критериям оценки компании. **Сарских Алена Витальевна**, руководитель ООКИР Биокад рассказала про управление рисками для качества в фармацевтической разработке. Спикеры также обсудили решения для оптимизации работы лаборатории и защиты аналитических данных в современных условиях, аналитические платформы и атрибуты качества, работу с поставщиками АФС в условиях изменений при формировании регистрационного досье, обустройство лаборатории и многое другое.

Секция «Надлежащая публикационная практика» прошла под руководством **Шохина Игоря Евгеньевича**, генерального директора ЦФА. Спикеры и слушатели обсудили тему публикаций в журналах международного уровня на примере журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Поговорили о том, как подготовить статью в журнал международного уровня. Обсудили новые тенденции в редакционной политике медицинских и фармацевтических изданий.

На круглом столе «Отраслевые маркетплейсы и импортозамещение: новые возможности для фармацевтических лабораторий и научного сообщества» мы поговорили про онлайн-площадки и их возможности в решении проблем с импортозамещением, поиском нужных приборов и реагентов по приемлемым ценам и, главное, со скоростью поставок. Модерировала круглый стол **Наталья Вячеславовна Кульджанова**, директор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Средний срок поставок заказов в естественно-научных исследованиях составляет от одного до трех месяцев, хотя в отдельных случаях может увеличиваться до непредсказуемых пределов, при этом цена на транспортные расходы увеличивается пропорционально усложнению маршрутов логистики. Спикеры поделились своим опытом и знаниями в области использования новых механизмов закупок. Поделились мнением о ключевых проблемах в обеспечении исследований реагентами и оборудованием, обсудили уже существующие и необходимые решения.

Второй день конгресса открывала секция, посвященная клиническим и доклиническим исследованиям в разработке и регистрации лекарственных средств. Модераторами секции выступили **Макаренко Игорь Евгеньевич и Комаров Тимофей Николаевич**.

Комаров Тимофей Николаевич

Макаренко Игорь Евгеньевич

В докладе **Горячева Дмитрия Владимировича**, директора центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» были рассмотрены следующие вопросы:

- Цель проведения КИ (клинических исследований)?
- Когда нет необходимости проведения КИ?
- Когда необходимо проведение КИ?
- Где проводить КИ, все ли КИ рассматриваются?
- Могут ли результаты КИ экстраполироваться на иные показания и возрастные группы?
- Возможны ли несравнительные КИ?
- Когда надо доказывать превосходство и когда эквивалентность/не меньшую эффективность?
- Когда биоэквивалентности недостаточно?
- Можно использовать непредусмотренный протоколом анализ для доказательства эффективности?

Доклад вызвал живой интерес со стороны аудитории, слушатели активно задавали вопросы и принимали участие в дискуссии.

Какие вызовы стоят перед фармацевтическими компаниями, проводящими клинические исследования, рассказал **Макаренко Игорь Евгеньевич**, руководитель медицинского департамента Герофарм. Спикер обратил внимание, что мир меняется благодаря технологическому прогрессу. «*Еще 20 лет назад мы боялись биосимиляров и проводили КИ на бумажных ИРК. Сейчас мы можем доказать, что 1 биосимиляр идентичен другому*, – **отметил Игорь Евгеньевич**, – *до появления 61 ФЗ в России практически не было экспертиз в клиническом мониторинге, сейчас она есть даже в планировании КИ*».

Ерёменко Наталья Николаевна, главный эксперт ФГБУ «НЦЭСМП» затронула тему экспертной оценки протоколов биоэквивалентности: основные ошибки, неправомерный выбор дизайна. Спикер подробно осветила существующие нормативные документы, остановилась на вопросах выбора референтного лекарственного препарата и дизайна исследования, привела примеры обоснования расчета количества добровольцев для разных исследований.

Ерёменко Наталья Николаевна

Выступление **Ивкина Дмитрия Юрьевича**, начальника центра экспериментальной фармакологии СПХФУ было посвящено трансляции результатов: возможностям ретроспективного анализа. **Дмитрий Юрьевич** в своем докладе затронул проблематику перехода от ДКИ к КИ на фоне правового разлома в регуляции доклинических и клинических исследований. Спикер также рассказал о проектах ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России за 2011-2023 г.

Комаров Тимофей Николаевич, директор исследовательского центра ЦФА выступил с докладом «Проведение исследований фармакокинетики в условиях экономических ограничений: подводные камни и новые возможности». В своем докладе спикер рассказал о вызовах 2022–2023 годов на примере ЦФА, а также поделился решениями по их преодолению.

Во второй части секции «Клинические и доклинические исследования в разработке и регистрации лекарственных средств» обсуждались новые тренды в клинических исследованиях, были представлены успешные примеры российских препаратов и разработок.

О том, какие изменения произошли в клинических исследованиях за последние 20 лет, трендах в прошлом и настоящем рассказал **Захаров Константин Анатольевич**, управляющий директор Экселлена. Новые тренды и тренды будущего – увеличение объема и «сложности» данных, появление новых «источников» данных и вопросы их принадлежности, новые методы работы с данными, истинные бенефициары, финансирование, искусственный интеллект.

В докладе **Багаевой Натальи Сергеевны**, руководителя отдела биостатистики ЦФА была затронута важная тема о предпосылках возникновения потенциальных ошибок в клинических исследованиях. Спикер подробно рассказала о планировании клинических исследований, наиболее часто встречающихся ошибках на различных этапах КИ и статистической обработке данных.

Со **Щербаковой Викторией Сергеевной**, директором медицинского департамента Промомед мы поговорили про российские разработки для лекарственной независимости в эндокринологии: первый отечественный лираглутид. Поставки препарата в Россию прекратились в марте 2023 года, и уже в сентябре 2023 года был выведен на рынок первый российский лираглутид.

Щербакова Виктория Сергеевна

Яковлев Игорь Борисович, заведующий кафедрой фармации МарГУ затронул тему эффективности центра клинических исследований. Были выделены 5 «граней» призмы эффективности центров КИ.

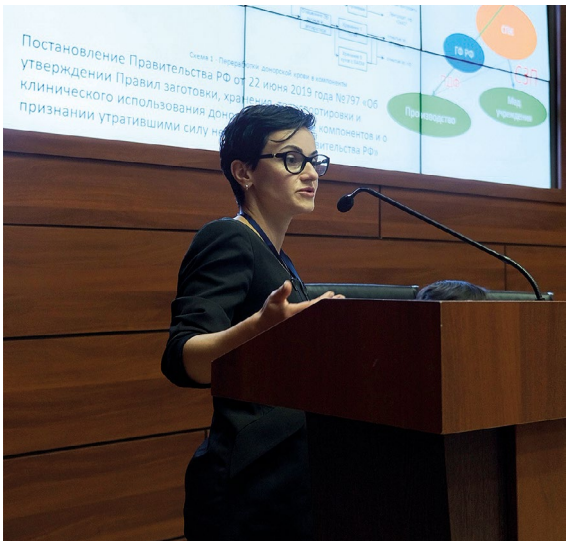
Яковлев Игорь Борисович

В завершении дискуссии **Шохин Игорь Евгеньевич**, генеральный директор ЦФА рассказал про исследования фармакокинетики инсулинов и их аналогов, а также представил успешные кейсы. Спикер рассмотрел основные подходы при проведении биоаналитических исследований методом ИФА.

В рамках секции «Upstream-downstream: разработка и масштабирование» **Алешкин Андрей Владимирович**, член-корреспондент РАН, заместитель директора по медбиотехнологии МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора выступил с докладом «Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов бактериофагов и их ферментов». Спикер подробно рассказал о бактериофагах и их применении для решения межотраслевой проблемы антибиотикорезистентности. Представители компании Хеликон, в свою очередь, поделились знаниями о культивировании клеток продуцентов. Спикеры обсудили следующие темы: настройка процесса культивирования, в погоне за титром без потери качества, культивирование клеток в биореакторе, технологию DBR, масштабирование от лабораторного до промышленного применения и очистку продукта (FPLC и сорбенты).

Алешкин Андрей Владимирович

В заключительной секции «Трансфер фармацевтических технологий и разработка лекарственных средств» обсуждалась практическая реализация процесса трансфера с упором на коммерциализацию разработок государственных учреждений. **Елизарова Ольга Сергеевна**, начальник отдела коммерциализации разработок ЦТМТ рассказала о роли Центра трансфера медицинских технологий, существующих мерах поддержки и планируемых стратегических инициативах. **Смолянова Татьяна Ивановна**, Нацимбио раскрыла тему обеспечения технологического суверенитета в разработке и производстве биопрепаратов. **Титович Ирина Александровна**, директор департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров СПХФУ, **Екимов Антон Анатольевич**, Глювекс, **Бабков Денис Александрович,** директор Научного центра инновационных лекарственных средств ВолгГМУ и **Бахрушина Елена Олеговна**,



Смолянова Татьяна Ивановна

доцент кафедры фармацевтической технологии Сеченовского университета поделились своим опытом и примерами в данном направлении. О критериях успешности трансфера технологии твердых лекарственных форм рассказала **Спирина Юлия Сергеевна**, руководитель группы трансфера Сотекс.

На круглом столе «Валидация аналитических методик: биоаналитика VS стандартизация» были рассмотрены основные виды аналитических методик. **Тернинко Инна Ивановна**, начальник центра контроля качества лекарственных средств СПХФУ рассказала, как работает валидация аналитических методик для целей стандартизации. **Арчакова Ольга Александровна**, заведующая лабораторией биоаналитических исследований ЦФА объяснила, почему валидация биоаналитических методик проводится не по Фармакопее РФ.

Еще один круглый стол был посвящен исследованиям фармакокинетики и биоэквивалентности. Дискуссию открывал **Шохин Игорь Евгеньевич**, генеральный директор ЦФА. Также были представлены доклады спикеров из Научного центра психического здоровья, РУДН им П. Лумумбы, ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий.

Партнерами конгресса «Разработка и регистрация лекарственных средств» выступили: Сеченовский университет, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, ЕЭК, СПХФУ, Статэндокс, Герофарм, ТД «ХИММЕД», Лабконцепт, Глювекс, NPJ, Фарма РФ, PCR.NEWS, ФармМедПром, Экселлена, SkyGen, Helicon, CFO Russia, Фармацевтический вестник, CON-PHARM.RU, ВолгГМУ, БелкиАнтитела, Воды здоровья, Профессорская клиника, Биотехно, Бинора.

Благодарим участников конгресса за интерес к мероприятию, активные дискуссии и хорошее настроение! До встречи в следующем году!

Обзорная статья / Review article

УДК 615.014.2

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1727

Check for updates

CC BY 4.0

Современные аспекты наружного применения и перспективы использования секретома мезенхимальных стволовых клеток (обзор)

Е. О. Бахрушина[1], И. В. Гравель[1], О. С. Филиппова[1], В. Н. Тычинин[2], А. А. Попова[1]✉, О. Б. Добровольский[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 «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:** Попова Анна Александровна. **E-mail:** popova_a_a_1@staff.sechenov.ru

ORCID: Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; И. В. Гравель – https://orcid.org/0000-0002-3735-2291;
О. С. Филиппова – https://orcid.org/0009-0007-7660-2090; В. Н. Тычинин – https://orcid.org/0009-0001-5464-9337;
А. А. Попова– https://orcid.org/0000-0002-3874-8626; О. Б. Добровольский – https://orcid.org/0009-0004-3852-0842.

Статья поступила: 23.01.2024 **Статья принята в печать:** 19.03.2024 **Статья опубликована:** 22.03.2024

Резюме

Введение. Секретом мезенхимальных стволовых клеток (СМСК) находит широкое применение в практической медицине. Он используется за счет своих иммунномодулирующих и регенеративных свойств в лечении аутоиммунных, иммуноопосредованных, а также некоторых других заболеваний благодаря противовоспалительному, нейропротективному и регенерирующему действию. В последние годы возрос интерес к разработке средств для наружного применения, содержащих СМСК. Подобные препараты планируется применять в лечении диабетических ран, для регенерации кожи, лечения воспалительных заболеваний, а также алопеции. Имеются множественные исследования, подтверждающие значительный потенциал для применения СМСК в дерматологии и косметологии. Целью данного обзора являлось изучение потенциала использования кондиционной среды в составе лекарственных средств для наружного применения, подходов к стандартизации СМСК в качестве фармацевтической субстанции и методов увеличения ее чрескожной доставки.

Текст. СМСК как активный фармацевтический ингредиент представляет собой прозрачную жидкость от желтого до оранжевого цвета с характерным запахом. pH готового к введению в композиции СМСК составляет от 7,0 до 7,5, что позволяет использовать его в средствах для местного и наружного применения без добавления стабилизаторов или корректоров pH. Проблемы доставки СМСК через эпидермис чаще всего решают помещением секретома в гидрогели, использованием экзосом или технологии с использованием микроигл. С 2022 года после внесения изменений на законодательном уровне были приняты меры по регистрации и внедрению в клиническую практику отечественных препаратов на основе клеточных продуктов. Однако, как показал анализ, до появления оригинальных лекарственных средств на основе СМСК пройдет еще некоторое время. На сегодняшний день в Российской Федерации производятся продукты, относящиеся к косметическим средствам и ветеринарным препаратам, а также зоокосметическим средствам.

Заключение. СМСК может быть использован в качестве субстанции для потенциального лечения широкого спектра острых и хронических заболеваний. Но несмотря на большое количество положительных результатов применения СМСК в заживлении ран у животных, а также клинических исследований по изучению влияния на регенерацию кожи, отсутствуют исследования его безопасности, эффективности и стандартизации процесса производства фармацевтической субстанции.

Ключевые слова: секретом мезенхимальных стволовых клеток, кондиционная среда, факторы роста, экзосомы, наружное применение, атопический дерматит, космецевтика

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

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина, И. В. Гравель придумали и разработали дизайн обзора. Е. О. Бахрушина, И. В. Гравель и О. С. Филиппова провели научный поиск. В обработке данных участвовали Е. О. Бахрушина, А. А. Попова и О. С. Филиппова. В написании статьи принимали участие А. А. Попова и О. С. Филиппова. В рецензировании и одобрении статьи участвовали В. Н. Тычинин и О. Б. Добровольский. Все соавторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Гравель И. В., Филиппова О. С., Тычинин В. Н., Попова А. А., Добровольский О. Б. Современные аспекты наружного применения и перспективы использования секретома мезенхимальных стволовых клеток. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):34–47. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1727

Modern aspects of external application and prospects of using the secretome of mesenchymal stem cells (review)

Elena O. Bakhrushina[1], Irina V. Gravel[1], Olga S. Filippova[1], Valery N. Tychinin[2], Anna A. Popova[1]✉, Oleg B. Dobrovolsky[1]

[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] N. I. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov RNRMU). 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna A. Popova. **E-mail:** popova_a_a_1@staff.sechenov.ru

© Бахрушина Е. О., Гравель И. В., Филиппова О. С., Тычинин В. Н., Попова А. А., Добровольский О. Б., 2024
© Bakhrushina E. O., Gravel I. V., Filippova O. S., Tychinin V. N., Popova A. A., Dobrovolsky O. B., 2024

ORCID: Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; Irina V. Gravel – https://orcid.org/0000-0002-3735-2291;
Olga S. Filippova – https://orcid.org/0009-0007-7660-2090; Valery N. Tychinin – https://orcid.org/0009-0001-5464-9337;
Anna A. Popova– https://orcid.org/0000-0002-3874-8626; Oleg B. Dobrovolsky – https://orcid.org/0009-0004-3852-0842.

Received: 23.01.2024 **Accepted:** 19.03.2024 **Published:** 22.03.2024

Abstract

Introduction. The secretome of mesenchymal stem cells (SMSC) is widely used in medicine. It is most often used due to its immune-modulating and regenerative properties in the treatment of autoimmune, immuno-mediated and other diseases due to its anti-inflammatory, neuroprotective and regenerating action. In many studies, exosomes isolated from SMSC are used as a therapeutic agent. In recent years, the interest in the development of products containing SMSC for external use has increased. Similar drugs are planned to be used in the treatment of diabetic wounds, for skin regeneration, the treatment of inflammatory diseases, as well as alopecia. There are multiple studies on increasing collagen secretion and reducing skin photosensitivity in preclinical studies, which confirms the significant potential for the use of SMSC in dermatology and cosmetology. The purpose of this review was to study the potential of using conditioned medium in medicines for external use, approaches to standardization of SMSC as a pharmaceutical substance and methods of increasing percutaneous delivery.

Text. SMSC as an active pharmaceutical ingredient is a transparent liquid from yellow to orange in color with a characteristic odor. The pH of the ready-to-use SMSC composition ranges from 7.0 to 7.5, which allows it to be used in topical and external applications without the addition of stabilizers or pH correctors. Problems of delivery of SMSC through the epidermis are most often solved by placing the secretome in hydrogels, using exosomes or technology using microneedles. Since 2022, after legislative changes, measures have been taken to register and introduce into clinical practice domestic drugs based on cellular products. However, as the analysis showed, it will take some time before the appearance of original medicines based on SMSC, and today in the Russian Federation only products related to cosmetics and veterinary drugs, as well as zoocosmetics, are produced so far.

Conclusion. SMSC may also prove to be a safer and more effective substance for the potential treatment of a wide range of acute and chronic diseases. But despite the large number of positive results of using SMSC for wound healing in animals, as well as clinical studies on skin regeneration, there are no studies of its safety and effectiveness, as well as standardization of the production process.

Keywords: secretome of mesenchymal stem cells, conditioned medium, exosomes, external use, atopic dermatitis, regeneration, cosmeceutics

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, Irina V. Gravel conceived and developed the design of the review. Elena O. Bakhrushina, Irina V. Gravel and Olga S. Filippova conducted scientific searches. Elena O. Bakhrushina, Anna A. Popova and Olga S. Filippova participated in data processing. Anna A. Popova and Olga S. Filippova participated in writing of the article. Valery N. Tychinin and Oleg B. Dobrovolsky participated in the review and approval of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bakhrushina E. O., Gravel I. V., Filippova O. S., Tychinin V. N., Popova A. A., Dobrovolsky O. B. Modern aspects of external application and prospects of using the secretome of mesenchymal stem cells. *Drug development & registration*. 2024;13(2):34–47. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1727

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что секретом (кондиционная среда) мезенхимальных стволовых клеток (СМСК) представляет собой смесь белковой растворимой фракции (факторов роста (ФР), цитокинов и везикулярной фракции), которая участвует в переносе белков и генетического материала [1]. Мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК) в условиях гипоксии увеличивают выработку факторов роста и противовоспалительных медиаторов [2]. Выработка этих факторов стволовыми клетками позволяет восстанавливать поврежденные ткани и клетки без самой стволовой клетки.

Секретом отдельно от МСК может быть использован для аллогенной трансплантации белков. G. K. Patel et al. показали, что секреторные белки в секретомах участвуют в межклеточных связях и оказывают существенное влияние на регуляцию биологических эффектов [3]. Они моделируют поведение клеток (пролиферацию, дифференцировку, выработку внеклеточного матрикса), обеспечивая противовоспалительный эффект. МСК также секретируют небольшие мембраносвязанные внеклеточные везикулы (экзосомы), которые содержат ряд биомолекул, включая ФР и цитокины, и разные формы РНК [1, 3].

Значительные преимущества применения СМСК в качестве активного ингредиента в сравнении с традиционным использованием стволовых клеток в терапии обусловлено соединениями секретома, которые имеют более низкую экспрессию белков клеточной поверхности [4].

СМСК удобен для использования в терапии и введения в состав лекарственных препаратов. Субстанция СМСК может быть стандартизирована, а процесс ее получения – масштабирован. В отличие от стволовых клеток, для которых требуется использование криопротекторов, СМСК не нуждается в специальных условиях хранения. Клиническое применение СМСК более экономично и практично, так как позволяет избежать инвазивных процедур сбора клеток. В

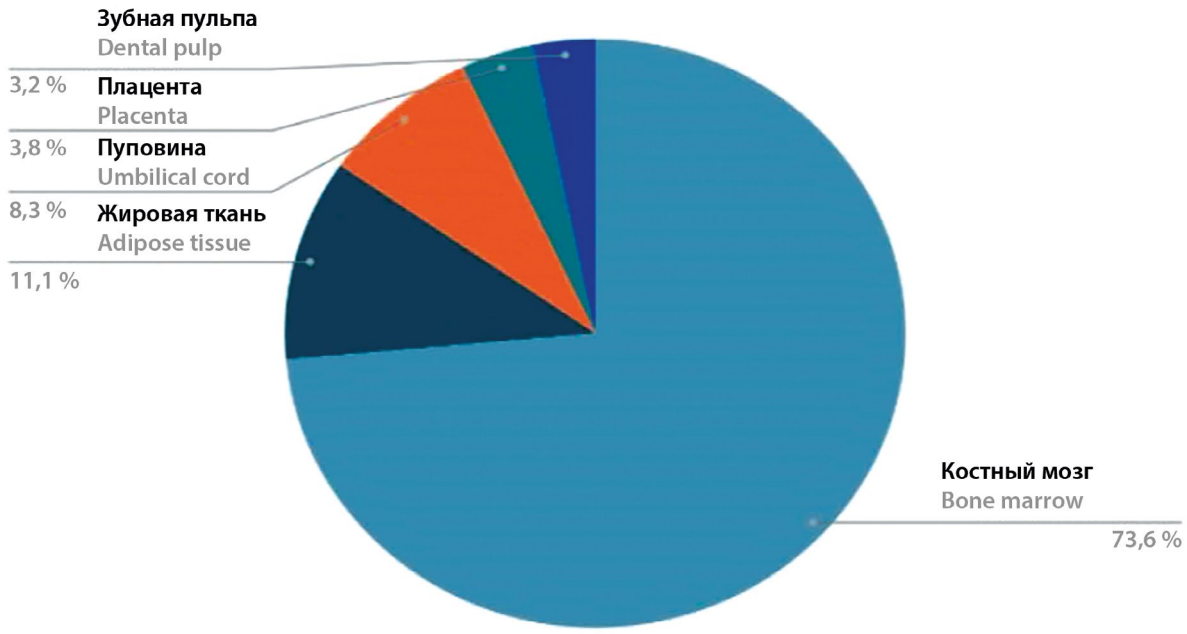


Рисунок 1. Источники секретома мезенхимальных стволовых клеток для применения в медицине (по данным публикаций PubMed)

Figure 1. Mesenchymal stem cells secretome sources for use in medicine (according to analysis of the PubMed database of scientific publications)

рамках дизайна терапии СМСК может быть модифицирован для достижения желаемых клеточно-специфических эффектов [1, 5].

Цель настоящего исследования: изучение возможного использования кондиционной среды в составе лекарственных средств для наружного применения, а также подходов к стандартизации СМСК в качестве фармацевтической субстанции и методов увеличения его чрескожной доставки.

СМСК активно изучается в последние 10 лет. За эти годы было опубликовано 559 научных работ в базе данных Pubmed (ключевые слова: «conditioned medium», «secretome stem cells»), при этом 378 публикаций – за последние 5 лет. Становится очевидным, что выделение и изучение СМСК для медицинского применения в настоящее время динамично развивается. Проводится около 40 клинических исследований, в которых кондиционная среда используется для лечения COVID-19, остеоартрита, ишемического инсульта (поиск по ключевым словам: «conditioned medium» и «secretome stem cells»[1]).

Особый интерес представляет наружное применение СМСК как одно из самых молодых и динамично развивающихся медицинских направлений применения стволовых клеток. Первая публикация на Pubmed приходится на 1993 год, а начиная с 2020 года исследовательская активность растет на 6–15 % ежегодно. На сегодняшний день опубликовано 129 работ, что составляет 20 % от общего числа публикаций по теме (по данным Pubmed).

[1] ClinicalTrials.gov. Available at: www.clinicaltrials.gov. Accessed: 23.01.2024.

Получение СМСК

Мезенхимальные стволовые клетки впервые были идентифицированы и выделены из костного мозга А. Фриденштейном в 1968 году. Это были мультипотентные стволовые клетки взрослых мышей и человека, которые способны к пролиферации, саморегенерации и дифференцировке во множественные клеточные линии [6]. В настоящее время чаще всего используются МСК костного мозга, на втором месте – жировой ткани, далее – пуповины, плаценты и зубной пульпы [7] (рисунок 1). Возможно выделение стволовых клеток из кожи, легких, синовиальной мембраны, слизистой оболочки носа, грудного молока, ткани кожи головы и роговицы, мышц, надкостницы, эндометрия и менструальной крови, шейки матки.

Мониторинг комитета по мезенхимальным и тканевым стволовым клеткам Международного общества клеточной терапии в 2006 году установил минимальные характеристики для человеческих МСК [6]:

- ✓ адгезивность к пластику в стандартных условиях культивирования;
- ✓ экспрессия CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, поверхностные молекулы CD14 или CD11b, CD79a или CD19 и HLA-DR;
- ✓ способность дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro*.

К недостаткам использования МСК можно отнести необходимость значительных количеств этих клеток и продолжительность их производства *in vitro* (около 10 недель перед имплантацией).

Выращивание МСК *in vitro* обычно проводится в культуральных колбах, где клетки растут прикрепленными к пластиковой поверхности за счет адсорбции молекул внеклеточного матрикса. При этом образуется плоский двумерный монослой (*двумерная культура*). Другая конформация (*трехмерная культура*) в большей степени воспроизводит условия физиологической среды, где преобладают межклеточные соединения, образование комплексов «клетка – матрикс» и существование молекулярных градиентов к центру агрегата [9]. Для культивирования МСК в качестве питательной среды используют эмбриональную бычью сыворотку как стандарт либо лизат тромбоцитов человека.

Известны два способа получения многоклеточных агрегатов: формирование на подложке, которое включает методы иммобилизации с использованием микроносителей, гидрогелей и систем инкапсуляции для образования и стабилизации мультиагрегатов [10]; образование клеточных мультиагрегатов без подложки, которое основано на способности МСК к самопроизвольному группированию и выработке многоклеточных агрегатов в определенных условиях культивирования без необходимости внешней поддержки [11–13].

Увеличение выработки секреции кондиционной среды можно обеспечить с помощью биофизических сигналов (трехмерные культуры, механическое напряжение, электрическая пульсация), биохимических сигналов (гипоксия, цитокины, ФР) и клеточного перепрограммирования (сверхэкспрессия белка или микроРНК) [14–16]. Растворимые компоненты секретома отделяют от фракции микровезикул центрифугированием, ультрафильтрацией, полимерным осаждением, ионообменной и эксклюзионной хроматографией [17, 18].

В 2022 году было проведено пилотное исследование, предлагающее протокол GMP для преобразования СМСК в активный фармацевтический ингредиент (АФИ) путем комплексного сочетания методов ультрафильтрации и сублимационной сушки [17, 18]. Ключевым аспектом в получении стандартизированных продуктов для клинического применения являются валидация процессов выделения, биообработки и очистки секретома из супернатантов культуры мезенхимальных стволовых клеток.

Стандартизация СМСК как АФИ

МСК и СМСК состоят из плейотропных биологически активных ингредиентов, что является серьезной проблемой для производства воспроизводимых лекарственных препаратов со стабильно высокой эффективностью и безопасностью, в отличие от отдельных АФИ. На состав кондиционной среды влияет гетерогенность донорских МСК. Фенотип и биологическая активность МСК, в свою очередь, зависят от их происхождения (биологической ниши) или состояния потенциальных доноров (возраст, заболевания, ожирение или неизвестные факторы) [19].

При рассмотрении СМСК в качестве АФИ на различных этапах его жизненного цикла необходимо определять показатели качества, как максимально полно характеризующие выделяемые секретомы, так и подходящие для рутинного контроля в процессе производства, стандартизации конечного продукта (таблица 1).

Таблица 1. Параметры стандартизации СМСК

Table 1. MSC-CM standardization parameters

Группа признаков Assessment Category	**Испытания** Assessment Items	**Метод определения** Method	**Ссылка** Reference
Физико-химические свойства Physicochemical Properties	Внешний вид (цветность, прозрачность) Physical appearance (color, transparency)	Визуально Physical appearance examination	
	pH	Потенциометрически Potentiometer	
	Видимые механические частицы Presence of visible mechanic particles	Визуально, машинное зрение Physical appearance examination	
Подлинность Identity	30 факторов роста, цитокины и хемокины 30 growthfactors cytokines and chemokines	ИФА, ВЭЖХ, рамановская спектроскопия, проточная цитометрия, вестерн-блоттинг ELISA, HPLC, Raman spectroscopy, flow cytometry, Western blot	20–22
Морфология Morphology	Наличие типичного бислоя Appearance of typical bilayer	Трансмиссионная электронная микроскопия Transmission electron microscopy	23, 24
Примеси Impurities	Количественное содержание примесей Quantitative content of impurities	ВЭЖХ HPLC	20, 25
Стерильность Sterility	Стерильность, бактериальный эндотоксин, посторонние микроорганизмы Sterility, Endotoxin, Bacteria	Мембранная фильтрация, прямой посев Membrane filtration, direct inoculation	26

СМСК как активный фармацевтический ингредиент представляет собой прозрачную жидкость от желтого до оранжевого цвета с характерным запахом. pH готового к введению в композиции СМСК составляет от 7,0 до 7,5, что позволяет использовать его в средствах для местного и наружного применения без добавления стабилизаторов или корректоров pH.

Условия хранения и восстановления выделенных СМСК могут влиять на такие характеристики, как стабильность, количество частиц, агрегация и фармакологический эффект.

Стабильность биологических препаратов снижается со временем при хранении. Необходимо определять физико-химические и биологические свойства каждого СМСК при хранении в течение различного времени (например, 1, 3, 6 месяцев) в условиях ускоренного старения и стресс-тестах (температуры, относительной влажности, pH), чтобы понять закономерности разложения и определить пределы стабильности. СМСК чувствительны к изменениям pH: присутствие в растворах электролитов может вызвать агрегацию экзосомных везикул и потерю функции [18]. Для хранения СМСК рекомендуется использовать изотонические буферы, чтобы предотвратить изменение pH во время хранения, замораживания и оттаивания.

СМСК рекомендуется хранить в условиях глубокой заморозки – при температуре до –80 °C. Некоторые авторы [27] описывают условия хранения при –20 °C и при +4 °C, что, по их данным, не влияло активность СМСК. Ингибиторы протеазы были добавлены к секретомам лишь в нескольких исследованиях [24, 28].

Питательные среды для культивирования клеток могут оказывать влияние на способность МСК к адгезии и росту и быть положительно селективными по отношению к специфическим субпопуляциям МСК [29, 30].

Г. Сагарадзе и соавт. заметили, что концентрация факторов различается между СМСК с двумя разными питательными средами [31]. В отличие от них J. Czapla и соавт. обнаружили, что МСК, которые культивировались в трех различных средах, наоборот, демонстрируют сходные профили секреции [32]. Наиболее распространенной альтернативой фетальной бычьей сыворотке для культивирования является человеческая сыворотка и ее производные (например, лизат тромбоцитов человека) [33, 34], однако их влияние на иммуномодулирующую способность МСК и его воспроизводимость по-прежнему остаются спорными [35]. Все эти вопросы затрудняют валидацию процессов, соответствующих требованиям GMP, для получения продуктов на основе секретома МСК.

Наиболее приемлемыми являются бессывороточные или химически определенные среды, которые не содержат ни сывороток, ни каких-либо гидролизатов и добавок неизвестного состава [34]. Интересно, что бессывороточные культуры МСК выделяют больше ангиогенных факторов [36, 37]. Кроме того, в исследовании [38] СМСК, полученные на сывороточных средах, были токсичны для клеток при использовании в неразбавленном виде (100 % концентрация) [38].

Характеристика секретома необходима для обеспечения воспроизводимости метода производства и выполнения нормативных требований, связанных с качеством, безопасностью и эффективностью. Основным методом, используемым для изучения экспрессии секретома МСК *in vitro*, является разделение с последующей идентификацией белка с помощью масс-спектрометрии, а также других иммунологических анализов [39]. Определение характеристик СМСК с использованием методов, основанных на антителах, предоставляет к изучению лишь узкий спектр факторов, секретируемых МСК [40]. Глобальные протеомные подходы позволили бы лучше понять потенциальную сложность СМСК с финальной целью получения четкого и определенного профиля для надлежащего использования каждой МСК [40].

Все эти методы могут быть применимы в стандартизации производства СМСК и его производных, несмотря на различия в источнике МСК, донорах, росте клеток, количестве пассажей клеток, периоде кондиционирования, среде культивирования клеток, условиях микроокружения и очистке продуктов, полученных из секретомных клеток (рисунок 2).

Проблемы усиления проницаемости кожного покрова при трансдермальной доставке СМСК

Эффективный транспорт активных молекул через неповрежденную кожу до сих пор является сложной задачей для исследователей. Защитные функции кожного покрова не позволяют достигать желаемой биодоступности при наружном применении, что ограничивает исследователей в использовании этого удобного и простого способа введения.

Классическим технологическим подходом к усилению проницаемости является использование активаторов всасывания (пенетраторов, энхансеров) в составе трансдермальных препаратов [41]. Эти вспомогательные вещества зачастую действуют по механизму растворения кожных липидов, увеличения гидратации и гидрофильности рогового слоя, что позволяет растворенным АФИ проникать в более глубокие слои кожи. К эффективным активаторам всасывания относятся спирты, амиды, амины, эфирные масла и др.

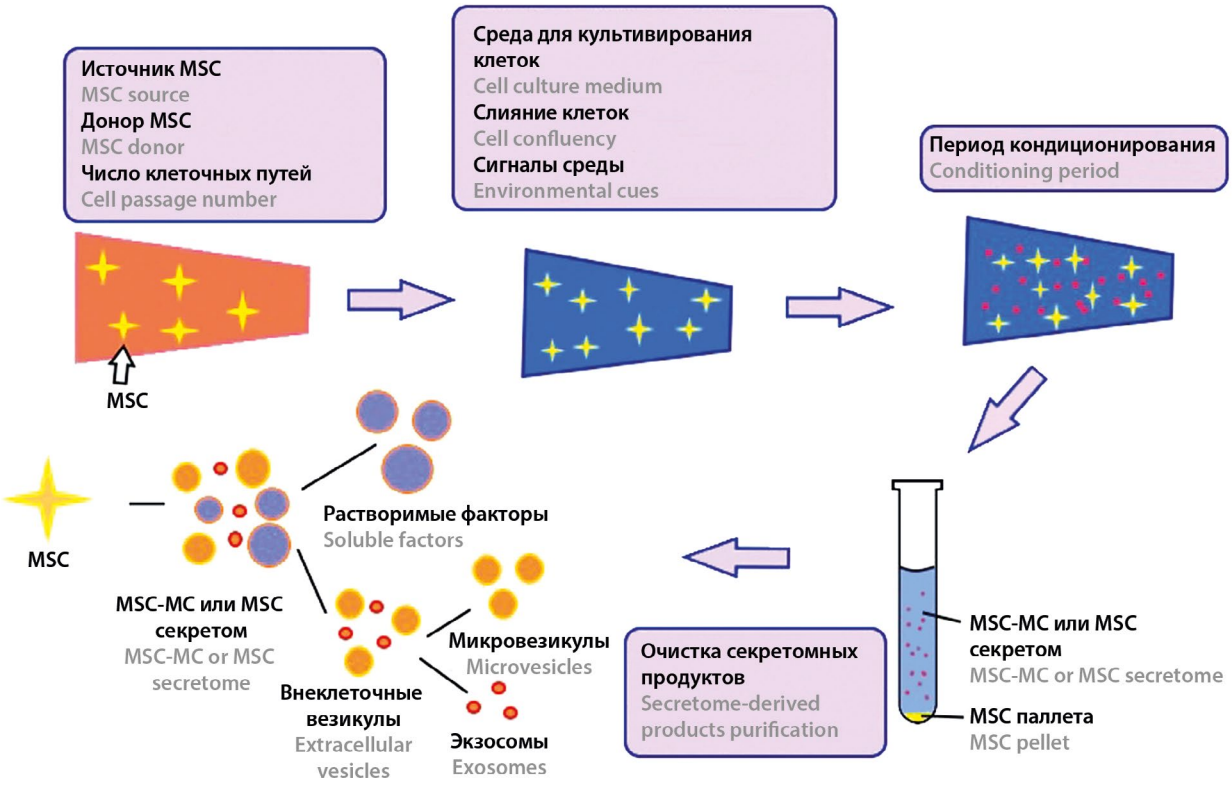


Рисунок 2. **Схема процедуры получения секретома мезенхимальных стволовых клеток (MSC-CM)**

Figure 2. **Schematic representation of the procedure for obtaining the secretome from mesenchymal stem cells (MSC-CM)**

Многочисленными исследованиями продемонстрировано отсутствие значимых различий в глубине пенетрации АФИ через кожу после механического на нее воздействия – с помощью роллеров или массажа [42].

Решением проблемы подкожного транспорта является использование технологии микроигл [43]. В исследовании 2023 года для заживления диабетических ран использовали микроиглы, состоящие из экзосом МСК, инкапсулированных в наконечники микроигл с гидрогелевым поливиниловым спиртом [44]. Еще одно современное направление в трансдермальной доставке – это развивающаяся технология биоразлагаемых микроигл. Подобные системы трансдермальной доставки, разработанные на основе природных полимеров, таких как альгинаты, хитозан, хондроитина сульфат, ксантановая камедь, коллаген и гиалуроновая кислота, помогают достигать контролируемого высвобождения и повышенной биодоступности при трансдермальном применении [45].

Местное применение секретома требует носителя, такого как разлагаемые частицы, или может быть выполнено с использованием гидрогеля. Гидрогели представляют собой коллоидные структуры, которые имеют сходство с внеклеточными матрицами и полностью биосовместимы. Они являются отличными носителями для применения СМСК в регенеративной медицине [40].

Липосомы, экзосомы и прочие микро- и наносистемы доставки, характеризующиеся, как и биологические мембраны, двойным фосфолипидным слоем, обеспечивающим их сродство к тканям и улучшенные характеристики доставки АФИ, тем не менее при наружном нанесении не проникают глубже рогового слоя (рисунок 3).

В исследовании группы ученых из Сингапура [46] экзосомы СМСК были помечены флуоресцентным красителем и местно нанесены на поверхность неповрежденной кожи человека в эксплантных культурах в формах водного раствора и крема типа «масло в воде». В течение 2 ч флуоресценция локализовалась в основном в роговом слое и не касалась зернистого слоя эпидермиса. При криосекциях флуоресценция снова была в значительной степени ограничена роговым слоем и была максимальной через 12 ч, в зернистом слое флуоресценция не наблюдалась через 12 и 24 ч.

Таким образом, экзосомы, как и липосомы, не могут быть рассмотрены в качестве единственного эффективного чрескожного транспорта для СМСК, из чего следует перспектива использования их комбинаций с другими методами пенетрации.

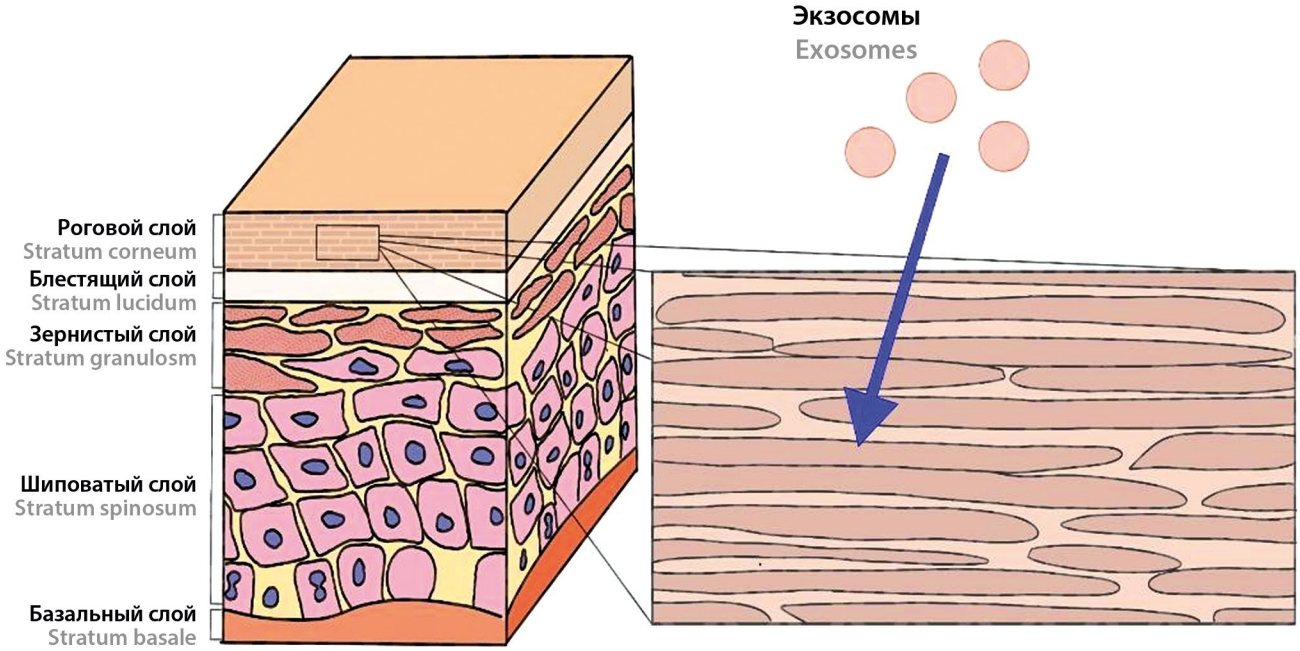


Рисунок 3. **Проникновение экзосом в роговой слой кожи**

Figure 3. **Penetration of exosomes into the stratum corneum of the skin**

Перспективы применения СМСК в регенеративной медицине

Наиболее изученным на сегодняшний день способом применения СМСК в медицине является наружное применение для лечения дерматологических проблем и применения в регенеративной медицине.

СМСК выделяет различные типы ФР, которые стимулируют регенерацию кожи человека (рисунок 4), а также способствует синтезу проколлагена и коллагена, что подтверждалось с помощью ПЦР [47–49].

Стволовые клетки и их секретомы уже несколько десятилетий изучают в качестве перспективного инструмента для регенеративной медицины. Показан их потенциал как ранозаживляющих агентов. Во многих исследованиях на обычных и диабетических ранах, а также ранах от ожогов СМСК показал лучшие результаты с точки зрения закрытия раны, реэпителизации и формирования сосудов [50–54].

В клиническом исследовании (2018 г.) для лечения хронических подошвенных язв при лепре был использован СМСК из амниотической мембраны человека в комбинации с витамином Е, что стало наиболее эффективным средством лечения [55].

СМСК имеет перспективы в лечении и предотвращении появления келоидных и гипертрофических рубцов [56]. Большинство исследований касалось использования мышей в качестве биологической модели, известно также исследование на кроликах: подопытным животным секретом вводился подкожно, внутривенно или внутриочагово [57]. Во всех проведенных экспериментах было показано, что кондиционная среда имела лучшие результаты по сравнению с другими видами лечения с точки зрения объемов рубцовой ткани, отложения коллагеновых волокон и фиброза кожи [56, 57]. Также проводились клинические исследования эффективности комплексной терапии СМСК в комбинации с лазерной терапией на рубцах от угревой сыпи, в результате чего были показаны преимущества использования СМСК [58].

В ряде публикаций [59, 60] исследовалось влияние на ишемические раны на биологической модели мышей. После терапии СМСК было отмечено улучшенное восстановление кожного покрова, уменьшение площади некроза, увеличение роста волос и стимуляция ангиогенеза по сравнению с контрольным исследованием.

Изучены экзосомы, полученные из МСК жировой ткани человека, которые были выделены ультрацентрифугированием. Для инкапсуляции использовали инъекционный, биосовместимый и термочувствительный гидрогель Pluronic F-127, полученный комплекс местно наносили на рану мышиной модели. В разные дни после трансплантации мышей умерщвляли, а кожную ткань иссекали для гистологического иммуногистохимического анализа. В результате было показано, что комплексы улучшают заживление кожных ран, способствуют реэпителизации, способствуют синтезу коллагена, повышают экспрессию белков кожного барьера и уменьшают воспаление [61].

Рисунок 4. **Влияние секретома мезенхимальных стволовых клеток на процессы регенерации кожи человека**

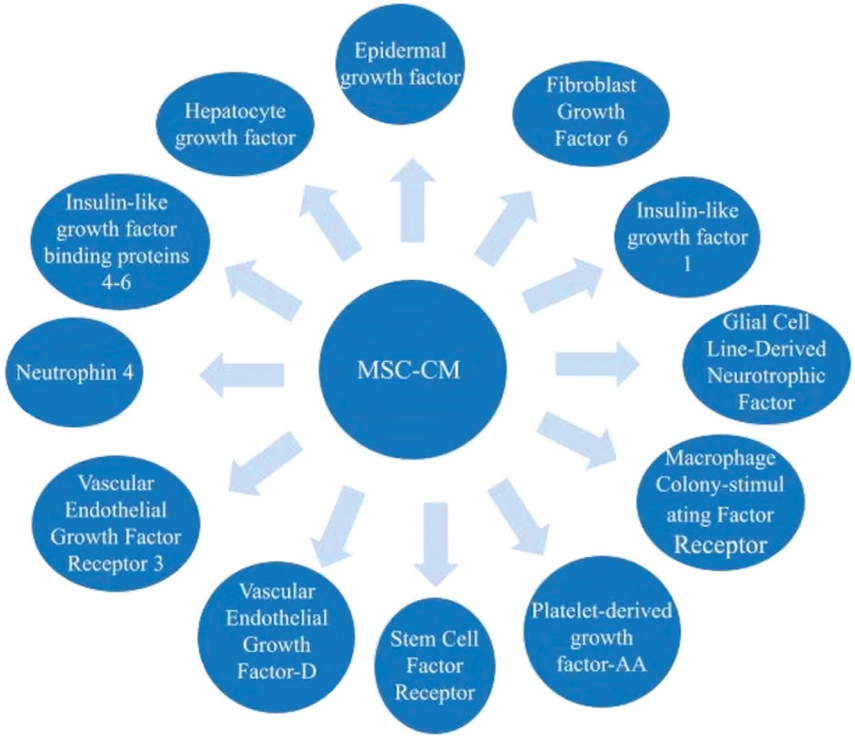


Figure 4. **The effect of mesenchymal stem cells secretome on human skin regeneration process**

Группа ученых из университета Гуанджоу (Китай) проводила похожее исследование: они местно наносили экзосомы, полученные из МСК пуповины человека, инкапсулированные в термочувствительный гидрогель Pluronic F-127, на кожную рану на модели крыс с диабетом, индуцированным стрептозотоцином [62]. По сравнению с экзосомами МСК, плацебо-гидрогелем или контрольным лечением комбинация Pluronic F-127 и экзосом МСК приводила к значительному ускорению заживления ран, повышению экспрессии, усиленной регенерации грануляционной ткани и усилению регуляции экспрессии фактора роста эндотелия сосудов и трансформирующего фактора роста бета-1 [62].

Обнаружено, что МСК, полученные из жировой ткани крысы, секретируют ангиогенные факторы (фактор роста эндотелия сосудов), фактор роста гепатоцитов и основной фактор роста фибробластов *in vitro* и *in vivo*, что приводит к повышенной неоваскуляризации и улучшенному закрытию раны на модели диабетических крыс за счет секреции хемокинов, воспалительных цитокинов и иммунных факторов [63]. Также D. Shanshan и соавт. отметили, что улучшенная доставка МСК может быть достигнута с использованием каркасов и трансплантатов, которые имитируют или сохраняют архитектуру естественных тканей человека. После нанесения дермального микротрансплантата – коллагенового каркасного биокомплекса – на место язв в образцах кожи наблюдается повышение уровня инсулиноподобного фактора роста по сравнению с образцами здоровой кожи. Лечение язв данным биокомплексом привело к улучшению заживления ран и улучшению качества жизни пациентов [63].

Известно исследование ученых из Индонезии по изучению влияния комплекса МСК и фактора некроза опухоли α в составе геля для местного применения на ускорение оптимального заживления раны. Было выявлено, что гель для местного применения с содержанием комплекса МСК и фактора некроза опухоли α более эффективен в ускорении заживления раны за счет увеличения уровней фактора роста тромбоцитов и процента закрытия раны, а также плотности фибробластов [64].

Применение СМСК в терапии дерматологических воспалительных заболеваний

В дерматологии СМСК применяется в составе экспериментальной терапии пациентов с псориазом и атопическим дерматитом. Необходимо отметить, что в отличие от регенеративной медицины накоплен еще недостаточный опыт использования СМСК в лечении дерматологических заболеваний: во всем мире продолжаются как клинические исследования, так и исследования на животных моделях.

Bin Zhang и соавт. исследовали, может ли местное применение экзосом МСК облегчить воспаление, связанное с псориазом [65]. Местное нанесение флуоресцентных экзосом на эксплантаты кожи человека ограничивалось главным образом роговым слоем, при этом входящая флуоресценция составляла менее 1 %, выходя из эксплантата в течение 24-часового периода. Авторы исследования предполагают, что экзосомы МСК, применяемые местно, ингибируют активацию комплемента в роговом слое и это уменьшает высвобождение IL-17 внеклеточных ловушек нейтрофильных клеток из нейтрофилов, которые накапливаются в роговом слое и под ним [65].

В клиническом исследовании R. Seetharaman и соавт. МСК были получены из жировой ткани, извлечены и концентрированы. При нанесении кондиционной среды один раз в день в течение месяца на пораженные участки выраженность покраснений значительно уменьшилась. Положительные эффекты наблюдались в течение 6 месяцев после окончания лечения [66]. Вместе с тем в исследовании 2022 года было показано, что подкожная инъекция СМСК из пуповины человека значительно подавляла пролиферацию эпидермиса и уменьшала площадь псориаза и показатели индекса тяжести у мышей, индуцированных имиквимодом [67].

Известны исследования эффективности использования СМСК в терапии атопического дерматита. В экспериментах в качестве активного ингредиента использовали секретом и выделенные из него экзосомы.

В работе H. S. Park и соавт. изучали воздействие кондиционной среды на мышиных моделях с атопическим дерматитом [68]. Лечение состояло в подкожных инъекциях каждые три дня физиологическим раствором, МСК, секретомом МСК и 2,5 % лосьоном кортизона. В результате обнаружено, что индекс тяжести (оцененный SCORAD) был ниже в группах, получавших терапию МСК, СМСК или лосьоном кортизона. Уменьшение толщины кожи отмечено одинаковым между этими группами, но больше, чем в группе контроля, получавшей физиологический раствор. Аналогичным образом инфильтрация тучных клеток была снижена в группах лечения МСК, секретомом МСК или лосьоном кортизона.

В 2020 году проводилось клиническое исследование, в котором участвовало 28 пациентов с атопическим дерматитом. Они получали СМСК в составе кремов на протяжении 4 недель и должны были наносить на поврежденные участки кожи, а также на неповрежденные дважды в день. После лечения увлажнение рогового слоя увеличилось на 15,67 условных единиц (AU). Более того, трансэпидермальная потеря воды снизилась на 15,09 г/ $м^2/ч^{-1}$ AU на экзематозных поражениях и на 3,08 г/$м^2/ч^{-1}$ на неповрежденной коже [69].

В исследованиях B. S. Cho и соавт. на мышиной модели атопического дерматита подкожное и внутривенное введение экзосом СМСК из жировой ткани смягчало симптомы и снижало уровни IgE в сыворотке крови дозозависимым образом. При поражениях, подобных атопическому дерматиту, экзосомы СМСК уменьшали количество клеток CD86+, тучных клеток и клеток CD206+ [70].

Влияние СМСК на восстановление волос изучалось в ряде других работ [71–73]. При использовании СМСК из волосяных фолликул человека, жировой ткани, а также амниотической жидкости, молочных зубов человека и мышиного костного мозга у подопытных животных наблюдался рост волос. Авторы исследований полагали, что СМСК воздействовал на процессы, стимулируя пролиферацию клеток кожных сосочков, ускоряя переход от телогена к анагену и способствуя неоваскуляризации.

Для определения потенциала использования СМСК в лечении алопеции было проведено четыре клинических исследования [74]. Для получения кондиционной среды использованы МСК жировой ткани и пуповинной крови человека. В исследованиях было задействовано 100 человек, как мужчин, так и женщин, с диагнозом андрогенная алопеция. В двух обсервационных исследованиях использовались внутрикожные инъекции человеческого СМСК жировой ткани и было отмечено, что плотность волос увеличилась на 17,3 волоска/см^{2,} а толщина волос увеличилась на 6,5 мкм по сравнению с исходным уровнем [74, 75]. В этих исследованиях не сообщалось о каких-либо серьезных побочных явлениях.

СМСК в препаратах, космецевтических продуктах и средствах для медицинского применения

Регенерация соединительной ткани как одно из основных направлений использования СМСК находит применение в лекарственных и космецевтических средствах для обновления эпидермиса, регенерации кожного покрова, как поврежденного внешним воздействием (ультрафиолет, активные формы кислорода, температура, механические повреждения, загрязнения), так и подверженного процессам естественного старения. ФР и цитокины, присутствующие в кондиционной среде, играют роль в клеточном делении, росте новых клеток и усиливают синтез коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты. Синтез коллагена помогает поддерживать эластичность кожи [76].

В нескольких исследованиях оценивалось влияние кондиционной среды на регенерацию кожи на мышиных моделях с кожным покровом, поврежденным ультрафиолетовым излучением [77]. СМСК был получен из пуповинной крови человека, костного мозга, зубной пульпы. Применение кондиционной среды привело к сокращению уровня морщин, улучшению показателей трансэпидермальной потери воды и гидратации рогового слоя и увеличило количество коллагеновых волокон по сравнению с физиологическим раствором фосфатного буфера.

Y. J. Kim и соавт. проводили клинические исследования на пациентах с морщинами или рубцами от акне [78]. У части пациентов, получивших наружную терапию СМСК, возросла удовлетворенность и улучшились клинические показатели трансэпидермальной потери воды, гидратации рогового слоя, эластичности, шероховатости и плотности коллагена по сравнению с контрольной группой, получавшей только лазерную терапию.

В долгосрочных исследованиях на здоровых добровольцах при применении СМСК в форме крема в течение года отмечались улучшения состояния кожи: среднее содержание влаги увеличилось, трансэпидермальная потеря воды и кожные покраснения снизились, морщины и шероховатость стали менее заметны [79].

Кроме того, проводилось исследование, в котором ученые пытались выяснить, могут ли спикулы морской губки *Haliclona* sp. эффективно усиливать доставку в кожу экзосом МСК, полученных из пуповины человека, и дополнительно оценить местное применение экзосом МСК в сочетании со спикулами для омоложения кожи мышей, подвергшейся фотостарению [80]. Результаты *in vitro* показали, что экзосомы МСК сами по себе не могут легко проникать через кожу свиньи, но они увеличивали поглощение экзосом кожей в 5,87 раза за счет создания микроканалов, что было показано на модели мышей [80]. Таким образом, комбинированное применение продемонстрировало значительные эффекты против фотостарения у мышей, включая уменьшение микроморщинок, смягчение гистопатологических изменений и стимулирование экспрессии компонентов внеклеточного матрикса [80].

До 2017 года использование СМСК, как и других клеточных продуктов в препаратах для медицинского применения в Российской Федерации, было ограничено отсутствием надлежащей нормативно-правовой базы. Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» (с изменениями и дополнениями) установил и разъяснил правила производства, контроля качества, транспортировки, дистрибьюции и утилизации биомедицинских клеточных продуктов на территории РФ. В 2022 году Федеральным законом «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» от 08.03.2022 № 46-ФЗ (последняя редакция) были также установлены особенности обращения биомедицинских клеточных продуктов, в том числе особенности их государственной регистрации, в случае применения в отношении РФ мер ограничительного характера.

Все эти меры призваны способствовать регистрации и внедрению в клиническую практику собственных отечественных препаратов на основе клеточных

Таблица 2. Использование СМСК в препаратах, космецевтических продуктах и средствах для медицинского применения

Table 2. Use of MSC-CM in drugs, cosmeceutical products and products for medical use

Название, производитель Product, company	**Характеристика** Specification	**Вид СМСК** Conditioned Medium Source
«Лаксавитар» (ООО НПО «Инновационные клеточные технологии», Россия) "Laksavitar" (LLC Scientific and Production Association "Innovation Cell Technologies", Russia)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК костного мозга BM-MSC-CM
«Репарин-Хелпер» (ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии», Россия) "Reparin-helper" (LLC "T-Helper Cell Technologies", Russia)	Препарат для ветеринарного применения Veterinary drug	CMCKD-SCR05 D-SCR05 MSC-CM
«Stem Cells Collection» (Компания «Крымская натуральная коллекция», Россия) "Stem Cells Collection" (Company "Crimea Natural collection", Russia)	Косметическое средство Cosmetic product	СК растений Plant derived MSC-CM
«Zooskin» (ООО «Новистем», Россия) "Zooskin" (LLC "NoviStem", Russia)	Средство зоокосметическое по уходу за животными Cosmetic product for veterinary use	СМСК коров Bovine MSC-CM
«Bovistem» (ООО «Новистем», Россия) "Bovistem" (LLC "NoviStem", Russia)	Препарат ветеринарного применения Veterinary drug	СМСК крупного рогатого скота Cattle MSC-CM
"Jawan: Cellular Rejuvenation Serum" (Celprogen, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК жировой ткани AD-MSC-CM
"ADIOStem" (Celprogen, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК жировой ткани AD-MSC-CM
"LUMINESCETM cellular rejuvenation serum" (Jeunesse, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК жировой ткани AD-MSC-CM
"Osmosis stem factor serum" (Osmosis Pur medical Skincare, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК человеческих фибробластов HFB-MSC-CM
"AQ Active Serum" (AQ skin solutions, USA)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК человеческих фибробластов HFB-MSC-CM
"Dr. Mary Stem cell wrinkle serum" (Medon Co. Ltd, South Korea)	Косметическое средство Cosmetic product	СМСК человеческого костного мозга BM-MSC-CM

продуктов. Однако ввиду сложной стандартизации и валидации производственных процессов в отношении подобных препаратов их появления на фармацевтическом рынке Российской Федерации можно ожидать лишь через некоторое время.

На сегодняшний день в Российской Федерации производятся продукты, относящиеся к косметическим средствам, ветеринарным и зоокосметическим препаратам (таблица 2).

Специалистами в области правового регулирования биотехнологической и фармацевтической отраслей отмечается, что менее жесткие требования и меры в отношении клеточных продуктов (например, в Южной Корее и Австралии) приводят к быстрому появлению на рынке этих стран новых препаратов и изделий со стволовыми клетками, что, безусловно, обеспечивает создание там прорывных технологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно данным, рассмотренным в этом обзоре, применение секретома мезенхимальных стволовых клеток является перспективным вариантом лечения благодаря характеру действия и относительной безопасности и может использоваться медицинскими работниками для лечения широкого спектра заболеваний. Терапия СМСК имеет многообещающие перспективы, поскольку позволяет учесть все ограничения терапии живыми стволовыми клетками.

Применение СМСК также может оказаться более безопасным и эффективным методом для потенциального лечения широкого спектра острых и хронических заболеваний. Но при этом трудности в стандартизации и серийном производстве осложняют масштабное использование кондиционной среды в терапии.

Несмотря на большое количество положительных результатов использования СМСК в заживлении ран на животных, а также клинических исследованиях по изучению влияния на регенерацию кожи, необходимы дальнейшие исследования, чтобы подтвердить безопасность и эффективность, а также стандартизировать производство.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Teixeira F. G., Salgado A. J. Mesenchymal stem cells secretome: current trends and future challenges. *Neural Regeneration Research*. 2020;15(1):75–77. DOI: 10.4103/1673-5374.264455.
2. Madrigal M., Rao K. S., Riordan N. H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12(1):260. DOI: 10.1186/s12967-014-0260-8.
3. Patel G. K., Khan M. A., Zubair H., Srivastava S. K., Khushman M., Singh S., Singh A. P. Comparative analysis of exosome isolation

methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific Reports*. 2019;9(1):5335. DOI: 10.1038/s41598-019-41800-2.
4. Vizoso F. J., Eiro N., Cid S., Schneider J., Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(9):1852. DOI: 10.3390/ijms18091852.
5. Yang C.-Y., Chang P.-Y., Chen J.-Y., Wu B.-S., Yang A.-H., Lee O. K.-S. Adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate dialysis-induced peritoneal fibrosis by modulating macrophage polarization via interleukin-6. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021;12(1):193. DOI: 10.1186/s13287-021-02270-4.
6. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
7. Bogatcheva N. V., Coleman M. E. Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. *Biochemistry*. 2019;84(11):1701–1717. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0006297919110129.
8. Chimenti I., Smith R. R., Li T.-S., Gerstenblith G., Messina E., Giacomello A., Marbán E. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circulation Research*. 2010;106(5):971–980. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.210682.
9. Achilli T.-M., Meyer J., Morgan J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012;12(10):1347–1360. DOI: 10.1517/14712598.2012.707181.
10. Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(3):5517–5527. DOI: 10.3390/ijms16035517.
11. Egger D., Tripisciano C., Weber V., Dominici M., Kasper C. Dynamic cultivation of mesenchymal stem cell aggregates. *Bioengineering (Basel)*. 2018;5(2):48. DOI: 10.3390/bioengineering5020048.
12. Huang S.-W., Tzeng S.-C., Chen J.-K., Sun J.-S., Lin F.-H. A dynamic hanging-drop system for mesenchymal stem cell culture. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(12):4298. DOI: 10.3390/ijms21124298.
13. Fuentes P., Torres M. J., Arancibia R., Aulestia F., Vergara M., Carrión F., Osses N., Altamirano C. Dynamic culture of mesenchymal stromal/stem cell spheroids and secretion of paracrine factors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:916229. DOI: 10.3389/fbioe.2022.916229.
14. Lee B.-C., Kang K.-S. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. *Stem Cell Research & Therapy* 2020;11(1):397. DOI: 10.1186/s13287-020-01920-3.
15. Park K.-S., Bandeira E., Shelke G. V., Lässer C., Lötvall J. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):288. DOI: 10.1186/s13287-019-1398-3.
16. Han H.-W., Asano S., Hsu S.-H. Cellular spheroids of mesenchymal stem cells and their perspectives in future healthcare. *Applied Sciences*. 2019;9(4):627. DOI: 10.3390/app9040627.
17. Bari E., Perteghella S., Di Silvestre D., Sorlini M., Catenacci L., Sorrenti M., Marrubini G., Rossi R., Tripodo G., Mauri P., Marazzi M., Torre M. L. Pilot production of mesenchymal stem/stromal freeze-dried secretome for cell-free regenerative nanomedicine: a validated GMP-Compliant process. *Cells*. 2018;7(11):190. DOI: 10.3390/cells7110190.
18. Lui P. P. Y., Leung Y. T. Practical considerations for translating mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles from bench to bed. *Pharmaceutics*. 2022;14(8):1684. DOI: 10.3390/pharmaceutics14081684.
19. Costa L. A., Eiro N., Fraile M., Gonzalez L. O., Saá J., Garcia-Portabella P., Vega B., Schneider J., Vizoso F. J. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021;78(2):447–467. DOI: 10.1007/s00018-020-03600-0.
20. Kim K. H., Kim Y.-S., Lee S., An S. The effect of three-dimensional cultured adipose tissue-derived mesenchymal stem cell–conditioned medium and the antiaging effect of cosmetic products containing the medium. *Biomedical Dermatology*. 2019;4(1):1. DOI: 10.1186/s41702-019-0053-z.
21. Carlomagno C., Giannasi C., Niada S., Bedoni M., Gualerzi A., Brini A. T. Raman fingerprint of extracellular vesicles and conditioned media for the reproducibility assessment of cell-free therapeutics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:640617. DOI: 10.3389/fbioe.2021.640617.
22. Wei X., Liu F., Zhang S., Xu X., Li J., Wang Q., Cai J., Wang S. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived conditioned medium promotes human endometrial cell proliferation through wnt/β-catenin signaling. *BioMed Research International*. 2022;2022:8796093. DOI: 10.1155/2022/8796093.
23. Habibian A., Soleimanjahi H., Hashemi S. M., Babashah S. Characterization and comparison of mesenchymal stem cell-derived exosome isolation methods using culture supernatant. *Archives of Razi Institute*. 2022;77(4):1383–1388. DOI: 10.22092/ARI.2021.356141.1790.
24. Wright A., Snyder O. L., Christenson L. K., He H., Weiss M. L. Effect of pre-processing storage condition of cell culture-conditioned medium on extracellular vesicles derived from human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(14):7716. DOI: 10.3390/ijms23147716.
25. Casati S., Giannasi C., Minoli M., Niada S., Ravelli A., Angeli I., Mergenthaler V., Ottria R., Ciuffreda P., Orioli M., Brini A. T. Quantitative lipidomic analysis of osteosarcoma cell-drived products by UHPLC-MS/MS. *Biomolecules*. 2020;10(9):1302. DOI: 10.3390/biom10091302.
26. Bhat S., Amirthalingam M., Ballambat S. P., Bhupasandra Vasudev M., Gupta P. K., Singh Padya B., Mutalik S., Seetharam R. N. Novel bioactive formulation derived from the conditioned medium of mesenchymal stromal cells reduces under-eye dark circles in human volunteers. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2021;21(2):814–826. DOI: 10.1111/jocd.14145.
27. Tsuruta T., Sakai K., Watanabe J., Katagiri W., Hibi H. Dental pulp-derived stem cell conditioned medium to regenerate peripheral nerves in a novel animal model of dysphagia. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208938. DOI: 10.1371/journal.pone.0208938.
28. Chouaib B., Cuisinier F., Collart-Dutilleul P.-Y. Dental stem cell-conditioned medium for tissue regeneration: optimization of production and storage. *World Journal of Stem Cells*. 2022;14(4):287–302. DOI: 10.4252/wjsc.v14.i4.287.
29. Riis S., Nielsen F. M., Pennisi C. P., Zachar V., Fink T. Comparative analysis of media and supplements on initiation and expansion of adipose-derived stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 2016;5(3):314–324. DOI: 10.5966/sctm.2015-0148.
30. Hagmann S., Moradi B., Frank S., Dreher T., Kämmerer P. W., Richter W., Gotterbarm T. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2013;14:223. DOI: 10.1186/1471-2474-14-223.
31. Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Kalinina N., Akopyan Z., Efimenko A. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(7):1656. DOI: 10.3390/ijms20071656.
32. Czapla J., Matuszczak S., Kulik K., Wisniewska E., Pilny E., Jarosz-Biej M., Smolarczyk R., Sirek T., Zembala M. O., Zembala M., Szala S., Cichoń T. The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10:235. DOI: 10.1186/s13287-019-1331-9.
33. Mendicino M., Bailey A.M., Wonnacott K., Puri R. K., Bauer S. R. MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective. *Cell Stem Cell*. 2014;14:141–145. DOI: 10.1016/j.stem.2014.01.013.
34. Barekzai J., Petry F., Zitzmann J., Czermak P., Salzig D. Bioprocess development for human mesenchymal stem cell therapy products. In: Martínez-Espinosa R. M., editor. New Advances on Fermentation Processes. London: IntechOpen; 2019. DOI: 10.5772/intechopen.90029.

35. Panchalingam K. M., Jung S., Rosenberg L., Behie L. A. Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6:225. DOI: 10.1186/s13287-015-0228-5.
36. Qu C., Brohlin M., Kingham, P. J., Kelk P. Evaluation of growth, stemness, and angiogenic properties of dental pulp stem cells cultured in cGMP xeno-/serum-free medium. *Cell and Tissue Research*. 2020;380:93–105. DOI: 10.1007/s00441-019-03160-1.
37. Oskowitz A., McFerrin H., Gutschow M., Carter M. L., Pochampally R. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Research*. 2011;6(3):215–225. DOI: 10.1016/j.scr.2011.01.004.
38. Paschalidis T., Bakopoulou A., Papa P., Leyhausen G., Geurtsen W., Koidis P. Dental pulp stem cells' secretome enhances pulp repair processes and compensates TEGDMA-induced cytotoxicity. *Dental Materials*. 2014;30(12):e405–e418. DOI: 10.1016/j.dental.2014.08.377.
39. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterization of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*. 2013;95:2196–2211. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.07.015.
40. Chouaib B., Haack-Sørensen M., Chaubron F., Cuisinier F., Collart-Dutilleul P.-Y. Towards the Standardization of Mesenchymal Stem Cell Secretome-Derived Product Manufacturing for Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(16):12594. DOI: 10.3390/ijms241612594.
41. Kováčik A., Kopečná M., Vávrová K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2020;17(2):145–155. DOI: 10.1080/17425247.2020.1713087.
42. Zhang K., Yu L., Li F.-R., Li X., Wang Z., Zou X., Zhang C., Lv K., Zhou B., Mitragotri S., Chen M. Topical application of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells in combination with sponge spicules for treatment of photoaging. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:2859–2872. DOI: 10.2147/IJN.S249751.
43. Yang D., Chen M., Sun Y., Jin Y., Lu C., Pan X., Quan G., Wu C. Microneedle-mediated transdermal drug delivery for treating diverse skin diseases. *Acta Biomaterialia*. 2021;121:119–133. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.12.004.
44. Zhang X., Gan J., Fan L., Luo Z., Zhao Y. Bioinspired adaptable indwelling microneedles for treatment of diabetic ulcers. *Advanced Materials*. 2023;35(23):e2210903. DOI: 10.1002/adma.202210903.
45. Dabholkar N., Gorantla S., Waghule T., Rapalli V. K., Kothuru A., Goel S., Singhvi G. Biodegradable microneedles fabricated with carbohydrates and proteins: Revolutionary approach for transdermal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;170:602–621. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.177.
46. Zhang B., Lai R. C., Sim W. K., Choo A. B. H., Lane E. B., Lim S. K. Topical application of mesenchymal stem cell exosomes alleviates the imiquimod induced psoriasis-like inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(2):720. DOI: 10.3390/ijms22020720.
47. Kim K. H., Kim Y.-S., Lee S., An S. The effect of three-dimensional cultured adipose tissue-derived mesenchymal stem cell–conditioned medium and the antiaging effect of cosmetic products containing the medium. *Biomedical Dermatology*. 2019;4:1. DOI: 10.1186/s41702-019-0053-z.
48. Kim Y.-J., Seo D. H., Lee S. H., Lee S.-H., An G.-H., Ahn H.-J., Kwon D., Seo K.-W., Kang K.-S. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2018;16:96–102. DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.10.007.
49. Park Y. M., Lee M., Jeon S., Hrůzová D. In vitro effects of conditioned medium from bioreactor cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on skin-derived cell lines. *Regenerative Therapy*. 2021;18:281–291. DOI: 10.1016/j.reth.2021.08.003.
50. Zhang S., Chen L., Zhang G., Zhang B. Umbilical cord-matrix stem cells induce the functional restoration of vascular endothelial cells and enhance skin wound healing in diabetic mice via the polarized macrophages. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):39. DOI: 10.1186/s13287-020-1561-x.
51. De Gregorio C., Contador D., Díaz D., Cárcamo C., Santapau D., Lobos-Gonzalez L., Acosta C., Campero M., Carpio D., Gabriele C., Gaspari M., Aliaga-Tobar V., Maracaja-Coutinho V., Ezquer M., Ezquer F. Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium ameliorates polyneuropathy and foot ulceration in diabetic BKS db/db mice. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):168. DOI: 10.1186/s13287-020-01680-0.
52. Chen L., Cheng L., Wang Z., Zhang J., Mao X., Liu Z., Zhang Y., Cui W., Sun X. Conditioned medium-electrospun fiber biomaterials for skin regeneration. *Bioactive Materials*. 2021;6(2):361–374. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.08.022.
53. He D., Zhao F., Jiang H., Kang Y., Song Y., Lin X., Shi P, Zhang T., Pang X. LOXL2 from human amniotic mesenchymal stem cells accelerates wound epithelialization by promoting differentiation and migration of keratinocytes. *Aging*. 2020;12(13):12960–12986. DOI: 10.18632/aging.103384.
54. Zhou H., Li X., Yin Y., He X.-T., An Y., Tian B.-M., Hong Y.-L., Wu L.-A., Chen F.-M. The proangiogenic effects of extracellular vesicles secreted by dental pulp stem cells derived from periodontally compromised teeth. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):110. DOI: 10.1186/s13287-020-01614-w.
55. Prakoeswa C. R. S, Natallya F. R., Harnindya D., Thohiroh A., Oktaviyanti R. N., Pratiwi K. D., Rubianti M. A., Yogatri B., Primasari P. I., Herwanto N., Alinda M. D., Kusumaputra B. H., Astari L., Listiawan M. Y., Agusni I., Rantam F. A. The efficacy of topical human amniotic membrane-mesenchymal stem cell-conditioned medium (hAMMSC-CM) and a mixture of topical hAMMSC-CM + vitamin C and hAMMSC-CM + vitamin E on chronic plantar ulcers in leprosy:a randomized control trial. *Journal of Dermatological Treatment*. 2018;29(8):835–840. DOI: 10.1080/09546634.2018.1467541.
56. Arjunan S., Gan S. U., Choolani M., Raj V., Lim J., Biswas A., Bongso A., Fong C. Y. Inhibition of growth of Asian keloid cells with human umbilical cord Wharton's jelly stem cell-conditioned medium. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):78. DOI: 10.1186/s13287-020-01609-7.
57. Zhang Q., Liu L.-N., Yong Q., Deng J.-C., Cao W.-G. Intralesional injection of adipose-derived stem cells reduces hypertrophic scarring in a rabbit ear model. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6(1):145. DOI: 10.1186/s13287-015-0133-y.
58. Zhou B.-R., Zhang T., Bin Jameel A. A., Xu Y., Xu Y., Guo S.-l., Wang Y., Permatasari F., Luo D. The efficacy of conditioned media of adipose-derived stem cells combined with ablative carbon dioxide fractional resurfacing for atrophic acne scars and skin rejuvenation. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2016;18(3):138–148. DOI: 10.3109/14764172.2015.1114638.
59. Cooper D. R., Wang C., Patel R., Trujillo A., Patel N. A., Prather J., Gould L. J., Wu M. H. Human adipose-derived stem cell conditioned media and exosomes containing *MALAT1* promote human dermal fibroblast migration and ischemic wound healing. *Advances in Wound Care*. 2018;7(9):299–308. DOI: 10.1089/wound.2017.0775.
60. Pu C.-M., Chen Ya.-C., Chen Yu.-C., Lee T.-L., Peng Y.-S., Chen S.-H., Yen Y.-H., Chien C.-L., Hsieh J.-H., Chen Y.-L. Interleukin-6 from adipose-derived stem cells promotes tissue repair by the increase of cell proliferation and hair follicles in ischemia/reperfusion-treated skin flaps. *Mediators of Inflammation*. 2019;2019:2343867. DOI: 10.1155/2019/2343867.
61. Zhou Y., Zhang X.-L., Lu S.-T., Zhang N.-Y., Zhang H.-J., Zhang J., Zhang Ju. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):407. DOI: 10.1186/s13287-022-02980-3.
62. Yang J., Chen Z., Pan D., Li H., Shen J. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes combined pluronic F127 hydrogel promote chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:5911–5926. DOI: 10.2147/IJN.S249129.
63. Du S., Zeugolis D.I., O'Brien T. Scaffold-based delivery of mesenchymal stromal cells to diabetic wounds. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):426. DOI: 10.1186/s13287-022-03115-4.
64. Putra A., Ibrahim S., Muhar A. M., Kuntardjo N., Dirja B. T., Pasongka Z., Tunru I. S. Topical gel of mesenchymal stem cells-conditioned medium under TNF-α precondition accelerates wound closure healing in full-thickness skin defect animal model. *Journal of Medicine and Life*. 2022;15(2):214–221. DOI: 10.25122/jml-2019-0103.
65. Zhang B., Lai R. C., Sim W. K., Choo A. B. H., Lane E. B., Lim S. K. Topical application of mesenchymal stem cell exosomes alleviates the imiquimod induced psoriasis-like inflammation. *In-*

ternational Journal of Molecular Sciences. 2021;22(2):720. DOI: 10.3390/ijms22020720.
66. Seetharaman R., Mahmood A., Kshatriya P., Patel D., Srivastava A. Mesenchymal stem cell conditioned media ameliorate psoriasis vulgaris: a case study. *Case Reports in Dermatological Medicine*. 2019;2019:8309103. DOI: 10.1155/2019/8309103.
67. Zhang Y., Yan J., Li Z., Zheng J., Sun Q. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate psoriasis-like skin inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2022;42(1):8–18. DOI: 10.1089/jir.2021.0146.
68. Park H.-S., Son H.-Y., Choi M.-H., Son Y., Kim S., Hong H.-S., Park J.-U. Adipose-derived stem cells attenuate atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Experimental Dermatology*. 2019;28(3):300–307. DOI: 10.1111/exd.13895.
69. Kim Y.-J., Ahn H.-J., Lee S.-H., Lee M.-H., Kang K.-S. Effects of conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the skin immune response. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;131:110789. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110789.
70. Wang W.-M., Wu C., Jin H.-Z. Exosomes in chronic inflammatory skin diseases and skin tumors. *Experimental Dermatology*. 2019;28(3):213–218. DOI: 10.1111/exd.13857.
71. Choi N., Kim W.-S., Oh S. H., Sung J.-H. HB-EGF Improves the hair regenerative potential of adipose-derived stem cells via ROS generation and hck phosphorylation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;21(1):122. DOI: 10.3390/ijms21010122.
72. Park J., Jun E. K., Son D., Hong W., Jang J., Yun W., Yoon B. S., Song G., Kim I. Y., You S. Overexpression of nanog in amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates dermal papilla cell activity and promotes hair follicle regeneration. *Experimental & Molecular Medicine*. 2019;51(7):1–15. DOI: 10.1038/s12276-019-0266-7.
73. Gunawardena T. N. A., Masoudian Z., Rahman M. T., Ramasamy T. S., Ramanathan A., Abu Kasim N. H. Dental derived stem cell conditioned media for hair growth stimulation. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216003. DOI: 10.1371/journal.pone.0216003.
74. Oh H. A., Kwak J., Kim B. J., Jin H. J., Park W. S., Choi S. J., Oh W., Um S. Migration inhibitory factor in conditioned medium from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells stimulates hair growth. *Cells*. 2020;9(6):1344. DOI: 10.3390/cells9061344.
75. Narita K., Fukuoka H., Sekiyama T., Suga H., Harii K. Sequential scalp assessment in hair regeneration therapy using an adipose-derived stem cell-conditioned medium. *Dermatologic Surgery*. 2020;46(6):819–825. DOI: 10.1097/DSS.0000000000002128.
76. Noverina R., Widowati W., Ayuningtyas W., Kurniawan D., Afifah E., Laksmitawati D. R., Rinendyaputri R., Rilianawati R., Faried A., Bachtiar I., Wirakusumah F. F. Growth factors profile in conditioned medium human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (CM-hATMSCs). *Clinical Nutrition Experimental*. 2019;24:34–44. DOI: 10.1016/j.yclnex.2019.01.002.
77. Zhang K., Yu L., Li F.-R., Li X., Wang Z., Zou X., Zhang C., Lv K., Zhou B., Mitragotri S., Chen M. Topical application of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells in combination with sponge spicules for treatment of photoaging. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:2859–2872. DOI: 10.2147/IJN.S249751.
78. Kim Y.-J., Seo D. H., Lee S. H., Lee Su.-H., An G.-H., Ahn H.-J., Kwon D., Seo K.-W., Kang K.-S. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2018;16:96–102. DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.10.007.
79. Kim H. J., Jung M. S., Hur Y. K., Jung A. H. A study on clinical effectiveness of cosmetics containing human stem cell conditioned media. *Biomedical Dermatology*. 2020;4(1):9. DOI: 10.1186/s41702-020-0056-9.
80. Zhang K., Yu L., Li F.-R., Li X., Wang Z., Zou X., Zhang C., Lv K., Zhou B., Mitragotri S., Chen M. Topical Application of Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Combination with Sponge Spicules for Treatment of Photoaging. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15:2859–2872. DOI: 10.2147/IJN.S249751.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.19.071

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1715

Check for updates

CC BY 4.0

Профиль биологически активных веществ листьев аронии мичурина, произрастающей в условиях Центрального Черноземья

О. В. Тринеева✉, О. В., Пугачева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»). 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

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

ORCID: О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067; О. В. Пугачева – https://orcid.org/0009-0003-9170-3130.

Статья поступила: 07.01.2024 **Статья принята в печать:** 17.04.2024 **Статья опубликована:** 19.04.2024

Резюме

Введение. Арония Мичурина (*Aronia* × *mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul) – вид, полученный путем скрещивания аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) и рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.). Данное растение более широко известно в литературе как рябина черноплодная. Арония Мичурина активно культивируется на территории Российской Федерации (РФ) и стран ближнего зарубежья для получения основного сырья – плодов. Не следует путать рябину черноплодную с аронией черноплодной, которая не произрастает в диком виде и практически не культивируется в РФ ввиду несъедобности плодов и малого декоративного значения растения. Листья, в отличие от плодов, рябины черноплодной пока не используются в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС). Однако, по предварительным исследованиям, являются перспективным источником БАВ (дубильные вещества, флавоноиды, лейкоантоцианы, витамины, комплекс микроэлементов и др.), проявляющих вяжущую, антиокислительную и противовоспалительную активность. Поэтому актуальной задачей является разработка показателей подлинности сырья по присутствию основных групп БАВ, а также методик и нормативов их количественного содержания для формирования проекта нормативной документации на листья аронии Мичурина.

Цель. Целью исследования являлось изучение профиля биологически активных веществ листьев аронии Мичурина, произрастающей на территории Центрального Черноземья РФ, для определения целевых групп, определяющих фармакологическую активность данного сырья.

Материалы и методы. Листья аронии Мичурина для исследования заготавливали в период технической зрелости плодов (август – сентябрь 2023 г.) от растения, культивируемого на территории г. Мичуринска (Тамбовской области), и высушивали. Проводили первичный скрининг на присутствие отдельных групп БАВ в листьях аронии Мичурина, применяя известные качественные реакции. Состав флавоноидов определяли методом тонкослойной хроматографии. Количественное определение основных групп БАВ проводили по известным методикам с применением современных физико-химических методов спектрофотометрии и капиллярного электрофореза.

Результаты и обсуждение. В листьях аронии Мичурина обнаружены дубильные вещества, флавоноиды, спирторастворимые сапонины, лейкоантоцианы, аминокислоты, аскорбиновая кислота и полисахариды в форме слизей. Алкалоиды обнаружены не были. При ТСХ-анализе флавоноидов обнаруживалось не менее 4 зон адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета, одна из которых идентифицирована как рутин. Содержание тиамина в листьях составило 0,99 ± 0,084 мг/кг; рибофлавина – 0,43 ± 0,025 мг/кг; холина – 44,4 ± 3,9 мг/кг; экстрактивных веществ – 31,52 ± 0,22 %; суммы флавоноидов в пересчете на рутин – 3,48 ± 0,21 %; суммы дубильных веществ в пересчете на катехин – 8,63 ± 0,32 %; суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид – 11,62 ± 0,69 %. В листьях аронии Мичурина выявлено 17 аминокислот (суммарное содержание 5,88 %), 7 из них являются незаменимыми (2,71 %). Преобладающими аминокислотами являются лейцин и глутаминовая кислота – 18,37 и 10,88 % от суммарного содержания аминокислот соответственно. Определено также количественное содержание восьми свободных органических кислот (суммарное содержание 0,49 %). Преобладающими кислотами являются лимонная, яблочная и сорбиновая.

Заключение. В качестве целевых групп БАВ, отвечающих за фармакологическую активность аронии Мичурина листьев, наиболее рационально рассматривать комплекс полифенолов (флавоноиды, антоциановые соединения и дубильные вещества), содержание которых достаточно высоко. Согласно спектральным характеристикам доминирующими БАВ в сумме флавоноидов, дубильных веществ и антоцианов являются рутин, катехин и цианидин-3-О-глюкозид соответственно. Данный вид сырья может рассматривается как перспективный источник БАВ с целью дальнейшего получения лекарственных растительных препаратов с антиоксидантным, капилляропротекторным, вяжущим и противовоспалительным действием.

Ключевые слова: листья, арония Мичурина, *Aronia* × *mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul, рябина черноплодная, биологически активные вещества

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

Вклад авторов. О. В. Пугачева осуществляла заготовку и сушку образцов сырья, проводила пробоподготовку к проведению анализа и исследование химического состава листьев. О. В. Тринеева консультировала по полученным результатам, осуществляла написание текста статьи, разделов «Заключение» и «Обсуждение результатов».

Для цитирования: Тринеева О. В., Пугачева О. В. Профиль биологически активных веществ листьев аронии мичурина, произрастающей в условиях Центрального Черноземья. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):48–58. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1715

© Тринеева О. В., Пугачева О. В., 2024
© Trineeva O. V., Pugacheva O. V., 2024

Profile of biologically active substances of *Aronia mitschurinii* leaves growing in the conditions of the Central Black Earth region

Olga V. Trineeva✉, **Olga V. Pugacheva**

Voronezh State University. 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394018, Russia

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

ORCID: Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067; Olga V. Pugacheva – https://orcid.org/0009-0003-9170-3130.

Received: 07.01.2024 **Accepted:** 17.04.2024 **Published:** 19.04.2024

Abstract

Introduction. Aronia Mitschurinii (*Aronia* × *mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul) is a species obtained by crossing chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) and mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). This plant is more widely known in the literature as chokeberry. Mitschurin chokeberry is actively cultivated in the Russian Federation (RF) and neighboring countries to obtain the main raw material – fruits. Aronia should not be confused with chokeberry, which does not grow wild and is practically not cultivated in the Russian Federation due to the inedibility of the fruit and the low decorative value of the plant. The leaves, unlike the fruits, of Mitschurin chokeberry are not yet used as medicinal plant raw materials (MPR). However, according to preliminary studies, they are a promising source of biologically active substances (tannins, flavonoids, leukoanthocyanins, vitamins, a complex of microelements, etc.), exhibiting astringent, antioxidant and anti-inflammatory activities. Therefore, an urgent task is to develop indicators of the authenticity of raw materials based on the presence of the main groups of biologically active substances, as well as methods and standards for their quantitative content for the formation of draft regulatory documentation for Michurin chokeberry leaves.

Aim. The purpose of the study was to study the profile of biologically active substances of Michurin chokeberry leaves, growing in the territory of the Central Black Earth Region of the Russian Federation, to determine the target groups that determine the pharmacological activity of this raw material.

Materials and methods. Leaves of Michurin chokeberry for research were harvested during the period of technical maturity of the fruit (August – September 2023) from a plant cultivated in the city of Michurinsk (Tambov region) and dried. Primary screening was carried out for the presence of individual groups of biologically active substances in the leaves of Michurin chokeberry, using known qualitative reactions. The composition of flavonoids was determined by thin layer chromatography. Quantitative determination of the main groups of biologically active substances was carried out according to known methods using modern physicochemical methods of spectrophotometry and capillary electrophoresis.

Results and discussion. Tannins, flavonoids, alcohol-soluble saponins, leukoanthocyanins, amino acids, ascorbic acid and polysaccharides in the form of mucilage were found in the leaves of *Aronia mitschurinii*. No alkaloids were found. TLC analysis of flavonoids revealed at least 4 adsorption zones with yellow-green fluorescence, one of which was identified as rutin. The thiamine content in the leaves was 0.99 ± 0.084 mg/kg; riboflavin – 0.43 ± 0.025 mg/kg; choline – 44.4 ± 3.9 mg/kg; extractives – 31.52 ± 0.22 %; the amount of flavonoids in terms of rutin – 3.48 ± 0.21 %; the amount of tannins in terms of catechin – 8.63 ± 0.32 %; the amount of anthocyanins in terms of cyanidin-3-O-glucoside – 11.62 ± 0.69 %. In the leaves of *Aronia mitschurinii*, 17 amino acids were identified (total content 5.88 %), 7 of them are essential (2.71 %). The predominant amino acids are leucine and glutamic acid – 18.37 and 10.88 % of the total amino acid content, respectively. The quantitative content of eight free organic acids was also determined (total content 0.49 %). The predominant acids are citric, malic and sorbic.

Conclusion. As the target groups of biologically active substances responsible for the pharmacological activity of *Aronia mitschurinii* leaves, it is most rational to consider a complex of polyphenols (flavonoids, anthocyanin compounds and tannins), the content of which is quite high. According to the spectral characteristics, the dominant biologically active substances in the sum of flavonoids, tannins and anthocyanins are rutin, catechin and cyanidin-3-O-glucoside, respectively. This type of raw material can be considered as a promising source of biologically active substances for the purpose of further obtaining herbal plants preparations with antioxidant, capillary-protective, astringent and anti-inflammatory effects.

Keywords: leaves, *Aronia* × *mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul, biologically active substances

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

Contribution of the authors. Olga V. Pugacheva prepared and dried samples of raw materials, carried out sample preparation for analysis, and conducted studies of the chemical composition of leaves. Olga V. Trineeva wrote the text of the article, advised on the results obtained, wrote the conclusion and discussion of the results.

For citation: Trineeva O. V., Pugacheva O. V. Profile of biologically active substances of *Aronia mitschurinii* leaves growing in the conditions of the Central Black Earth region. *Drug development & registration*. 2024;13(2):48–58. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1715

ВВЕДЕНИЕ

Арония Мичурина (*Aronia* × *mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul), более широко известная как рябина черноплодная, представляет собой многолетний кустарник семейства розоцветные (*Rosaceae*), достаточно распространенный и активно культивируемый на территории России и стран ближнего зарубежья для получения основного сырья – плодов. Арония Мичурина (*Aronia* × *mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul) – вид, полученный путем скрещивания аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) и рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.). Данное растение более известно в литературе как рябина черноплодная. Не следует путать рябину черноплодную с аронией черноплодной, которая не произрастает в диком виде и практически не культивируется в РФ ввиду несъедобности плодов и малого декоративного значения растения [1, 2].

Плоды данного растения давно используются в народной и традиционной медицине, в связи с чем активно изучались на предмет химического состава [3–13]. Листья же рябины черноплодной, пока не используемые в качестве лекарственного растительного сырья (ЛРС), являющиеся побочным продуктом при заготовке плодов, также служат уникальным, по предварительным исследованиям [14–19], перспективным источником БАВ. Нормативная документация на листья аронии Мичурина в настоящее время отсутствует. В литературе имеется разрозненная информация о том, что листья содержат дубильные вещества, флавоноиды, лейкоантоцианы, витамины, комплекс микроэлементов и др., что подтверждает перспективность дальнейшего изучения данного сырья для получения лекарственных растительных препаратов (ЛРП), спектр действия которых будет основываться на вяжущей, антиокислительной и противовоспалительной активности. Основная масса исследований фармакологических свойств экстрактов плодов и листьев данного растения в настоящее время осуществляется за рубежом [20–43]. Часто в опубликованных исследованиях рябина черноплодная ошибочно называется авторами аронией черноплодной (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott). Поэтому актуальной задачей является разработка показателей подлинности сырья по присутствию основных групп БАВ, а также методик определения и нормативов их количественного содержания для формирования проекта нормативной документации на листья аронии Мичурина.

Целью исследования являлось изучение профиля биологически активных веществ листьев аронии Мичурина, произрастающей на территории Центрального Черноземья РФ, для определения целевых групп, определяющих фармакологическую активность данного сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Листья аронии Мичурина для исследования заготавливали в сухую погоду в период технической зрелости плодов (август – сентябрь 2023 г.) от растений, культивируемых на территории ФГБНУ «ФНЦ им. И. В. Мичурина» (г. Мичуринск, Тамбовская область), и высушивали на открытом воздухе в тени до остаточной влажности не более 10 %. Период сбора сырья обусловлен, по предварительным, ранее полученным нами данным [14–19], максимальным накоплением БАВ в листьях в выбранный период. Принадлежность образца к роду *Aronia*, виду *Aronia* × *mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul подтверждена сотрудниками научного центра имени И. В. Мичурина.

Для определения качественного состава БАВ готовили водные и водно-спиртовые извлечения из исследуемого сырья по типу настоя в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» для сырья, содержащего дубильные вещества [44]. Водорастворимые группы БАВ (аминокислоты, полисахариды, водорастворимые сапонины, алкалоиды, дубильные вещества и органические кислоты) определяли в водных извлечениях. Спирторастворимые (флавоноиды, антоцианы и спирторастворимые сапонины) – в спиртовых извлечениях, приготовленных путем экстракции 70%-м этанолом. Проводили первичный скрининг на присутствие отдельных групп БАВ в листьях аронии Мичурина, применяя известные качественные реакции [45].

Состав флавоноидов определяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей «этилацетат : кислота муравьиная : вода» (10 : 2 : 3) на аналитических хроматографических пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см (объем пробы спиртового извлечения – 20 мкл (МШ-10, Россия); объем 0,1%-го спиртового раствора стандартного образца (СО) рутина (АО «ВЕКТОН», Россия, степень чистоты не менее 99,5 %) – 5 мкл). Все реактивы и растворители, использованные в работе, марки «х.ч.» и «ч.д.а» (АО «ВЕКТОН», Россия).

Количественное определение основных групп проводили по известным методикам (таблица 1). Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-2001 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) в диапазоне длин волн 180–600 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно растворителей или растворов сравнения. Разделение и определение БАВ методом капиллярного электрофореза проводили на приборе марки «КАПЕЛЬ®-105» (ГК «Люмэкс», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты качественного определения основных групп БАВ в листьях аронии Мичурина представлены в таблице 2.

Таким образом, в листьях аронии Мичурина установлено присутствие флавоноидов, аминокислот, дубильных веществ, полисахаридов в форме слизей, лейкоантоцианов, спирторастворимых сапонинов и аскорбиновой кислоты. Алкалоиды обнаружены не были.

При исследовании спектральных характеристик комплекса БАВ сырья установлено, что спектр поглощения водного извлечения в диапазоне длин волн 250–350 нм имеет максимум поглощения при 278 ± 2 нм (рисунок 1), что характерно для некоторых БАВ, в том числе и дубильных веществ, причем преобладающим компонентом в их сумме является катехин. Спектр поглощения спиртового подкисленного извлечения в диапазоне длин волн 500–600 нм характеризуется максимумом при 540 ± 2 нм, что свидетельствует о наличии антоциановых соединений (рисунок 2). А вид дифференциального спектра поглощения комплекса флавоноидов листьев аронии Мичурина с алюминия хлоридом с максимумом при 410 ± 2 нм (рисунок 3) подтверждает присутствие суммы флавоноидов (рутин) в сырье.

Таблица 1. Использованные в работе методы определения БАВ в листьях аронии Мичурина

Table 1. Methods used in the work for determining biologically active substances in the leaves of *Aronia mitschurinii*

№ п/п No.	Группа БАВ Groups of biologically active substances	Метод Method	Литература References
1	Экстрактивные вещества Extractives substances	Гравиметрия (метод 1) Gravimetry (method 1)	[44]
2	Сумма флавоноидов Total flavonoids	Дифференциальная спектрофотометрия Differential spectrophotometry	[19]
3	Сумма дубильных веществ Total tannins	Прямая спектрофотометрия Direct spectrophotometry	[14]
4	Сумма антоцианов Sum of anthocyanins		[18]
5	Аминокислотный состав Amino acid composition	Капиллярный электрофорез Capillary electrophoresis	[46]
6	Состав органических кислот Composition of organic acids		[47]
7	Витамины группы В B vitamins		[48]

Таблица 2. Результаты качественного определения основных групп БАВ в листьях аронии Мичурина

Table 2. Results of qualitative determination of the main groups of biologically active substances in the leaves of Aronia mitschurinii

№ п/п No.	Группы БАВ Groups of biologically active substances	Реагент Reagent	Результат реакции Reaction result
1	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	Калия перманганат и железа сульфат (II) Potassium permanganate and iron sulfate (II)	Наблюдалось обесцвечивание раствора калия перманганата Discoloration of potassium permanganate solution
2	Полисахариды Polysaccharides	Осаждение слизи этанолом; раствор аммиака; хлористоводородная кислота Precipitation of mucus by ethanol; ammonia solution; hydrochloric acid	Наблюдалось выпадение осадка (слизи) Sedimentation was observed (slime)
3	Дубильные вещества Tannins	Соли алкалоидов; калия бихромат; железоаммонийные квасцы; ацетат свинца в уксуснокислой среде; нитрит натрия; раствор ванилина; реакция Стиасни Salts of alkaloids; potassium bichromate; ferric ammonium alum; lead acetate in acetic acid solution; sodium nitrite; vanillin solution; Stiasni's reaction	Наблюдалось появление характерных осадков или появление окрашивания Observed the appearance of characteristic precipitation or the appearance of coloring
4	Флавоноиды Flavonoids	Цианидиновая проба; хлорид алюминия; хлорид железа (III); раствор аммиака, ацетат свинца Cyanidin test; aluminum chloride; iron(III) chloride; ammonia solution, lead acetate	Появлялось характерное окрашивание (малиновое, желто-оранжевое, зеленовато-бурое, желтое) или осадок A characteristic color (crimson, yellow-orange, greenish-brown, yellow) or sediment appeared
5	Сапонины Saponins	Реакция пенообразования; ацетат свинца и бария хлорид; концентрированная серная кислота Foaming reaction; lead acetate and barium chloride; concentrated sulfuric acid	Наблюдалось пенообразование; выпадение осадков (спирторастворимые сапонины) Foaming was observed; precipitation (alcohol-soluble saponins)

Окончание таблицы 2

№ п/п No.	Группы БАВ Groups of biologically active substances	Реагент Reagent	Результат реакции Reaction result
6	Алкалоиды Alkaloids	Реактивы Драгендорфа и Марме; пикриновая кислота Dragendorff and Marme reagents; picric acid	Выпадение осадков не наблюдалось No precipitation was observed
7	Антоцианы Anthocyanins	Нагревание с кислотой хлористоводородной Heating with hydrochloric acid	Наблюдалось вишневое окрашивание (лейкоформы) Cherry staining (leukophores)
8	Аминокислоты Amino acids	Нингидриновая проба Ninhydrin test	Наблюдалось сине-фиолетовое окрашивание Blue-violet coloring

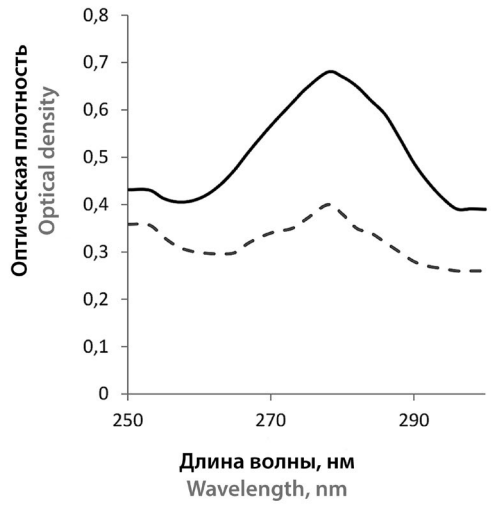


Рисунок 1. Вид спектра поглощения, характеризующий присутствие дубильных веществ

Figure 1. Type of absorption spectrum characterizing the presence of tannins

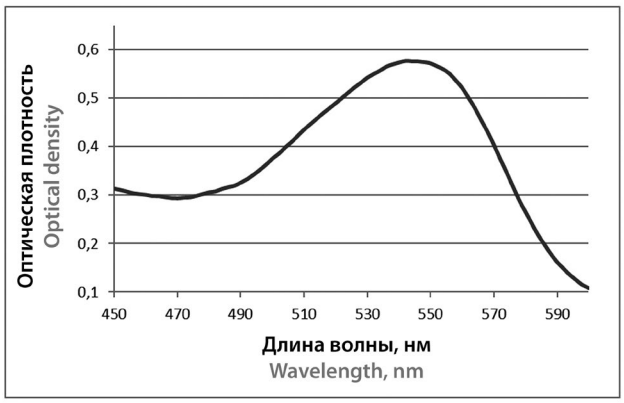


Рисунок 2. Вид спектра поглощения извлечения из высушенных листьев аронии Мичурина, полученного с применением подкисленного этанола

Figure 2. Type of absorption spectrum of extract from dried leaves of *Aronia mitschurinii*, obtained using acidified ethanol

При ТСХ-анализе флавоноидов на хроматограмме 20 мкл испытуемого извлечения после проявления 5%-м спиртовым раствором алюминия хлорида появлялось не менее 4 зон адсорбции на белом фоне и при просмотре в УФ-свете при длине волны 365 нм обнаруживалась зона адсорбции с флуоресценцией желто-зеленого цвета на уровне пятна СО рутина (рисунок 4).

Результаты количественного определения основных идентифицированных групп БАВ в листьях аронии Мичурина приведены в таблице 3.

Согласно данным таблицы 3 содержание комплекса полифенольных БАВ (дубильных веществ, флавоноидов и антоцианов) в листьях рябины черноплодной достаточно высоко.

Витамины способны накапливаться во всех растениях в тех или иных количествах. Как правило, содержание витаминов группы В в растительном сырье невелико. В листьях аронии Мичурина содержание витаминов В1, В2, В4 также мало. В сравнении с суточной потребностью наиболее высоким можно назвать содержание тиамина (таблица 3).

В листьях аронии Мичурина определен также состав 17 свободных и связанных аминокислот. Выявлено 7 незаменимых аминокислот: изолейцин, лизин, лейцин, фенилаланин, валин, треонин, метионин. Суммарное содержание аминокислот составило 5,88 %, из которых незаменимых – 2,71 % (рисунок 5), что составляет 46 % от общего содержания (см. таблицу 3).

Преобладающими аминокислотами являются лейцин и глутаминовая кислота – 18,37 и 10,88 % от суммарного содержания аминокислот соответственно.

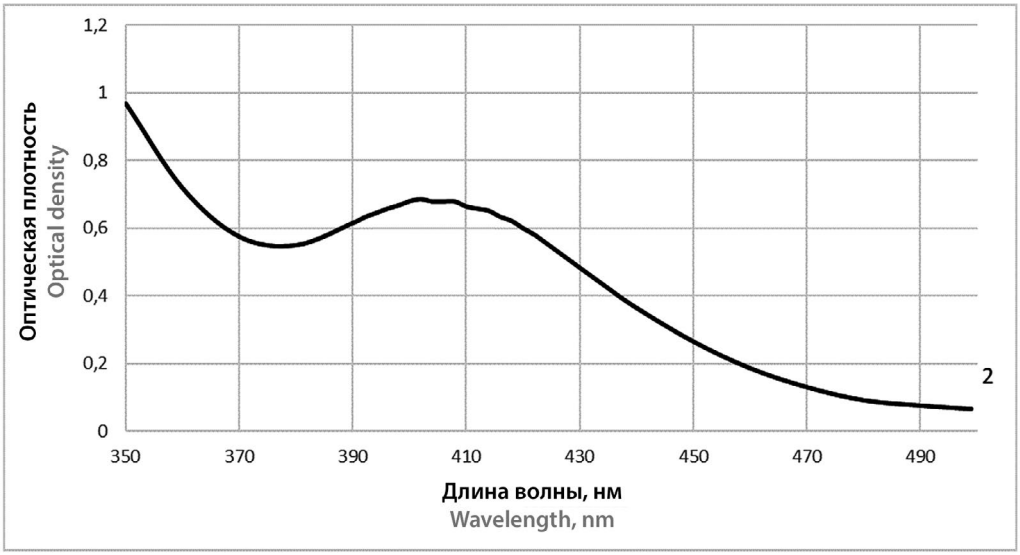


Рисунок 3. **Вид дифференциального спектра поглощения комплекса флавоноидов листьев аронии Мичурина с алюминия хлоридом в видимой области спектра**

Figure 3. **View of the differential absorption spectrum of the complex of flavonoids from *Aronia mitschurinii* leaves with aluminum chloride in the visible region of the spectrum**

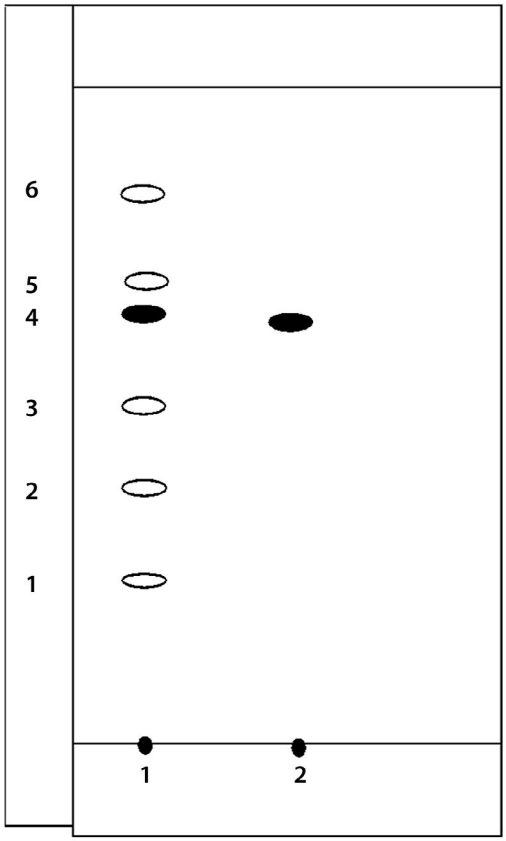


Рисунок 4. **Схема хроматограммы разделения зон флавоноидов листьев аронии Мичурина:**

1 – извлечение из листьев; 2 – СО рутина

Figure 4. **Chromatogram diagram of the separation of zones of flavonoids from the leaves of Aronia mitschurinii:**

1 – extract from leaves; 2 – standard sample of rutin

Рисунок 5. **Содержание аминокислот в аронии Мичурина листьях, %**

Figure 5. **Amino acid content in leaves of *Aronia mitschurinii*, %**

Таблица 3. Содержание основных групп БАВ в листьях аронии Мичурина

Table 3. Content of main groups of biologically active substances in leaves of *Aronia mitschurinii*

№ п/п No.	Группа БАВ Group of BAS	Результат Result	Содержание БАВ в плодах [50–52] Content of BAS in fruits [50–52]
1	Витамин B_1 (тиамин) Vitamin B_1 (thiamine)	0,99 ± 0,084 мг/кг 0.99 ± 0.084 mg/kg	0,06 мг/кг 0.06 mg/kg
2	Витамин B_2 (рибофлавин) Vitamin B_2 (riboflavin)	0,43 ± 0,025 мг/кг 0.43 ± 0.025 mg/kg	0,11 мг/кг 0.11 mg/kg
3	Витамин B_4 (холин) Vitamin B_4 (choline)	44,4 ± 3,9 мг/кг 44.4 ± 3.9 mg/kg	377 мг/кг 377 mg/kg
4	Экстрактивные вещества Extractives substances	31,52 ± 0,22 %	20–38 %*
5	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин Total flavonoids in terms of rutin	3,48 ± 0,21 %	1,5–2,2 %*
6	Сумма дубильных веществ в пересчете на катехин The amount of tannins in terms of catechin	8,63 ± 0,32 %	0,98–1,53 %*
7	Сумма антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид Total anthocyanins expressed as cyanidin-3-O-glucoside	11,62 ± 0,69 %	1,3–3,7 %*
8	Сумма свободных органических кислот Total free organic acids	0,49 ± 0,03 %	1,52–1,71 %*
9	Сумма свободных и связанных аминокислот Sum of free and bound amino acids	5,88 ± 0,29 %	–

Примечание. * В зависимости от сорта.

Note. * Depending on the variety of fruit.

Среди обнаруженных аминокислот присутствуют аминокислоты, способные оказывать антиоксидантное действие: аргинин, пролин, гистидин, фенилаланин, метионин, тирозин [49], способные вносить вклад в общий суммарный эффект экстракционных препаратов на основе листьев. Достаточно высокое содержание аминокислот в листьях аронии Мичурина подтверждает перспективность сырья для создания новых лекарственных средств.

В листьях аронии Мичурина определено также количественное содержание восьми свободных органических кислот (рисунок 6). Содержание муравьиной (менее 0,15 %), фумаровой (менее 0,005 %), янтарной (менее 0,05 %) и винной (менее 0,005 %) кислот не превышает нижних пределов измерения.

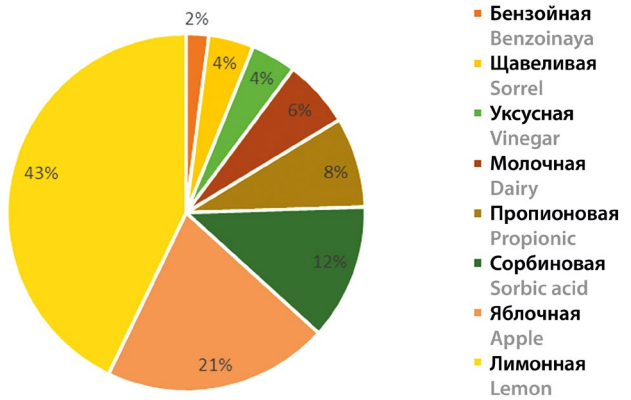


Рисунок 6. Количественное распределение органических кислот аронии Мичурина листьев (% от общей суммы)

Figure 6. Quantitative distribution of organic acids of *Aronia mitschurinii* leaves (% of the total)

Суммарное содержание выявленных органических кислот составляет 0,49 % (см. таблицу 3). Преобладающими кислотами являются лимонная, яблочная и сорбиновая (рисунок 6), что определяется родственной принадлежностью к рябине обыкновенной. В литературе имеются отдельные сведения о наличии антибактериальной активности извлечений из листьев [22], что также может определяться присутствием сорбиновой кислоты.

Интересным представлялось провести сравнение листьев и плодов аронии Мичурина [50–52] по содержанию комплекса БАВ (см. таблицу 3). Органические кислоты ожидаемо накапливаются больше в плодах, придавая им совместно с сахарами кисловато-сладкий вкус. В листьях содержатся лейкоантоцианы, концентрирующиеся к концу августа – началу сентября и обусловливающие покраснение листьев аронии Мичурина осенью. Содержание суммы флавоноидов и экстрактивных веществ примерно одинаково в листьях и плодах. Дубильные вещества при этом преимущественно накапливаются в листьях, обусловливая характерный терпкий, вяжущий вкус сырья и водного извлечения.

Таким образом, листья аронии Мичурина не могут служить источником витаминов группы В, органических и аминокислот, но эти вещества способны оказывать положительное действие на организм в комплексе с другими БАВ листьев. Однако данное ЛРС, очевидно, является источником полифенолов, обладающих, как известно, антиокислительными, ка-

пилляропротекторными, противовоспалительными и вяжущими свойствами. Именно данные группы БАВ следует считать целевыми для разработки показателей качества листьев и ЛРП на их основе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных качественных реакций подтверждено наличие в листьях аронии Мичурина дубильных веществ, флавоноидов, спирторастворимых сапонинов, лейкоантоцианов, аминокислот, аскорбиновой кислоты и полисахаридов в форме слизей. В листьях аронии Мичурина содержание витаминов B_1, B_2, B_4 невелико, поэтому данное сырье не следует рассматривать в качестве источника витаминов группы В, но последние могут оказывать положительное действие на организм в комплексе с другими БАВ листьев. В листьях аронии Мичурина выявлено 17 аминокислот, 7 из них являются незаменимыми: изолейцин, лизин, лейцин, фенилаланин, валин, треонин, метионин. Суммарное содержание аминокислот составило 5,88 %, из которых незаменимых – 2,71 %. Преобладающими аминокислотами являются лейцин и глутаминовая кислота – 18,37 и 10,88 % от суммарного содержания аминокислот соответственно.

В качестве целевых групп БАВ, отвечающих за фармакологическую активность аронии Мичурина листьев, наиболее рационально рассматривать комплекс полифенолов (флавоноиды, антоциановые соединения и дубильные вещества), содержание которых достаточно высоко. Согласно спектральным характеристикам доминирующими БАВ в сумме флавоноидов, дубильных веществ и антоцианов являются рутин, катехин и цианидин-3-О-глюкозид соответственно. Методом ТСХ установлено наличие в составе от 4 до 6 флавоноидов, из которых идентифицирован рутин.

Таким образом, данный вид сырья может рассматриваться как перспективный источник БАВ с целью дальнейшего получения лекарственных растительных препаратов с антиоксидантным, капилляропротекторным, вяжущим и противовоспалительным действием. Именно данные группы БАВ в рамках сквозной стандартизации следует считать целевыми для разработки показателей качества листьев и ЛРП на их основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова Ю. К., Куклина А. Г. Арония Мичурина: от создания до натурализации. М.: ГЕОС; 2014. 137 с.
2. Куклина А. Г. Натурализация аронии Мичурина в лесах европейской части России. *Лесохозяйственная информация*. 2015;2:46–56.
3. Brand M. H., Connolly B. A., Levine L. H., Richards J. T., Shine S. M., Spencer L. E. Anthocyanins, total phenolics, ORAC and moisture content of wild and cultivated dark-fruited *Aronia* species. *Scientia Horticulturae*. 2017;224:332–342. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.06.021.
4. Дейнека В. И., Третьяков М. Ю., Олейниц Е. Ю., Павлов А. А., Дейнека Л. А., Блинова И. П., Манохина Л. А. Определение антоцианов и хлорогеновых кислот в плодах рода арония: опыт хемосистематики. *Химия растительного сырья*. 2018;2:161–167. DOI: 10.14258/jcprm.2019024601.
5. Cvetanović A., Zengin G., Zeković Z.,Švarc-Gajić J., Ražić S., Damjanović A., Mašković P., Mitić M. Comparative *in vitro* studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa's* extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;121:458–466. DOI: 10.1016/j.fct.2018.09.045.
6. Брежнева Т. А., Недолужко Е. И., Логвинова Е. Е, Гудкова А. А., Сливкин А. И. Изучение биологически активных веществ листьев рябины черноплодной. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2018;2:306–311.
7. Абидуллина Р. Г., Пупыкина К. А., Денисова С. Г., Пупыкина В. В. Биохимический состав плодов некоторых представителей рода *Sorbus* L. коллекции Южно-Уральского ботанического сада. *Химия растительного сырья*. 2021;3:235–243. DOI: 10.14258/jcprm.2021037601.
8. Блинникова О. М. Витаминная ценность плодов аронии черноплодной. *Вестник МичГАУ*. 2013;2:56–59.
9. Блинникова О. М. Пищевая ценности плодов аронии черноплодной и перспективы их использования в производстве пищевых продуктов для функционального питания. «Инновационные технологии в АПК». В сб.: Международной научно-практической конференции. 2018. С. 294–298.
10. Гареева Г. М., Хасанова Л. А., Хасанова З. М. Целебные свойства аронии черноплодной (*Aronia melanocarpa*). *Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы*. 2018;2:36–38.
11. Елисеева Л. Г., Блинникова О. М. Пищевая ценность плодов аронии черноплодной, выращенной в ЦЧР России. *Известия вузов. Пищевая технология*. 2013;4:111–112.
12. Елисеева Л. Г., Блинникова О. М. Плоды аронии черноплодной – источник витаминно-минеральных комплексов. *Пищевая промышленность*. 2013;4:28–29.
13. Недолужко Е. И., Брежнева Т. А., Логвинова Е. Е. и др. Изучение биологически активных веществ листьев рябины черноплодной. Университетская наука: взгляд в будущее. В сб.: Сборник научных трудов по материалам Международной научной конференции, посвященной 83-летию Курского государственного медицинского университета. 2018. С. 74–77.
14. Пугачева О. В., Свиридова О. Л., Брежнева Т. А., Сливкин А. И. Валидация методики количественного определения дубильных веществ в листьях рябины черноплодной. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2022;1:98–104
15. Пугачева О. В., Брежнева Т. А., Сливкин А. И. Определение дубильных веществ в листьях рябины черноплодной различными аналитическими методами. В сб.: Сборник трудов седьмой научной конференции «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». 2019. С. 292–298.
16. Пугачева О. В., Брежнева Т. А., Сливкин А. И. Определение дубильных веществ в листьях рябины черноплодной для выбора сроков заготовки сырья. В сб.: «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения», сборник материалов IX Международная научная конференция молодых ученых. 2021. С. 345–350.
17. Пугачева О. В., Брежнева Т. А., Сливкин А. И. Определение флавоноидов в листьях аронии мичурина методом ТСХ. «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. В сб.: Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств», сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции. 2022. С. 429–433.
18. Пугачева О. В., Тринеева О. В., Панова К. Е. Количественное определение антоцианов в листьях аронии Мичурина. В сб.: Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств. Сборник трудов 9-ой Между-

народной научно-методической конференции. Воронеж. 2023. С. 356–359.
19. Пугачева О. В., Брежнева Т. А., Сливкин А. И. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях аронии Мичурина. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2023;3:92–99.
20. Суворова И. Н., Давыдов В. В., Прозоровский В. Н., Швец В. Н. Особенности проявления антиоксидантного действия экстракта листьев черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*) на головной мозг. *Биомедицинская химия*. 2005;51(1):66–71.
21. Ипатова О. М., Прозоровская Н. Н., Прозоровский В. Н., Княжев В. А., Баранова В. С., Груздьева А. Е. Экстракт листьев аронии, обладающий биологической активностью, и способ его получения. Патент РФ на изобретение № 2171111. Заявл. 05.05.2000. Опублик. 27.07.2001. Доступно по: https://patentimages.storage.googleapis.com/74/9a/85/256ef6a82683f1/RU2171111C1.pdf. Ссылка активна на 07.01.2024.
22. Efenberger-Szmechtyk M., Nowak A., Czyżowska A., Śniadowska M., Otlewska A., Żyżelewicz D. Antibacterial mechanisms of *Aronia melanocarpa* (Michx.), Chaenomeles superba Lindl. and Cornus mas L. leaf extracts. *Food Chemistry*. 2021;350:129218. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129218.
23. Valcheva-Kuzmanova S., Kuzmanov K., Mihova V., Krasnaliev I., Borisova P., Belcheva A. Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2007;62(1):19–24. DOI: 10.1007/s11130-006-0036-2.
24. Martin D. A., Taheri R., Brand M. H., Draghi A., Sylvester F. A., Bolling B. W. Anti-inflammatory activity of aronia berry extracts in murine splenocytes. *Journal of Functional Foods*. 2014;8(1):68–75. DOI: 10.1016/j.jff.2014.03.004.
25. Ohgami K., Ilieva I., Shiratori K., Koyama Y., Jin X.-H., Yoshida K., Kase S., Kitaichi N., Suzuki Yu., Tanaka T., Ohno S. Anti-inflammatory effects of Aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005;46(1):275–281. DOI: 10.1167/iovs.04-0715.
26. Zhao Y., Liu X., Zheng Y., Liu W., Ding C. *Aronia melanocarpa* polysaccharide ameliorates inflammation and aging in mice by modulating the AMPK/SIRT1/NF-κB signaling pathway and gut microbiota. *Scientific Reports*. 2021;11(1):20558. DOI: 10.1038/s41598-021-00071-6.
27. Bell D. R. Gochenaur K. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology*. 2006;100(4):1164–1170. DOI: 10.1152/japplphysiol.00626.2005.
28. Daskalova E., Delchev S., Vladimirova-Kitova L., Kitov S., Denev P. Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Functional Beverages Increase HDL-Cholesterol Levels in Aging Rats. *Foods*. 2021;10(7):1641. DOI: 10.3390/foods10071641.
29. Wu X., Gu L., Prior R. L., McKay S. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(26):7846–7856. DOI: 10.1021/jf0486850.
30. Appel K., Meiser P., Millán E., Collado J. A., Rose T., Gras C. C., Carle R., Muñoz E. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF-κB and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages. *Fitoterapia*. 2015;105:73–82. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.06.009.
31. Szopa A., Kokotkiewicz A., Kubica P., Banaszczak P., Wojtanowska-Krośniak A., Krośniak M., Marzec-Wróblewska U., Badura A., Zagrodzki P., Bucinski A., Luczkiewicz M., Ekiert H. Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa, A. arbutifolia*, and *A. ×prunifolia* and their antioxidant activities. *European Food Research and Technology*. 2017;243:1645–1657. DOI: 10.1007/s00217-017-2872-8.
32. Cvetanović A., Zengin G., Zeković Z., Švarc-Gajić J., Ražić S., Damjanović A., Mašković P., Mitić M. Comparative *in vitro* studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries Aronia melanocarpa's extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;121:458–466. DOI: 10.1016/j.fct.2018.09.045.
33. Kim D.-W., Han H.-A., Kim J.-K., Kim D.-H., Kim M.-K. Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Activities of Berries Cultivated in Korea: Identification of Phenolic Compounds in Aronia by HPLC/Q-TOF MS. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2021;26(4):459–468. DOI: 10.3746/pnf.2021.26.4.459
34. Loo B.-M., Erlund I., Koli R., Puukka P., Hellström J., Wähälä K., Mattila P., Jula A. Consumption of chokeberry (*Aronia mitschurinii*) products modestly lowered blood pressure and reduced low-grade inflammation in patients with mildly elevated blood pressure. *Nutrition Research*. 2016;36(11):1222–1230. DOI: 10.1016/j.nutres.2016.09.005.
35. Ryszawa A., Kawczyńska-Drózdz A., Pryjma J., Czesnikiewicz-Guzik M., Adamek-Guzik T., Naruszewicz M., Korbut R., Guzik T. J. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006;57(4):611–626.
36. Yu W., Gao J., Hao R., Yang J., Wei J. Effects of simulated digestion on black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) anthocyanins and intestinal flora. *Journal of Food Science and Technology*. 2021;58(4):1511–1523. DOI: 10.1007/s13197-020-04664-3.
37. Yaneva M. P., Botushanova A. D., Grigorov L. A., Kokov J. L., Todorova E. P., Krachanova M. G. Evaluation of the immunomodulatory activity of *Aronia* in combination with apple pectin in patients with breast cancer undergoing postoperative radiation therapy. *Folia Medica*. 2002;44(1–2):22–25.
38. Matsumoto M., Hara H., Chiji H., Kasai T. Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* Elliot) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(8):2226–2229. DOI: 10.1021/jf034818q.
39. Kong Y., Yan T., Tong Y., Deng H., Tan C., Wan M., Wang M., Meng X., Wang Y. Gut Microbiota Modulation by Polyphenols from *Aronia melanocarpa* of LPS-Induced Liver Diseases in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(11):3312–3325. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c06815.
40. Bolling B. W., Taheri R., Pei R., Kranz S., Yu M., Durocher S. N., Brand M. H. Harvest date affects aronia juice polyphenols, sugars, and antioxidant activity, but not anthocyanin stability. *Food Chemistry*. 2015;187:189–196. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.106.
41. Valcheva-Kuzmanova S., Borisova P., Galunska B., Krasnaliev I., Belcheva A. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2004;56(3):195–201. DOI: 10.1016/j.etp.2004.04.012.
42. Pyun C.-W., Seo T.-S., Kim D.-J., Kim T.-W., Bae J.-S. Protective Effects of *Ligularia fischeri* and *Aronia melanocarpa* Extracts on Alcoholic Liver Disease (*In Vitro* and *In Vivo* Study). *BioMed Research International*. 2020. DOI: 10.1155/2020/9720387.
43. Bushmeleva K., Vyshtakalyuk A., Terenzhev D., Belov T., Parfenov A., Sharonova N., Nikitin E., Zobov V. Radical Scavenging Actions and Immunomodulatory Activity of *Aronia melanocarpa* Propylene Glycol Extracts. *Plants (Basel)*. 2021;10(11):2458. DOI: 10.3390/plants10112458.
44. Государственная фармакопея российской федерации. XIV издание. В 4 томах. М.: Федеральная электронная медицинская библиотека; 2018. 7019 с.
45. Ладыгин Е. Я., Сафронич Л. Н., Отряшенкова В. Э., Баландина И. А., Гринкевич Н. И., Сорокина А. А., Сокольский И. Н., Глызин В. И., Молодожникова Л. М., Митин Ю. С., Самылина И. А., Ермакова В. А. Химический анализ лекарственных растений. М.: Высшая школа; 1983. 176 с.
46. ГОСТ Р 55569-2013 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза. М.: Стандартинформ; 2014. 16 с.
47. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». СПб.: ООО «Веда»; 2006. 212 с.

48. Флоренская Н. К. Технохимический контроль качества сырья и комбикормов. М.: Колос; 1968. 120 с.
49. Штаркман И. Н. Антиоксидантные свойства аминокислот и образование долгоживущих радикалов белка под действием рентгеновского излучения. Дис. ... канд. биол. наук. Пущино; 2008. 21 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/antioksidantnye-svoistva-aminokislot-i-obrazovanie-dolgozhivushchikh-radikalov-belka-pod-dei. Ссылка активна на 07.01.2024.
50. Тимофеева В. Н., Саманкова Н. В. Продукты переработки рябины садовой и аронии черноплодной. *Пищевая промышленность*. 2009;11:54–56.
51. Логвинова Е. Е., Брежнева Т. А., Самылина И. А., Сливкин А. И. Химический состав плодов аронии различных сортов. *Фармация*. 2015;6:22–26.
52. Блинникова О. М. Витаминная ценность плодов аронии черноплодной. *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета*. 2013;2:56–59.

REFERENS

1. Vinogradova Yu. K., Kuklina A. G. Aronia Michurina: from creation to naturalization. Moscow: GEOS; 2014. 137 p. (In Russ.)
2. Kuklina A. G. Naturalisation aronia Mitschurinii in the forests of european Russia. *Forestry information*. 2015;2:46–56. (In Russ.)
3. Brand M. H., Connolly B. A., Levine L. H., Richards J. T., Shine S. M., Spencer L. E. Anthocyanins, total phenolics, ORAC and moisture content of wild and cultivated dark-fruited *Aronia* species. *Scientia Horticulturae*. 2017;224:332–342. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.06.021.
4. Deineka V. I., Tret'akov M. Yu., Oleiniz Y. Yu., Pavlov A. A., Deineka L. A., Blinova I. P., Manokhina L. A. Determination of anthocyanins and chlorogenic acids in fruits of *Aronia* genus: the experience of chemosystemetics. *Chemistry of plant raw material*. 2018;2:161–167. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019024601.
5. Cvetanović A., Zengin G., Zeković Z.,Švarc-Gajić J., Ražić S., Damjanović A., Mašković P., Mitić M. Comparative *in vitro* studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa's* extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;121:458–466. DOI: 10.1016/j.fct.2018.09.045.
6. Brezhneva T. A., Nedoluzhko E. I., Logvinova E. E, Gudkova A. A., Slivkin A. I. The study of biologically active substances in the leaves of black chokeberry. *Vestnik VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya*. 2018;2:306–311. (In Russ.)
7. Abidullina R. G., Pupykina K. A., Denisova S. G., Pupykina V. V. Biochemical composition of fruits of some representatives of the genus *Sorbus* L. in collection of the South-Ural botanical garden. *Chemistry of plant raw material*. 2021;3:235–243. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2021037601.
8. Blinnikova O. M. The vitamin value of the black chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Vestnik MichGAU*. 2013;2:56–59. (In Russ.)
9. Blinnikova O. M. Nutritional value of chokeberry fruits and prospects for their use in the production of food products for functional nutrition. "Innovative technologies in the agro-industrial complex." In: International scientific and practical conference. 2018. P. 294–298.
10. Gareeva G. M., Hasanova L. A., Hasanova Z. M. Healing properties of chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *Bulletin of the Bashkir State Pedagogical University named after. M. Akmulla*. 2018;2:36–38. (In Russ.)
11. Eliseeva L. G., Blinnikova O. M. Nutritional value of chokeberry fruits grown in the Central Black Sea region of Russia. *Izvestiya vuzov. Pishchevaya tekhnologiya*. 2013;4:111–112. (In Russ.)
12. Eliseeva L. G., Blinnikova O. M. Chokeberry fruits are a source of vitamin and mineral complexes. *Food Industry*. 2013;4:28–29. (In Russ.)
13. Nedoluzhko E. I., Brezhneva T. A., Logvinova E. E. et al. Study of biologically active substances of chokeberry leaves. University science: a look into the future. In: Collection of scientific papers based on the materials of the International Scientific Conference dedicated to the 83rd anniversary of Kursk State Medical University. 2018. P. 74–77. (In Russ.)
14. Pugacheva O. V., Sviridova O. L., Brezhneva T. A., Slivkin A. I. Validation of a method for the quantification of tannins in black chokeberry leaves. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2022;1:98–104. (In Russ.)
15. Pugacheva O. V., Brezhneva T. A., Slivkin A. I. Determination of tannins in the leaves of chokeberry by various analytical methods. In: Collection of proceedings of the seventh scientific conference "Modern trends in the development of health-saving technologies". 2019. P. 292–298. (In Russ.)
16. Pugacheva O. V., Brezhneva T. A., Slivkin A. I. Determination of tannins in chokeberry leaves to select the timing of raw material procurement. In: "Modern trends in the development of health-saving technologies", collection of materials from the IX International Scientific Conference of Young People scientists. 2021. P. 345–350. (In Russ.)
17. Pugacheva O. V., Brezhneva T. A., Slivkin A. I. Determination of flavonoids in chokeberry leaves by TLC. "Ways and forms of improving pharmaceutical education. In: Current issues in the development and research of new drugs", collection of proceedings of the 8th International Scientific and Methodological Conference. 2022. P. 429–433. (In Russ.)
18. Pugacheva O. V., Trineeva O. V., Panova K. E. Quantitative determination of anthocyanins in leaves of chokeberry Michurin. In: Ways and forms of improving pharmaceutical education. Current issues of development and research new medicines. Collection of proceedings of the 9th International Scientific and Methodological Conference. Voronezh. 2023. P. 356–359. (In Russ.)
19. Pugacheva O. V., Brezhneva T. A., Slivkin A. I. Development and validation of a method for the quantification of flavonoids in aronia Michurina leaves. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2023;3:92–99. (In Russ.)
20. Suvorova I. N., Davydov V. V., Prozorovskiy V. N., Shvets V. N. Peculiarity of extract from Aronia melanocarpa leaves antioxidant action for the brain. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2005;51(1):66–71. (In Russ.)
21. Ipatova O. M., Prozorovskaya N. N., Prozorovsky V. N., Knyazhev V. A., Baranova V. S., Gruzdyeva A. E. Extract of chokeberry leaves with biological activity, and a method for its preparation. Patent RUS No. 2171111. Appl. 05.05.2000. Publ. 27.07.2001. Available at: https://patentimages.storage.googleapis.com/74/9a/85/256ef6a82683f1/RU2171111C1.pdf. Accessed: 07.01.2024. (In Russ.)
22. Efenberger-Szmechtyk M., Nowak A., Czyżowska A., Śniadowska M., Otlewska A., Żyżelewicz D. Antibacterial mechanisms of *Aronia melanocarpa* (Michx.), Chaenomeles superba Lindl. and Cornus mas L. leaf extracts. *Food Chemistry*. 2021;350:129218. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129218.
23. Valcheva-Kuzmanova S., Kuzmanov K., Mihova V., Krasnaliev I., Borisova P., Belcheva A. Antihyperlipidemic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats fed a high-cholesterol diet. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2007;62(1):19–24. DOI: 10.1007/s11130-006-0036-2.
24. Martin D. A., Taheri R., Brand M. H., Draghi A., Sylvester F. A., Bolling B. W. Anti-inflammatory activity of aronia berry extracts in murine splenocytes. *Journal of Functional Foods*. 2014;8(1):68–75. DOI: 10.1016/j.jff.2014.03.004.
25. Ohgami K., Ilieva I., Shiratori K., Koyama Y., Jin X.-H., Yoshida K., Kase S., Kitaichi N., Suzuki Yu., Tanaka T., Ohno S. Anti-inflammatory effects of Aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005;46(1):275–281. DOI: 10.1167/iovs.04-0715.
26. Zhao Y., Liu X., Zheng Y., Liu W., Ding C. *Aronia melanocarpa* polysaccharide ameliorates inflammation and aging in mice by modulating the AMPK/SIRT1/NF-κB signaling pathway and gut microbiota. *Scientific Reports*. 2021;11(1):20558. DOI: 10.1038/s41598-021-00071-6.

27. Bell D. R. Gochenaur K. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology*. 2006;100(4):1164–1170. DOI: 10.1152/japplphysiol.00626.2005.
28. Daskalova E., Delchev S., Vladimirova-Kitova L., Kitov S., Denev P. Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Functional Beverages Increase HDL-Cholesterol Levels in Aging Rats. *Foods*. 2021;10(7):1641. DOI: 10.3390/foods10071641.
29. Wu X., Gu L., Prior R. L., McKay S. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(26):7846–7856. DOI: 10.1021/jf0486850.
30. Appel K., Meiser P., Millán E., Collado J. A., Rose T., Gras C. C., Carle R., Muñoz E. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF-κB and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages. *Fitoterapia*. 2015;105:73–82. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.06.009.
31. Szopa A., Kokotkiewicz A., Kubica P., Banaszczak P., Wojtanowska-Krośniak A., Krośniak M., Marzec-Wróblewska U., Badura A., Zagrodzki P., Bucinski A., Luczkiewicz M., Ekiert H. Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of *Aronia* sp.: *A. melanocarpa, A. arbutifolia*, and *A. ×prunifolia* and their antioxidant activities. *European Food Research and Technology*. 2017;243:1645–1657. DOI: 10.1007/s00217-017-2872-8.
32. Cvetanović A., Zengin G., Zeković Z., Švarc-Gajić J., Ražić S., Damjanović A., Mašković P., Mitić M. Comparative *in vitro* studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries Aronia melanocarpa's extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;121:458–466. DOI: 10.1016/j.fct.2018.09.045.
33. Kim D.-W., Han H.-A., Kim J.-K., Kim D.-H., Kim M.-K. Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Activities of Berries Cultivated in Korea: Identification of Phenolic Compounds in Aronia by HPLC/Q-TOF MS. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2021;26(4):459–468. DOI: 10.3746/pnf.2021.26.4.459
34. Loo B.-M., Erlund I., Koli R., Puukka P., Hellström J., Wähälä K., Mattila P., Jula A. Consumption of chokeberry (*Aronia mitschurinii*) products modestly lowered blood pressure and reduced low-grade inflammation in patients with mildly elevated blood pressure. *Nutrition Research*. 2016;36(11):1222–1230. DOI: 10.1016/j.nutres.2016.09.005.
35. Ryszawa A., Kawczyńska-Drózdz A., Pryjma J., Czesnikiewicz-Guzik M., Adamek-Guzik T., Naruszewicz M., Korbut R., Guzik T. J. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006;57(4):611–626.
36. Yu W., Gao J., Hao R., Yang J., Wei J. Effects of simulated digestion on black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) anthocyanins and intestinal flora. *Journal of Food Science and Technology*. 2021;58(4):1511–1523. DOI: 10.1007/s13197-020-04664-3.
37. Yaneva M. P., Botushanova A. D., Grigorov L. A., Kokov J. L., Todorova E. P., Krachanova M. G. Evaluation of the immunomodulatory activity of *Aronia* in combination with apple pectin in patients with breast cancer undergoing postoperative radiation therapy. *Folia Medica*. 2002;44(1–2):22–25.
38. Matsumoto M., Hara H., Chiji H., Kasai T. Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* Elliot) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(8):2226–2229. DOI: 10.1021/jf034818q.
39. Kong Y., Yan T., Tong Y., Deng H., Tan C., Wan M., Wang M., Meng X., Wang Y. Gut Microbiota Modulation by Polyphenols from *Aronia melanocarpa* of LPS-Induced Liver Diseases in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021;69(11):3312–3325. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c06815.
40. Bolling B. W., Taheri R., Pei R., Kranz S., Yu M., Durocher S. N., Brand M. H. Harvest date affects aronia juice polyphenols, sugars, and antioxidant activity, but not anthocyanin stability. *Food Chemistry*. 2015;187:189–196. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.106.
41. Valcheva-Kuzmanova S., Borisova P., Galunska B., Krasnaliev I., Belcheva A. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2004;56(3):195–201. DOI: 10.1016/j.etp.2004.04.012.
42. Pyun C.-W., Seo T.-S., Kim D.-J., Kim T.-W., Bae J.-S. Protective Effects of *Ligularia fischeri* and *Aronia melanocarpa* Extracts on Alcoholic Liver Disease (*In Vitro* and *In Vivo* Study). *BioMed Research International*. 2020. DOI: 10.1155/2020/9720387.
43. Bushmeleva K., Vyshtakalyuk A., Terenzhev D., Belov T., Parfenov A., Sharonova N., Nikitin E., Zobov V. Radical Scavenging Actions and Immunomodulatory Activity of *Aronia melanocarpa* Propylene Glycol Extracts. *Plants (Basel)*. 2021;10(11):2458. DOI: 10.3390/plants10112458.
44. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. In 4 volumes. Moscow: Federalnaia elektronnaia meditsinskaia biblioteka; 2018. 7019 p. (In Russ.)
45. Ladygin E. Ya., Safronich L. N., Otryashenkova V. E., Balandina I. A., Grinkevich N. I., Sorokina A. A., Sokolsky I. N., Glyzin V. I., Molodozhnikova L. M., Mitin Yu. S., Samylina I. A., Ermakova V. A. Chemical analysis of medicinal plants. Moscow: Vysshaia shkola; 1983. 176 p. (In Russ.)
46. GOST R 55569-2013 Feed, compound feed, compound feed raw materials. Determination of proteinogenic amino acids by capillary electrophoresis. Moscow: Standartinform; 2014. 16 p. (In Russ.)
47. Komarova N.V., Kamentsev Y.S. Practical guide to the use of capillary electrophoresis systems "KAPEL". Saint Petersburg: LLC "Veda"; 2006. 212 p. (In Russ.)
48. Florenskaya N.K. Technochemical quality control of raw materials and feed. Moscow: Kolos; 1968. 120 p. (In Russ.)
49. Shtarkman I.N. Antioxidant properties of amino acids and the formation of long-lived protein radicals under the influence of X-ray radiation. [Dissertation.] Pushchino; 2008. 21 p. Available at: https://www.dissercat.com/content/antioksidantnye-svoistva-aminokislot-i-obrazovanie-dolgozhivushchikh-radikalov-belka-pod-dei. Accessed: 07.01.2024. (In Russ.)
50. Timofeeva V. N., Samankova N. V. Processing products of garden ash and chokeberry. *Food industry*. 2009;11:54–56. (In Russ.)
51. Logvinova E. E., Brezhneva T. A., Samylina I. A. Slivkin A. I. Chemical composition of chokeberries (*Aronia*) of different varieties. *Farmatsiia*. 2015;6:22–26. (In Russ.)
52. Blinnikova O. M. The vitamin value of the black chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). Bulletin of Michurinsk State Agrarian University. 2013;2:56–59. (In Russ.)

Обзорная статья / Review article

УДК 615.32

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1617

Check for updates

CC BY 4.0

Изучение потенциала фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* Mill.) как ценного лекарственного растения (обзор)

С. Буракба✉, А. И. Марахова✉✉, Я. М. Станишевский, И. А. Василенко, В. Ю. Жилкина

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:** Буракба Сафа. **E-mail:** bourakba.safa93@gmail.com
✉✉ **Контактное лицо:** Марахова Анна Игоревна. **E-mail:** agentcat85@mail.ru

ORCID: С. Буракба – https://orcid.org/0009-0009-4421-5373; А. И. Марахова – https://orcid.org/000-0003-4442-9266;
Я. М. Станишевский – https://orcid.org/0000-0002-0387-397X; И. А. Василенко – https://orcid.org/0000-0002-3135-1917;
В. Ю. Жилкина – https://orcid.org/0000-0001-7916-5913.

Статья поступила: 19.10.2023 **Статья принята в печать:** 07.05.2024 **Статья опубликована:** 08.05.2024

Резюме

Введение. *Foeniculum vulgare* Mill., широко известный как фенхель обыкновенный или укроп аптечный, весьма распространен как одно из старейших в мире пряных растений, имеющих существенное экономическое значение и нашедших широкое применение в фармацевтической промышленности. В медицинской практике используются главным образом плоды данного растения, которые включены в Государственную фармакопею XIV издания и являются источником эфирного масла. Применяются в виде настоя в качестве спазмолитического и ветрогонного средства. В пищу используется трава фенхеля, собранная до цветения, а также плоды, стебли и соцветия растения – в качестве приправы.

Текст. Целью этого исследования является обобщение научных трудов о морфологических характеристиках, фитохимических соединениях, терапевтических свойствах и основных механизмах фармакологической активности *F. vulgare*. Был проведен систематический поиск литературы с использованием релевантных ключевых слов, таких как «фенхель», «*Foeniculum vulgare* Mill.», «терапевтический» и «фармакология», в известных базах данных, включая ScienceDirect, Scopus, EBSCO и Medline. Поиск охватывал статьи, опубликованные до 25 апреля 2023 года в доступных журналах. Результаты исследования показали, что фенхель обладает широким спектром фармакологических свойств, включая антиоксидантное, противораковое, противовоспалительное, противогрибковое, антибактериальное и эстрогенное действие. Эти эффекты можно объяснить присутствием ароматических соединений, в частности анетола, эстрагола и фенхона, которые в изобилии содержатся в фенхеле.

Заключение. Разнообразные фармакологические свойства и богатый химический состав фенхеля делают его перспективным сырьем для разработки новых лекарственных препаратов. Дальнейшее изучение терапевтического потенциала фенхеля с помощью исследований *in vivo* и *in vitro* будет способствовать установлению механизмов фармакологического действия биологически активных веществ (БАВ) фенхеля.

Ключевые слова: *Foeniculum vulgare* Mill., флавоноиды, эфирные масла, противовоспалительное средство, *Escherichia coli*

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

Вклад авторов. С. Буракба – литературный и патентный поиск, написание текста статьи. А. И. Марахова – руководство проведением исследования, редактирование текста статьи. Я. М. Станишевский – редакционные замечания и утверждение текста статьи к публикации. И. А. Василенко – редактирование текста статьи, утверждение текста статьи. В. Ю. Жилкина – литературный и патентный поиск, разработка графического абстракта. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Буракба С., Марахова А. И., Станишевский Я. М., Василенко И. А., Жилкина В. Ю. Изучение потенциала фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* Mill.) как ценного лекарственного растения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):59–67. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1617

Exploring the potential of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) as a valuable medicinal plant: a comprehensive (review)

Safa Bourakba✉, Anna I. Marakhova✉✉, Yaroslav M. Stanishevskiy, Ivan A. Vasilenko, Vera Y. Zhilkina

Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Safa Bourakba. **E-mail:** bourakba.safa93@gmail.com
✉✉ **Corresponding author:** Anna I. Marakhova. **E-mail:** agentcat85@mail.ru

ORCID: Safa Bourakba – https://orcid.org/0009-0009-4421-5373; Anna I. Marakhova – https://orcid.org/000-0003-4442-9266;
Yaroslav M. Stanishevskiy – https://orcid.org/0000-0002-0387-397X; Ivan A. Vasilenko – https://orcid.org/0000-0002-3135-1917;
Vera Y. Zhilkina – https://orcid.org/0000-0001-7916-5913.

Received: 19.10.2023 **Accepted:** 07.05.2024 **Published:** 08.05.2024

© Буракба С., Марахова А. И., Станишевский Я. М., Василенко И. А., Жилкина В. Ю., 2024
© Bourakba S., Marakhova A. I., Stanishevskiy Ya. M., Vasilenko I. A., Zhilkina V. Y., 2024

Abstract
Introduction. *Foeniculum vulgare* Mill., commonly known as fennel or drugstore dill, is very common as one of the world's oldest spice plants, which has significant economic importance and wide application in the pharmaceutical industry. In medical practice, the fruits of this plant are mainly used, which are included in the State Pharmacopoeia of the XIV edition and are a source of essential oil. They are used as an antispasmodic and carminative agent in the form of an infusion. Fennel grass harvested before flowering is used for food, as well as fruits, stems and inflorescences of the plant as a seasoning.
Text. The purpose of this study is to summarize scientific papers on the morphological characteristics, phytochemical compounds, therapeutic properties and basic mechanisms of pharmacological activity of *F. vulgare*. A systematic literature search was conducted using relevant keywords such as "*fennel*", "*Foeniculum vulgare* Mill.", "*therapeutic*" and "*pharmacology*" in well-known databases, including ScienceDirect, Scopus, EBSCO and Medline. The search covered articles published before April 25, 2023 in available journals. The results of the study showed that *fennel* has a wide range of pharmacological properties, including antioxidant, anti-cancer, anti-inflammatory, antifungal, antibacterial and estrogenic effects. These effects can be explained by the presence of aromatic compounds, in particular anethole, estragole and fenchone, which are abundantly present in fennel.
Conclusion. the diverse pharmacological properties and rich chemical composition of fennel make it a promising raw material for the development of new medicines. Further study of the therapeutic potential of fennel through *in vivo* and *in vitro* studies will contribute to the establishment of mechanisms of pharmacological action of biologically active substances (BAS) of fennel.

Keywords: *Foeniculum vulgare* Mill., flavonoids, anti-inflammatory, *Escherichia coli*

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. Safa Bourakba – literary and patent search, writing the text of the article. Anna I. Marakhova – management of the research, editing the text of the article. Yaroslav M. Stanishevskiy – editing comments, approval of the text of the article for publication. Ivan A. Vasilenko – editing the text of the article,approval of the text of the article. Vera Y. Zhilkina – editorial comments and approval of the text of the article for publication. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bourakba S., Marakhova A. I., Stanishevskiy Ya. M., Vasilenko I. A., Zhilkina V. Y. Exploring the potential of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) as a valuable medicinal plant: a comprehensive. *Drug development & registration*. 2024;13(2):59–67. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1617

ВВЕДЕНИЕ

Фитотерапия широко распространена с древних времен. Для лечения широкого спектра заболеваний использовались различные части растений, собираемые в разные периоды вегетации [1]. Использование натуральных средств и фитопрепаратов предлагает экономически эффективный подход к лечению заболеваний. В последнее время лекарственные травы стали жизнеспособной альтернативой химическим препаратам, в первую очередь из-за меньшей частоты побочных эффектов по сравнению с синтетическими лекарствами [2]. Растения издавна занимали значимую позицию в здравоохранении и терапевтической практике человеческого общества. Антиоксидантные свойства лекарственных растений способствуют снижению токсичности лекарств [3]. Кроме того, встречающиеся в природе растительные БАВ способствуют восстановлению гомеостаза и препятствуют накоплению ксенобиотиков в организме, следовательно, лекарственные растения представляют собой источник средств для лечения и профилактики различных заболеваний [4].

Из огромного количества, примерно 422 000 видов, цветковых растений, произрастающих по всему миру, более 5000 видов используется в медицинских целях. Среди них фенхель (*F. vulgare*) заслуживает особого внимания в связи с его широким применением в фармацевтической, пищевой, косметической промышленности [5]. Фенхель, одно из старейших известных пряных растений, произрастает в засушливых и полузасушливых регионах. Он обладает противовоспалительным, спазмолитическим, антисептическим, ветрогонным, мочегонным и обезболивающим действием, что делает его эффективным при лечении желудочно-кишечных расстройств [6]. Кроме того, его противоязвенные и антиоксидантные свойства являются предпосылкой для применения препаратов фенхеля при неврологических расстройствах [6]. Учитывая ограниченное применение фенхеля в качестве лекарственного растения, целью настоящего исследования явилось обобщение научных трудов о морфологических характеристиках, фитохимических соединениях, терапевтических свойствах и основных механизмах фармакологической активности *F. vulgare*.

Фитология

Foeniculum vulgare Mill., широко известный как фенхель, имеет различные названия на разных языках: «фенуй» – на французском, «шмр» («разианадж») – на арабском, «разианех» – на персидском. Фенхель – травянистое ароматическое растение, достигающее обычно высоты от 1 до 2 метров. Относится к се-

мейству зонтичных (Apiaceae), широко распространен в Европе, Средиземноморском регионе и Азии.

Фенхель – многолетнее или однолетнее травянистое растение, характеризующееся рифлеными стеблями и перемежающимися листьями. Листья часто плотные и темно-зеленые, с лопастью, разделенной на тонкие сегменты. Черешок листьев сопровождается оболочкой. Цветки фенхеля, как правило, обоеполые и могут иметь правильную или неправильную форму. Они образуют желтую зонтиковидную гроздь в форме овальных бусин [7].

Плоды фенхеля мелкие, приблизительно 8 мм в длину и 3 мм в ширину, обладают приятным ароматом и сладким вкусом. Они имеют узкую, удлиненную цилиндрическую форму, размер плодов может варьироваться в зависимости от роста растения. На поверхности присутствуют светло-зеленые прожилки [8].

Фитохимический состав фенхеля

В научной литературе представлены обширные исследования по изучению химического состава и питательной ценности фенхеля, выявившие наличие разнообразных БАВ. Фенхель содержит ряд первичных метаболитов, включая жирные кислоты, аминокислоты и углеводы. Кроме того, он богат вторичными метаболитами, такими как фенольные соединения и эфирные масла [9–11].

Плоды фенхеля содержат примерно 10–12 % масла, которое в основном накапливается в семядолях. Масло, получаемое из плодов фенхеля, содержит в своем составе 4 % пальмитиновой кислоты, 22 % олеиновой кислоты, 14 % линолевой кислоты и 6 % петроселиновой кислоты. По некоторым данным, плоды содержат эфирное масло в диапазоне от 4 до 6 %, причем его состав варьируется в зависимости от географии произрастания растения [8].

Трава фенхеля содержит различные фенольные соединения, включая флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, гидроксикоричные кислоты, кумарины и дубильные вещества. Фенолкарбоновые кислоты фенхеля представлены 3-О-кофеоилхинной кислотой, 4-О-кофеоилхинной кислотой, 5-О-кофеоилхинной кислотой, 1,3-О-дикофеоилхинной кислотой, 1,4-О-дикофеоилхинной кислотой и 1,5-О-дикофеоилхинной кислотой. Основными фенольными соединениями, обнаруженными в метанольных экстрактах, были розмариновая и хлорогеновая кислоты, кверцетин и апигенин. Содержание фенола и флавоноидов в метанольных экстрактах семян *F. vulgare* составляет соответственно 1017,29 мг эквивалента галловой кислоты на 1 г сухой массы и 695,52 мг эквивалента кверцетина на 100 г сухой массы.

Было обнаружено, что *F. vulgare* содержит приблизительно 9,5 % белка, 10 % жира и 13,4 % минералов, включая клетчатку. Содержание углеводов в фенхеле колеблется от 18,5 до 42,3 %. Известно также, что *F. vulgare* содержит различные микро- и макроэлементы и витамины, такие как кальций, калий, натрий, железо, фосфор, тиамин, рибофлавин, ниацин и витамин С [12].

Флавоноиды, содержащиеся в фенхеле, включают эриодиктиол-7-О-рутинозид и кверцетин-3-О-рутинозид, которые были обнаружены в водном экстракте листьев фенхеля. В водном экстракте плодов фенхеля найдены кверцетин-3-О-галактозид, кемпферол-3-О-рутинозид, кемпферол-3-О-глюкозид, кверцетин-3-О-глюкуронид, кемпферол-3-О-глюкуронид, изокверцетин и изорамнетин-3-О-глюкозид [13].

Использование фенхеля в народной медицине

Фенхель (*F. vulgare*) имеет богатую историю использования в народной медицине в качестве средства для лечения различных недугов. Он применяется при болях в животе, в качестве противорвотного средства (для облегчения тошноты и рвоты), при артрите, раке, как успокаивающее колики у младенцев и детей младшего возраста, при конъюнктивите, запоре, диарее, лихорадке, метеоризме, гастрите, бессоннице, гингивите, а также как мочегонное и стимулирующее менструацию средство. Листья, стебли и плоды *F. vulgare* часто использовались в качестве лактогонов для увеличения выработки молока у кормящих женщин [14].

Важно отметить, что, хотя фенхель имеет давнее широкое применение в народной медицине, в официнальной медицине его использование весьма ограниченно. В связи с этим требуются дополнительные исследования и клинические испытания для научного подтверждения фармакологических свойств фенхеля, которые широко известны в народной медицине.

Фенхель (*F. vulgare*) широко используется в качестве кулинарной приправы для улучшения вкуса хлеба, рыбы, ликеров, салатов и сыров [15]. Он входит в состав растительных препаратов для лечения заболеваний дыхательных путей. Настой листьев фенхеля считается эффективным средством при раздражении горла и действует как мягкое отхаркивающее средство [16–18].

Считается, что корень фенхеля обладает мочегонными свойствами, способствующими устранению избыточной задержки воды в организме, вызывающей отеки лодыжек, ступней и голеней. Кроме того, корень стимулирует аппетит [20] и считается очищающим средством, способствующим выведению токсинов через мочевыделительную и пищеварительную систему [19].

Традиционно плоды фенхеля используются для стимуляции пищеварения, облегчения симптомов расстройств пищеварения и как эффективное средство при диабете, бронхите, хроническом кашле и мочекаменной болезни [19, 20].

Современная фармакология. *F. vulgare* является широко признанным лекарственным растением, обладающим разнообразными фармакологическими

свойствами. Множественные исследования продемонстрировали его антиоксидантную, цитотоксическую, противоопухолевую, противовоспалительную, противогрибковую, антибактериальную, эстрогенную и гепатопротекторную активность [11]. Эти фармакологические свойства подчеркивают потенциал *F. vulgare* как ценного терапевтического средства в современной медицине.

Отмечены также такие свойства фенхеля, как бронходилатирующие, мочегонные, литонтриптические, антитромботические, гипотензивные и гастропротекторные. Некоторые источники рекомендуют препараты фенхеля для улучшения памяти и в качестве антимутагенных средств. Стоит отметить, что прием препаратов фенхеля, как правило, не сопровождается побочными эффектами, за исключением нескольких случаев аллергических реакций [10, 20].

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕНХЕЛЯ

Антимикробная активность

Антимикробная активность фенхеля (*F. vulgare*) была предметом нескольких исследований, включая обоснование фармакологического действия и обеспечение микробиологической безопасности пищевых продуктов [22, 23].

Результаты исследований показывают, что терпеноиды (анетол и фенхон) фенхеля обладают антибактериальными свойствами. Дитерпеноиды (каротол, карвон и лимонен) демонстрируют широкий спектр фармакологических свойств, включая противовоспалительный, противовирусный и противораковый эффект [10, 24]. Фенольные соединения терпенового ряда проявляют противогрибковую активность.

В одном исследовании были изучены шесть типов патогенных бактерий, а именно: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (*K92*), *Eshercia coli* (*E909*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P23*), *Bacillus cereus* (*B33*) и *Brucella melitensis* (*Bm42*). Антимикробную активность эфирного масла фенхеля оценивали путем измерения диаметра зоны ингибирования (*ZI*). Результаты показали, что у всех исследованных бактерий наблюдалась четкая зона ингибирования, что указывает на то, что эфирное масло фенхеля обладает активностью против этих бактерий.

Кроме того, эфирное масло, извлеченное из семян *F. vulgare*, продемонстрировало антибактериальную активность в отношении некоторых патогенных бактерий человека. Этанольные и водные экстракты *F. vulgare*, традиционно используемые для лечения желудочно-кишечных расстройств, проявляли активность в отношении *Campylobacter jejuni* и *Helicobacter pylori* [25].

Экстракт стеблей фенхеля демонстрирует сильное ингибирование *Bacillus subtilis, Aspergillus niger* и *Cladosporium cladosporioides* при значениях минимальной ингибирующей концентрации (MIC) 25, 250 и 125 мкг/мл соответственно. Кроме того, эфирное масло фенхеля обладает высокой ингибирующей активностью: значения MIC и минимальной бактерицидной концентрации (CMB) составляют 1 и 2 % против *Esherichia coli* и 2 и 4 % против *Staphylococcus aureus* соответственно.

Обнаружено, что фенилпропаноиды (эстрогол и анетол) стебля *F. vulgare* являются основными антимикробными агентами. Также установлено, что данный вид активности свойственен производным кумарина [26].

Представленные результаты подчеркивают потенциал применения фенхеля как природного антимикробного средства, способного подавлять рост различных патогенных бактерий. Необходимы дальнейшие исследования для изучения конкретных механизмов действия и потенциальных возможностей применения в контексте фармацевтической и пищевой безопасности.

Противогрибковая активность

В проведенном исследовании [27] противогрибковой активности эфирного масла фенхеля (EO) были отобраны четыре типа штаммов грибов: *Colletotrichum gloeosporioides, Phytophthora capsici, Sclerotinia sclerotiorum* и *Fusarium fujikuroi*. Исследователи определяли три параметра для интерпретации результатов: MIC, концентрацию фунгицида (MFC) в масле фенхеля и диаметр зоны ингибирования (IZD) в миллиметрах.

Противогрибковая активность эфирного масла фенхеля отмечалась в отношении различных штаммов грибов, причем наиболее сильная наблюдалась в отношении штамма *C. gloeosporioides*. Мощный противогрибковый эффект связывают с липофильной природой низкомолекулярных соединений, присутствующих в эфирном масле. Эти молекулы (анетол, фенхон, эстрогол и терпены, такие как лимонен, альфа-пинен и бета-пинен) обладают способностью проникать в мембрану штамма гриба и нарушать ее целостность, что приводит к ингибированию роста и активности грибов [28].

Кроме того, сообщалось, что эфирное масло фенхеля уменьшает рост мицелия и прорастание *Sclerotinia sclerotiorum*, фитопатогенного гриба [28], что позволяет предположить, что эфирное масло фенхеля может служить биофунгицидной альтернативой синтетическим фунгицидам в борьбе с этим типом грибковой инфекции.

Отмечено, что эфирное масло *F. vulgare* проявляет сильную противогрибковую активность в дозе 6 µl. Водный экстракт семян фенхеля проявляет значительную противогрибковую активность в отношении некоторых штаммов грибов по сравнению с гризеофульвином [29, 30].

Эти результаты подчеркивают потенциал эфирного масла фенхеля как эффективного противогриб-

кового средства, особенно в отношении специфических штаммов грибов. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы изучить основные механизмы его противогрибковой активности и оценить его применимость при разработке природных фунгицидов для сельскохозяйственных и медицинских целей.

Антиоксидантная активность

Многочисленные исследования продемонстрировали антиоксидантную активность *F. vulgare* [26]. Обнаружено, что фенольные соединения могут вносить значительный вклад в общую антиоксидантную активность плодов фенхеля [31–34].

Так, к примеру, исследования показали, что потребление продуктов, богатых танинами, может быть связано с повышенным риском рака пищевода. Это указывает на потенциальный канцерогенный эффект танинов. Однако также известны противоопухолевые и антимутагенные свойства танинов, которые могут быть объяснены их антиоксидантными свойствами, играющими важную роль в защите клеток от окислительного повреждения [35].

Выраженными антиоксидантными свойствами обладают также флавоноиды (кверцетин, лютеолин и кемпферол) [36], содержащиеся преимущественно в траве фенхеля.

Масляные, водные, метанольные, этанольные и ацетоновые экстракты плодов фенхеля были изучены на предмет их антиоксидантной активности с использованием нескольких методов, таких как активность по нейтрализации радикалов 2,2-дифенилпикрилгидразил (DPPH), способность восстанавливать железо, способность восстанавливать радикалы 3-этил-бензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS). Экстракты фенхеля показали высокую (зависящую от дозы) антиоксидантную активность по сравнению со стандартными антиоксидантами, такими как бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT) и альфа-токоферол. Например, при использовании дозы 100 мг этилового спирта и водного экстракта наблюдалось 99,1 и 77,5 % предотвращение перекисного окисления линолевой кислоты соответственно. Эта способность превышает результаты альфа-токоферола (36,1 %) при той же дозе. Эфирное масло плодов фенхеля проявило более сильную антиоксидантную активность по сравнению с водными и этанольными экстрактами, такая антиоксидантная активность обусловлена высоким содержанием полифенолов и флавоноидов, таких как 3-кофеоилхинная кислота, 4-кофеоилхинная кислота, 1,5-О-дикофеоилхинная кислота, розмариновая кислота, эриодиктиол-7-О-рутинозид, кверцетин-3-О-галактозид, кемпферол-3-О-рутинозид и кемпферол-3-О-глюкозид [37, 38].

В исследовании [39] было замечено, что дикорастущий фенхель обладает превосходной антиоксидантной активностью по сравнению с культивируемыми сортами. Кроме того, Parejo et al. (2004) выделили фенольные соединения из цветущих надземных частей *bitter fennel (Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *vulgare)* и обнаружили их антирадикальную активность, что позволяет сделать вывод о потенциальном вкладе этих соединений в фармакологические эффекты фенхеля.

Шахат, Ибрагим и др. исследовали эфирные масла трех египетских сортов плодов фенхеля: *Foeniculum vulgare* var. *azoricum, dulce* и *vulgare*, в результате чего выявили антиоксидантную активность у всех сортов, причем более мощные антиоксидантные свойства отмечены у *Foeniculum vulgare* var. *azoricum* и *dulce* [38].

Эти исследования в совокупности подчеркивают значительные антиоксидантные свойства фенхеля, связанные с присутствием таких БАВ, как фенольные соединения и эфирные масла.

Цитотоксическая активность

F. Chen, Y. Guo и др. провели исследование для оценки цитотоксической активности эфирного масла, экстрагированного из фенхеля, на линиях раковых клеток. В частности, они исследовали влияние масла на клеточную линию рака желудка MGC-803. Исследователи оценили скорость ингибирования и значение IC_{50}, которое представляет собой концентрацию, необходимую для ингибирования 50 % роста клеток [27].

Исследование показало, что эфирное масло фенхеля проявляет сильную цитотоксическую активность в отношении клеточной линии рака желудка MGC-803. Рассчитанное значение IC_{50} указывало на концентрацию, при которой эфирное масло эффективно подавляло рост клеток.

Важно отметить, что необходимы дальнейшие исследования для подтверждения этих выводов и изучения механизмов, лежащих в основе цитотоксической активности фенхеля.

Противовоспалительная активность

Традиционное использование фенхеля в иранской медицине для лечения воспалительных состояний подтверждается научными исследованиями [40]. Сообщается, что фенхель обладает противовоспалительным действием, что согласуется с его традиционным применением в иранской медицине.

Кроме того, Choi и Kwon, Kim и др. исследовали противовоспалительные свойства фенхеля, в том числе его метанольного экстракта. Результаты показали, что метанольный экстракт фенхеля проявляет противовоспалительную активность, действуя как через центральные, так и через периферические механизмы. Это говорит о том, что фенхель является перспективным растением для разработки противовоспалительных препаратов.

Эти результаты являются научным обоснованием традиционного применения фенхеля в качестве противовоспалительного средства в иранской медицине и народной медицине других стран. Однако необходимы дальнейшие исследования для выяснения специфических механизмов противовоспалительного действия фенхеля.

Эстрогенная активность

F. vulgare имеет давнюю историю использования в качестве эстрогенного средства, что объясняется его способностью усиливать лактацию, стимулировать менструацию, помогать при родах и повышать аппетит. Эстрогенные свойства связывали с одним из основных компонентов эфирного масла фенхеля – анетолом. Однако недавние исследования показали, что фармакологически активные вещества, ответственные за эти эффекты, могут выходить за рамки одного только анетола, охватывая димеры анетола, такие как дианетол и фотоанетол [41, 42]. Эти результаты свидетельствуют о более сложном взаимодействии БАВ фенхеля, которые способствуют его эстрогенным свойствам.

Гепатопротекторная активность

Гепатопротекторная активность эфирного масла фенхеля была продемонстрирована в различных исследованиях. В одном из них изучалось профилактическое действие эфирного масла фенхеля в отношении гепатотоксичности, при этом наблюдалось значительное снижение уровней аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы (Алт), щелочной фосфатазы и билирубина, что указывает на его гепатопротекторный потенциал [42, 43]. Кроме того, гистопатологическое исследование показало, что эфирное масло фенхеля обладает профилактическим действием против развития хронического поражения печени [40].

Противодиабетическая активность

Было обнаружено, что эфирное масло, выделенное из *F. vulgare*, обладает гипогликемической активностью. В экспериментальных исследованиях, проведенных на крысах с сахарным диабетом, введение эфирного масла фенхеля приводило к коррекции гипергликемии, что указывает на потенциальную возможность его использования при разработке противодиабетических препаратов [42]. Необходимы дальнейшие исследования и клинические испытания для изучения эффективности и безопасности эфирного масла.

Сердечно-сосудистая активность

Результаты исследования *in vivo* продемонстрировали, что водный экстракт листьев *F. vulgare* обладает потенциальной активностью в отношении сердечно-сосудистой системы у самцов крыс линии Спрег-Доули, находящихся под пентобарбиталовой анестезией. [44]. Внутривенное введение лиофилизированного водного экстракта, полученного при кипячении, приводило к значительному дозозависимому снижению артериального давления, в то время как частота сердечных сокращений и дыхания оставались неизменными. Экстракт же, полученный без кипячения, проявлял минимальную гипотензивную активность. Гипотензивный эффект не был опосредован адренергическими, мускариновыми, ганглионарными или серотонинергическими рецепторами. Однако гипотензивный эффект подавлялся антагонистами гистамина дозозависимым образом [44]. Эти данные свидетельствуют о том, что водный экстракт листьев *F. vulgare* может обладать прямым гипотензивным действием, потенциально вовлекая гистаминовые рецепторы. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения лежащих в основе механизмов и оценки клинической значимости этих эффектов в отношении сердечно-сосудистой системы.

Противораковая активность

В различных исследованиях изучалось влияние экстрактов *F. vulgare* или их компонентов на различные линии раковых клеток и модели животных.

Несколько исследований *in vitro* продемонстрировали цитотоксические эффекты экстрактов *F. vulgare* по отношению к различным линиям раковых клеток, включая рак молочной железы, рак толстой кишки, рак предстательной железы и раковые клетки печени [45]. Эти исследования показали, что экстракты *F. vulgare* могут ингибировать пролиферацию клеток, индуцировать апоптоз (запрограммированную гибель клеток) и ингибировать инвазию и миграцию раковых клеток.

Цитотоксическая активность подтверждена группой исследователей Chen, Guo (2020) и соавт., которые провели эксперимент на линиях раковых клеток с целью оценки эффекта эфирного масла, извлеченного из фенхеля; полученные результаты, основанные на расчетах скорости ингибирования и значения IC_{50}, указывают на то, что эфирное масло обладает большей активностью в отношении клеточной линии рака желудка MGC-803, чем в отношении других клеточных линий рака (Chen, Guo et al., 2020).

Влияние на когнитивную функцию

В нескольких исследованиях изучалось влияние экстрактов *F. vulgare* или его компонентов на функцию памяти и когнитивные процессы.

В исследованиях на животных экстракты *F. vulgare* показали многообещающие результаты в отношении улучшения памяти и когнитивных функций. Например, в исследовании, проведенном на мышах, введение экстракта *F. vulgare* привело к улучшению обучения и памяти в поведенческих тестах, таких

как водный лабиринт Морриса и тесты пассивного избегания [46]. Другое исследование на крысах продемонстрировало, что экстракт *F. vulgare* улучшает пространственную память и способность к обучению в задаче с лабиринтом лучевой руки. Эти результаты свидетельствуют о том, что экстракты *F. vulgare* могут оказывать положительное влияние на память и когнитивные функции.

Потенциальные механизмы

Согласно литературе, некоторые потенциальные механизмы действия компонентов растения показаны в таблице 1.

Таблица 1. Потенциальные механизмы действия растения

Table 1. Potential mechanisms of action of the plant

Фармакологический эффект Pharmacological Effect	**Возможные механизмы проявления эффектов** Possible Mechanisms of Efficacy
Антимикробная активность Antimicrobial activity	Наличие активных соединений (таких как олеиновая кислота и кумарин), обладающих антимикробными свойствами Presence of active compounds (such as oleic acid and coumarin) with antimicrobial properties
Антиоксидантная активность Antioxidant activity	Наличие антиоксидантных соединений (таких как флавоноиды и фенолы) Presence of antioxidant compounds (such as flavonoids and phenols)
Противовоспалительная активность Anti-inflammatory activity	Ингибирование ферментов циклооксигеназы и липоксигеназы для предотвращения острых и подострых заболеваний и аллергических реакций Inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes to prevent acute and subacute diseases and allergic reactions
Противотревожная активность Anti-anxiety activity	Активация ГАМКергических и эстрогеновых рецепторов для анксиолитического действия Activation of GABAergic and estrogen receptors for anxiolytic effects
Влияние на ЖКТ Effect on the gastrointestinal tract	Регуляция движения мышц кишечника, лечение желудочно-кишечных расстройств (противовоспалительное и спазмолитическое действия) и защитное действие при язвах (стимуляция заживления и нейтрализация соляной кислоты) Regulation of intestinal muscle movement, treatment of gastrointestinal disorders (anti-inflammatory and antispasmodic effects) and protective effect against ulcers (stimulation of healing and neutralization of hydrochloric acid)
Эстрогенная активность Estrogenic activity	Присутствие соединений (таких как анетол), способствующих выделению молока, уменьшающих менструальные боли и облегчающих роды Presence of compounds (such as anethole) that promote milk production, reduce menstrual pain and facilitate labor
Нормализация липидного обмена Normalization of lipid metabolism	Снижение уровня триглицеридов и общего холестерина в плазме крови, влияющее на уровень липопротеидов Reducing the level of triglycerides and total cholesterol in the blood plasma, affecting the level of lipoproteins
Сердечно-сосудистая активность Cardiovascular activity	Снижение систолического артериального давления и модуляция выведения натрия, калия и воды Reduction of systolic blood pressure and modulation of sodium, potassium and water excretion
Антидиабетическая активность Antidiabetic activity	Снижает уровень глюкозы в крови, повышает активность пероксида глютамина и влияет на уровень гликогена Reduces blood glucose levels, increases glutamine peroxide activity and affects glycogen levels
Противоопухолевая активность Antitumor activity	Наличие активных соединений (в т. ч. анетола), оказывающих ингибирующее и апоптотическое действие на рост опухоли The presence of active compounds (including anethole) that have an inhibitory and apoptotic effect on tumor growth
Гепатопротекторная активность Hepatoprotective activity	Снижение уровня печеночных ферментов (АСТ, АЛТ, ЩФ) и провоспалительных цитокинов Decreased levels of liver enzymes (AST, ALT, alkaline phosphatase) and pro-inflammatory cytokines
Влияние на когнитивную фукцию Effect on cognitive function	Ингибирование фермента ацетилхолинэстеразы, связанного с функцией памяти Inhibition of the enzyme acetylcholinesterase associated with memory function

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные научные исследования продемонстрировали разнообразные фармакологические свойства экстрактов фенхеля, включая противоаллергическое, обезболивающее, противовоспалительное, антиоксидантное, антибактериальное, антимикотическое, противораковое и цитотоксическое действие. Эти терапевтические свойства можно объяснить присутствием в фенхеле различных биологически активных веществ, преимущественно фенольной и терпеноидной природы. Вторичные метаболиты, содержащиеся в растении, играют жизненно важную роль при взаимодействии растений с окружающей средой и вносят значительный вклад в медицинский, сельскохозяйственный и промышленный секторы.

В литературе представлены обширные исследования антиоксидантного, противомикробного и эстрогенного действия фенхеля на различных эксперимен-

тальных моделях, которые дали многообещающие результаты. Показано, что все части растения, а не только плоды могут использоваться как потенциальное лекарственное растительное сырье.

Однако далеко не все проведенные исследования в полной мере раскрывают механизмы действия биологически активных соединений фенхеля и не всегда доказана связь фармакологических эффектов с присутствием конкретного соединения или группы соединений.

Поэтому крайне важно продолжить исследования для понимания терапевтических преимуществ фенхеля, особенно как источника соединений с гипотензивным, противораковым, противодиабетическим и антимикробным действием.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ghasemi P. A. Iranian medicinal and aromatic plants. *Islamic Azad University*. 2009.
2. Kooti W. Moradi M., Ali-Akbari S., Sharafi-Ahvazi N., Asadi-Samani M., Ashtary-Larky D. Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *Journal of HerbMed Pharmacology*. 2015;4(1):1–9.
3. Kooti W., Ghasemiboroon M., Asadi-Samani M., Ahangarpoor A., Abadi M. N. A., Afrisham R., Dashti N. G. The effects of hydro-alcoholic extract of celery on lipid profile of rats fed a high fat diet. *Advances in Environmental Biology*. 2014;8(9):325–330.
4. Kooti W. et al. Protective effects of celery (Apium Graveolens) on testis and cauda epididymal spermatozoa in rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2014;12(5):365–366.
5. Abe R., Ohtani K. An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;145(2):554–565. DOI: 10.1016/j.jep.2012.11.029.
6. Zafar S., Khan M. K., Perveen S., Iqbal M., AL-Huqail A. A. Fennel. In: Zia-Ul-Haq M., AL-Huqail A. A., Riaz M., Gohar U. F. Essentials of Medicinal and Aromatic Crops. Cham: Springer International Publishing; 2023. P. 483–514. DOI: 10.1007/978-3-031-35403-8_19.
7. Bernáth J., Németh É., Kattaa A., Héthelyi É. Morphological and chemical evaluation of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) populations of different origin. *Journal of Essential Oil Research*. 1996;8(3):247–253. DOI: 10.1080/10412905.1996.9700610.
8. Ahmadi A., Nasirinezhad F., Parivar K. Effect of aqueous extract of the aerial part of the Ruta graveolens on the spermatogenesis of immature Balb/c mice. *Razi Journal of Medical Sciences (Journal of Iran University of Medical Sciences)*. 2007;14(56):13–20.
9. He W., Huang B. A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(16):3595–3600.
10. Rahimi R., Ardekani M. R. S. Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2013;19:73–79. DOI: 10.1007/s11655-013-1327-0.
11. Miraj S., Kiani S. Study of antibacterial, antimycobacterial, antifungal, and antioxidant activities of *Foeniculum vulgare*: A review. *Der Pharmacia Lettre*. 2016;8(9):200–205.
12. Rather M. A., Dar B. A., Sofi S. N., Bhat B. A., Qurishi M. A. Foeniculum vulgare: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016;9:S1574–S1583. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.04.011.
13. Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Schmeda-Hirschmann G., Burillo J., Codina C. Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(7):1890–1897. DOI: 10.1021/jf030717g.
14. Badgujar S. B., Patel V. V., Bandivdekar A. H. *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *BioMed research international*. 2014;2014:842674. DOI: 10.1155/2014/842674.
15. Senatore F. Oliviero F., Scandolera E., Taglialatela-Scafati O., Roscigno G., Zaccardelli M., De Falco E. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. vulgare var. azoricum (Mill.) Thell]. *Fitoterapia*. 2013;90:214–219. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.07.021.
16. Križman M., Baričevič D., Prošek M. Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC–MS using a monolithic reversed-phase column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;43(2):481–485. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.07.029.
17. Mahmoudi Z., Soleimani M., Saidi A., Khamisipour G., Azizsoltani A. Effects of *Foeniculum vulgare* ethanol extract on osteogenesis in human mecenchymal stem cells. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2013;3(2):135–142.
18. Iserin P. et al. Larousse des plantes médicinales identification, préparation, soins. Paris: Editions Larousse; 2001. 15 p.
19. Arnal-Schnebelen B. Algomenorrhea (dysmenorrhea) and herbal medicine. De La Recherche A La Pratique. 2004.
20. Barros L., Heleno S. A., Carvalho A. M., Ferreira I. C. F. R. Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(10):2458–2464. DOI: 10.1016/j.fct.2009.07.003.
21. Qiu S., Sun H., Zhang A.-H., Xu H.-Y., Yan G.-L., Han Y., Wang X.-J. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2014;12(6):401–406. DOI: 10.1016/S1875-5364(14)60063-7.
22. Roby M.H.H. Sarhan M. A., Selim K. A.-H., Khalel K. I. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*. 2013;44:437–445. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.10.012.
23. Moghaddam M., Mehdizadeh L. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In: Soft Chemistry and Food Fermentation. New York: Academic Press; 2017. P. 379–419. DOI: 10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8.
24. Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2007;55:315–327. DOI: 10.1007/s00005-007-0039-1.
25. Mahady G. B., Pendland S. L., Stoia A., Hamill F. A., Fabricant D., Dietz B. M., Chadwick L. R. *In Vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research*. 2005;19(11):988–991. DOI: 10.1002/ptr.1776.
26. Kwon Y. S., Choi W. G., Kim W. J., Kim W. K., Kim M. J., Kang W. H., Kim C. M. Antimicrobial constituents of foeniculum vulgare. *Archives of Pharmacal Research*. 2002;25(2):154–157. DOI: 10.1007/BF02976556.
27. Chen F., Guo Y., Kang J., Yang X., Zhao Z., Liu S., Ma Y., Gao W., Luo D. Insight into the essential oil isolation from *Foeniculum vulgare* Mill. fruits using double-condensed microwave-assisted hydrodistillation and evaluation of its antioxidant, antifungal and cytotoxic activity. *Industrial Crops and Products*. 2020;144:112052. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.112052.
28. Soylu S., Yigitbas H., Soylu E. M., Kurt Ş. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103(4):1021–1030. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03310.x.
29. Singh B., Kale R. K. Chemomodulatory action of Foeniculum vulgare (Fennel) on skin and forestomach papillomagenesis, enzymes associated with xenobiotic metabolism and antioxidant status in murine model system. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(12):3842–3850. DOI: 10.1016/j.fct.2008.10.008.

30. Taie H. A. A., Helal M. M., Helmy W., Amer H. Chemical composition and biological potentials of aqueous extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.). *Journal of Applied Sciences Research*. 2013;9:1759–1767. DOI: 10.5555/20133281545.
31. Maqsood S., Benjakul S., Shahidi F. Emerging Role of Phenolic Compounds as Natural Food Additives in Fish and Fish Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013;53(2):162–179. DOI: 10.1080/10408398.2010.518775.
32. Ruberto G., Baratta M. T., Deans S. G., Dorman H. J. D. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Foeniculum vulgare and Crithmum maritimum Essential Oils. *Planta Medica*. 2000;66(8):687–693. DOI: 10.1055/s-2000-9773.
33. Boudjouref M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia compestris* L. Setif: Université Ferhat Abbes; 2011. 287 p.
34. Daas Amiour S. Etude Quantitative des Composes Phenoliques des Extraits De Trois Varietes De Dattes (Phoenix Dactylifera L.) Et Evaluation In Vitro De Leur Activite Biologique. Batna: Université El-Hadj Lakhdar; 2009. 159 p.
35. Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A. R., Simonič M., Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 2005;89(2):191–198. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.025.
36. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016;5:e47. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
37. Oktay M., Gülçin İ., Küfrevioğlu Ö. İ. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT – Food Science and Technology*. 2003;36(2):263–271. DOI: 10.1016/S0023-6438(02)00226-8.
38. Shahat A., Ibrahim A., Hendawy S., Omer E., Hammouda F., Abdel-Rahman F., Saleh M. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. *Molecules*. 2011;16(2):1366–1377. DOI: 10.3390/molecules16021366.
39. Faudale M., Viladomat F., Bastida J., Poli F., Codina C. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Wild, Edible, and Medicinal Fennel from Different Mediterranean Countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(6):1912–1920. DOI: 10.1021/jf073083c.
40. Lim T. K. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. Volume 9. Modified Stems, Roots, Bulbs. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. DOI: 10.1007/978-94-017-9511-1.
41. Albert-Puleo M. Fennel and anise as estrogenic agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 1980;2(4):337–344. DOI: 10.1016/s0378-8741(80)81015-4.
42. Rather M. A., Dar B. A., Sofi S. N., Bhat B. A., Qurishi M. A. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016;9(2):S1574–S1583. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.04.011.
43. Özbek H., Uğraş S., Dülger H., Bayram I., Tuncer I., Öztürk G., Öztürk A. Hepatoprotective effect of Foeniculum vulgare essential oil. *Fitoterapia*. 2003;74(3):317–319. DOI: 10.1016/s0367-326x(03)00028-5.
44. Abdul-Ghani A.-S., Amin R. The vascular action of aqueous extracts of Foeniculum vulgare leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 1988;24(2–3):213–218. DOI: 10.1016/0378-8741(88)90154-7.
45. Berrington D., Lall N. Anticancer Activity of Certain Herbs and Spices on the Cervical Epithelial Carcinoma (HeLa) Cell Line. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012:564927. DOI: 10.1155/2012/564927.
46. Koppula S., Kumar H. *Foeniculum vulgare* Mill (Umbelliferae) Attenuates Stress and Improves Memory in Wister Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(4):553–558. DOI: 10.4314/tjpr.v12i4.17.

Research article / Оригинальная статья

UDC 615.322

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1751

Check for updates

CC BY 4.0

Analysis of *cis*-isomer-enriched dihydroquercetin sample by 1D and 2D NMR spectroscopy

Roman P. Terekhov[1]✉, Amir Taldaev[2, 3], Eduard V. Bocharov[3, 4], Denis I. Pankov[1], Anastasiya D. Savina[1], Irina A. Selivanova[1]

[1] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). A. P. Nelyubin Institute of Pharmacy, Department of Chemistry. 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[2] Institute of Biomedical Chemistry. 10/8, Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russia
[3] Moscow Institute of Physics and Technology, MIPT, Phystech. Center for Research into Molecular Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases. 9, Institutsky lane, Dolgoprudny, Moscow region, 141701, Russia
[4] Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences. Laboratory of Biomolecular NMR-Spectroscopy. 16/10, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117997, Russia

✉ **Corresponding author:** Roman P. Terekhov. **E-mail:** terekhov_r_p@staff.sechenov.ru

ORCID: Roman P. Terekhov – https://orcid.org/0000-0001-9206-8632; Amir Taldaev – https://orcid.org/0000-0003-2593-1963; Eduard V. Bocharov – https://orcid.org/0000-0002-3635-1609; Denis I. Pankov – https://orcid.org/0009-0007-6195-6400; Anastasiya D. Savina – https://orcid.org/0009-0000-5123-8746; Irina A. Selivanova – https://orcid.org/0000-0002-2244-445X.

Received: 16.02.2024 **Accepted:** 08.05.2024 **Published:** 08.05.2024

Abstract

Introduction. The structure of dihydroquercetin (DHQ) is characterized by two chiral centers at positions 2 and 3 of the benzopyran cycle, resulting in possible diastereomers: *trans*- and *cis*-isomers. Therefore, the development of methods for qualitative and quantitative control of DHQ diastereomers in analyzed samples is essential for patient safety management. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is one of the physicochemical methods that can be used for this purpose.

Aim. The study objective was to accumulate the analytical and structural characteristics of *cis*-DHQ by NMR spectroscopy of the spheroidal form of this flavonoid (DHQs).

Materials and Methods. 1D ^{1}H, ^{1}H,^{1}H-COSY, ^{1}H,^{1}H-NOESY, and ^{1}H,^{13}C-HSQC NMR spectra were acquired at 298 K on an 800 MHz NMR spectrometer equipped with a TXI triple resonance probe. The number of scans was 32. The mixing time in the NOESY experiment was 400 ms. The ^{1}H and ^{13}C were analyzed using CcpNmr software. The dihedral angles were calculated by applying the Karplus equation.

Results and discussion. In *trans*-DHQ, the chemical shift values for H2 and H3 are 4.93 ppm and 4.52 ppm, respectively, and in *cis*-DHQ they are 5.31 ppm and 4.20 ppm, respectively. The spin-spin coupling constants between H2 and H3 of *trans*- and *cis*-DHQ are 12.00 Hz and 2.40 Hz, respectively. Thus, the dihedral angles for the *trans*- and *cis*-isomers are 154° and 64°, respectively. We found that DHQs contains 12.5 % of the *cis*-isomer.

Conclusion. Our experiments confirmed that NMR spectroscopy can discriminate between *trans*- and *cis*-DHQ based on the chemical shift values for the cross-peaks of H2 and H3. The second major finding was that this method can be considered as a more selective quantitative analysis than HPLC with UV detection without reference. One of the most important results of this study for drug development is the updated information on the structural parameters of DHQ diastereomers in the liquid phase.

Keywords: taxifolin, flavonoids, stereoisomerism, diastereomers, NMR spectroscopy, pharmaceutical analysis

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

Contribution of the authors. Roman P. Terekhov – formal analysis, project and data administration, funding acquisition, original draft preparation. Amir Taldaev – methodology, validation, investigation, review and editing. Eduard V. Bocharov – methodology, validation, review and editing. Denis I. Pankov – formal analysis; validation, review and editing. Anastasiya D. Savina – visualization, original draft preparation. Irina A. Selivanova – conceptualization, supervision, review and editing.

Funding. This work was financed by the Russian Science Foundation (No 23-75-01130), https://rscf.ru/project/23-75-01130/

For citation: Terekhov R. P., Taldaev A., Bocharov E. V., Pankov D. I., Savina A. D., Selivanova I. A. Analysis of *cis*-isomer-enriched dihydroquercetin sample by ^{1}D and ^{2}D NMR spectroscopy. *Drug development & registration*. 2024;13(2):68–76. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1751

Анализ *цис*-изомер-обогащенного образца дигидрокверцетина путем 1D- и 2D-ЯМР-спектроскопии

Р. П. Терехов[1]✉, А. Х. Тальдаев[2, 3], Э. В. Бочаров[3, 4], Д. И. Панков[1], А. Д. Савина[1], И. А. Селиванова[1]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). Институт фармации им. А. П. Нелюбина, кафедра химии. 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» (ИБМХ). 119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8
[3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ, Физтех). Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний. 141701, Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9
[4] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). Лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии. 117997, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

✉ **Контактное лицо:** Терехов Роман Петрович. **E-mail:** terekhov_r_p@staff.sechenov.ru

© Terekhov R. P., Taldaev A., Bocharov E. V., Pankov D. I., Savina A. D., Selivanova I. A., 2024
© Терехов Р. П., Тальдаев А. Х., Бочаров Э. В., Панков Д. И., Савина А. Д., Селиванова И. А., 2024

ORCID: Р. П. Терехов – https://orcid.org/0000-0001-9206-8632; А. Х. Тальдаев – https://orcid.org/0000-0003-2593-1963;
Э. В. Бочаров – https://orcid.org/0000-0002-3635-1609; Д. И. Панков – https://orcid.org/0009-0007-6195-6400;
А. Д. Савина – https://orcid.org/0009-0000-5123-8746; И. А. Селиванова – https://orcid.org/0000-0002-2244-445X.

Статья поступила: 16.02.2024 **Статья принята в печать:** 08.05.2024 **Статья опубликована:** 08.05.2024

Резюме

Введение. Структура дигидрокверцетина (ДКВ) характеризуется наличием двух центров хиральности в положениях 2 и 3 бензопиранонового цикла, что обуславливает возможность существования диастереомеров: *транс*- и *цис*-изомеров. Таким образом, разработка аналитических подходов к качественному и количественному контролю диастереомеров ДКВ в субстанции является необходимой для обеспечения безопасности пациентов. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – один из физико-химических методов, который можно использовать для решения этой задачи.

Цель. Целью данного исследования было накопление аналитических и структурных характеристик *цис*-ДКВ при помощи спектроскопии ЯМР сфероидной формы данного флавоноида.

Материалы и методы. Спектры 1D-ЯМР ^{1}H, ^{1}H,^{1}H-COSY, ^{1}H,^{1}H-NOESY и ^{1}H,^{13}C-HSQC были получены при 298 K на спектрометре, оборудованном датчиком тройного резонанса и работающем на частоте, составляющей 800 МГц на ^{1}H. Число сканирований для каждого спектра составило 32. Время смешения в ходе эксперимента NOESY – 400 мс. Спектры ^{1}H и ^{13}C были проанализированы и отнесены при помощи программы CcpNmr. Торсионные углы рассчитаны по уравнению Карплуса.

Результаты и обсуждение. В *транс*-ДКВ величина химического сдвига для H2 и H3 составила 4,93 м.д. и 4,52 м.д., а для *цис*-ДКВ – 5,31 м.д. и 4,20 м.д. соответственно. Константы спин-спинового взаимодействия между атомами водорода в положениях 2 и 3 *транс*- и *цис*-изомеров были 12,00 Гц и 2,40 Гц соответственно. Таким образом, торсионные углы между этими атомами водорода составили 154° в *транс*-ДКВ и 64° в *цис*-ДКВ. Установлено, что сфероидная форма ДКВ содержит 12,53 % *цис*-изомера.

Заключение. Результаты исследования подтверждают возможность использования спектроскопии ЯМР для идентификации *транс*- и *цис*-ДКВ по величинам химических сдвигов кросс-пиков H2 и H3. Другим важным результатом стало обнаружение большей селективности данного количественного метода анализа в сравнении с УФ-ВЭЖХ в отсутствие стандартного образца на *цис*-изомер. Одним из значимых результатов данного исследования для разработки лекарственных средств стало уточнение информации о структуре диастереомеров ДКВ в жидкой фазе.

Ключевые слова: таксифолин, флавоноиды, стереохимия, диастереомеры, ЯМР-спектроскопия, фармацевтический анализ

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

Вклад авторов. Р. П. Терехов – формальный анализ, администрирование данных и проекта, получение финансирования, создание и редактирование черновика рукописи. А. Х. Тальдаев – методология, верификация данных, проведение исследования, редактирование рукописи. Э. В. Бочаров – методология, верификация данных, редактирование рукописи. Д. И. Панков – верификация данных, формальный анализ, редактирование рукописи. А. Д. Савина – визуализация, создание и редактирование черновика рукописи. И. А. Селиванова – концептуализация, руководство исследованием, редактирование рукописи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-01130, https://rscf.ru/project/23-75-01130/

Для цитирования: Терехов Р. П., Тальдаев А. Х., Бочаров Э. В., Панков Д. И., Савина А. Д., Селиванова И. А. Анализ *цис*-изомер-обогащенного образца дигидрокверцетина путем ^{1}D- и ^{2}D-ЯМР-спектроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):68–76. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1751

INTRODUCTION

Dihydroquercetin (DHQ), also known as taxifolin, is a chiral compound that present in numerous natural objects. The systematic name of this flavonoid is 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-2,3-dihydro-4*H*-1-benzopyran-4-one. Due to its wide range of biological effects, this natural polyphenol is a promising object for the design of new phytopharmaceutical drugs [1].

DHQ is characterized by high antioxidant activity [2] and low bioavailability [3]. There are several ways to increase the bioavailuability of this flavonoid, including design of new pharmaceutics [4–5], synthesis of chemical derivatives [2], and phase modification [6–7]. It has been shown, that pseudopolymorphs of DHQ are characterized by different biological effects.

The spheroidal form of DHQ (DHQs) was obtained by spray drying [8]. In a recent study, we found that this substance can be considered as *cis*-isomer-enriched form of DHQ [9]. The structure of this flavonoid is characterized by two chiral centers in positions 2 and 3 of benzopyran cycle, which results in possible diastereomers of DHQ (Figure 1): *trans*- and *cis*-forms.

It is known that diastereomers demonstrate unequal biological activity and toxicity. There are separate studies on the stereospecific pharmacokinetics of DHQ and the asymmetric distribution of stereoisomers in the body [10]. Therefore, the development of analytical methods for qualitative and quantitative control of DHQ diastereomers in a substance is essential for patient safety management.

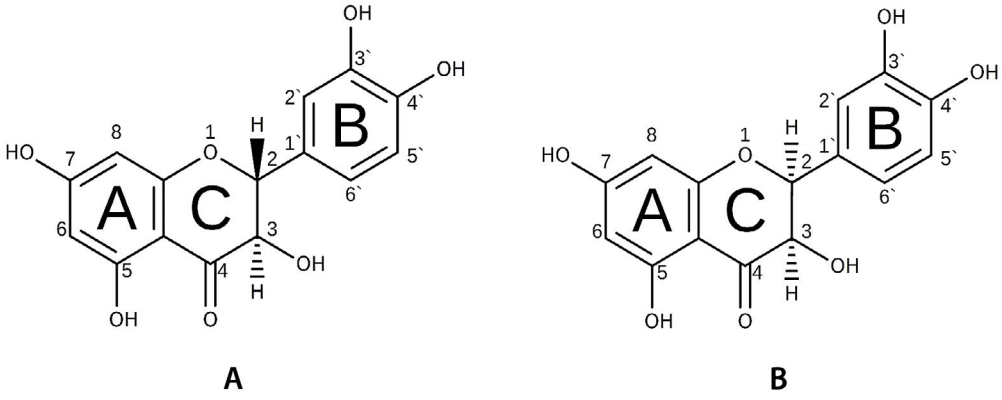


Figure 1. **Molecular structures of DHQ diastereomers: trans-DHQ (A) and cis-DHQ (B)**

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is one of the physicochemical methods, that can be utilized for this purpose. NMR ^{1}H and ^{13}C spectroscopies are useful approaches for determining the configuration of organic compounds in solution. Enantiomers have identical NMR parameters, which makes them indistinguishable. However, it can be used to identify diastereomers.

NMR spectroscopy is approved for quality control of active pharmaceutical ingredients (APIs) by numerous regulatory guides, including the pharmacopeias of Russia, the Eurasian Economic Union, the European Union, and the United States of America. It is used in pharmaceutical practice for identification [11], qualitative control [12], and determination of impurities [13] and residual organic solvents. There are two ways of compound identification by NMR spectroscopy: by spectral data interpretation and via comparison of the obtained NMR spectrum with a reference. The European Pharmacopoeia noted, that solid-state NMR spectroscopy provides information about the molecules conformations. Also, 2D NMR spectroscopy is widely used in structural chemistry to describe the conformation of small molecules [14–15], biopolymers [16–17], and their interactions [18].

The academic literature has revealed a gap in NMR spectral data of *cis*-DHQ. To the best of our knowledge, the 2D NMR spectra of this compound were not previously published. Therefore, the complex analysis of DHQs by NMR spectroscopy looks promising for future pharmaceutical analysis of this substance.

The purpose of current research was to accumulate the analytical and structural characteristics of *cis*-DHQ by NMR spectroscopy of DHQs.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The initial substance of DHQ (99.1 %) was provided by Ametis JSC (Russia) hereinafter referred to as raw DHQ (DHQr). The synthesis of DHQs was described previously [6, 8]. The deuterated methanol (99.8 %, Cambridge Isotope Laboratories, USA) was used as solvent.

NMR Spectroscopy

DHQ samples in amount of 15 mg were dissolved in 450 μL of methanol. The solutions were placed in a 5 mm NMR tube. NMR spectra were acquired at 298 K on an 800-MHz Bruker Avance III NMR spectrometer (Germany) equipped with a TXI triple resonance probe. The pulse programs for 1D ^{1}H, ^{1}H,^{1}H-COSY, ^{1}H,^{1}H-NOESY, and ^{1}H,^{13}C-HSQC were zg, cosydfetgp.2, noesyetgp, and hsqcetgpsp, respectively. In all cases, the number of scans was 32. The mixing time in NOESY experiment was 400 ms. The ^{1}H and ^{13}C spectra were analyzed with CcpNmr software [19].

The dihedral angles (φ) were calculated using Karplus equation:

$$J = A + B \cdot \cos(\varphi) + C \cdot \cos(2\varphi),$$

where J is spin-spin coupling constant (SSCC) and A, B, and C are empirically derived parameters, which in our case equal to 4, (–1), and 9.5, respectively.

The interatomic distances (r_{ij}) were calculated by formula:

$$r_{ij} = \sqrt[6]{\frac{I_{std}}{I_{ij}} \cdot r_{std}^{6}},$$

where I_{ij} is the volume of cross-peak in NOESY spectrum of analyzed atoms, I_{std} and r_{std} are volume of cross-peak in NOESY spectrum and interatomic distance of reference atoms. In current experiment H5′ and H6′ were used as reference, and these interatomic distance was equal to 2.47 Å.

RESULTS

The complex analysis, included 1D and 2D NMR spectroscopy, was performed for the initial DHQr and *cis*-isomer enriched DHQs. As DHQr is characterized by

higher diastereomeric homogeneity, it can be considered as a reference of *trans*-isomer.

Figure 2 presents the results of 1D NMR ^{1}H spectroscopy. Regardless of configuration, the spectrum profile of DHQ in MeOH-d_4 with water includes five signals associated with the following hydrogen atoms: H8 (δ = 5.90 ppm; 1H; d), H6 (δ = 5.94 ppm; 1H; d), H5′ and H6′ (δ = 6.86 ppm; 6H; m), H2′ (δ = 6.99 ppm; 1H; d), and OH5 (δ = 11.75 ppm; 1H; s). Additionally, *trans*-DHQ can be identified by signal of hydrogens in chiral centers: H3 (δ = 4.52 ppm; 1H; d) and H2 (δ = 4.93 ppm; 1H; d). In contrast, in *cis*-DHQ, these signals have different characteristics: H3 (δ = 4.20 ppm; 1H; d) and H2 (δ = 5.31 ppm; 1H; d). The SSCC between hydrogen atoms in positions 2 and 3 for *trans*- and *cis*-DHQ were 12.00 Hz and 2.40 Hz, respectively. Further calculations with Karplus equation showed that observed SSCC of hydrogen signals of *trans*-DHQ can be a result of a dihedral angle of 154° between these atoms, while in *cis*-DHQ this structural parameter should be 64° according to our data. Based on the peak volumes in spectrum of DHQs, it is found that the analyzed substance contains 12.5 % of *cis*-isomer.

The data of 2D HSQC NMR spectroscopy (Figure 3) generally confirmed the hydrogens assignments to signals in 1D NMR 1H spectra. Five hydrogens form cross-peaks with aromatic carbon atoms: from H8 to C8 (δ = 94.72 ppm), from H6 to C6 (δ = 95.81 ppm), from H5′ and H6′ to C5′ and C6′ (δ = 114.52 ppm), and from H2′ to C2′ (δ = 119.61 ppm). Also, there are two cross-peaks with sp^3-hybridized carbon atoms, bounded with oxygen atoms: from H3 to C3 (δ = 72.18 ppm) and from H2 to C2 (δ = 83.60 ppm). What stands out in this figure is the presence of two additional cross-peaks in DHQs spectrum, that are not observed in DHQr. They characterized by the δ-values of carbon atoms, that are similar to C3 and C2, however, the δ-values of hydrogen atoms are equal to the parameters of *cis*-configuration of DHQ.

The profile of 2D COSY NMR spectra exhibited three spin systems in the DHQ molecule (Figure 4), that are associated with A-, B-, and C-rings. The cross-peak at δ 4.56/4.95 ppm is associated with H2 and H3 of *trans*-DHQ. H6 showed in COSY spectrum a cross-peak to H8 (δ 5.94/5.98 ppm). The last, B-ring can be described by the cross-peak at δ 6.85/6.90 ppm (H5′ and H6′/H2′). The additional cross-peak in COSY spectrum of DHQs at δ 4.23/5.34 ppm can be assigned to H2 and H3 of *cis*-DHQ.

Comparing with COSY spectra, the 2D NOESY NMR spectra were enriched with several new cross-peaks (Figure 5). In the spectrum of DHQr, the H2 of the *trans*-diastereomer showed cross-peaks with OH5 (δ 4.93/11.75), H2′ (δ 4.93/6.87 ppm), H6′ (δ 4.93/6.98 ppm), and H8 (δ 4.93/5.90 ppm). Furthermore, H3 of the same configuration forms H2′ (δ 4.53/6.87 ppm), H6′ (δ 4.53/6.98 ppm), and OH5 (δ 4.53/11.75 ppm). The hydrogens of C-ring in *cis*-isomer also give cross-peaks with the same atoms.

Based on the 2D NOESY NMR spectra profile, the interatomic distances in the analyzed compounds were calculated and compered with X-ray diffraction data (XRD), published in literature [20–22], and molecule parameters are estimated using Dreiding models (Table 1). Due to the method's limitation the distance between H3 and H8 could not identified for both diastereomers. For the molecule of *trans*-DHQ, the correlation between structural parameters, obtained by NOESY NMR spectroscopy and XRD, was moderate (r^2 = 0.5388). Dreiding models allow to build two conformers for *trans*-isomer: The first structure is characterized by the axial positions

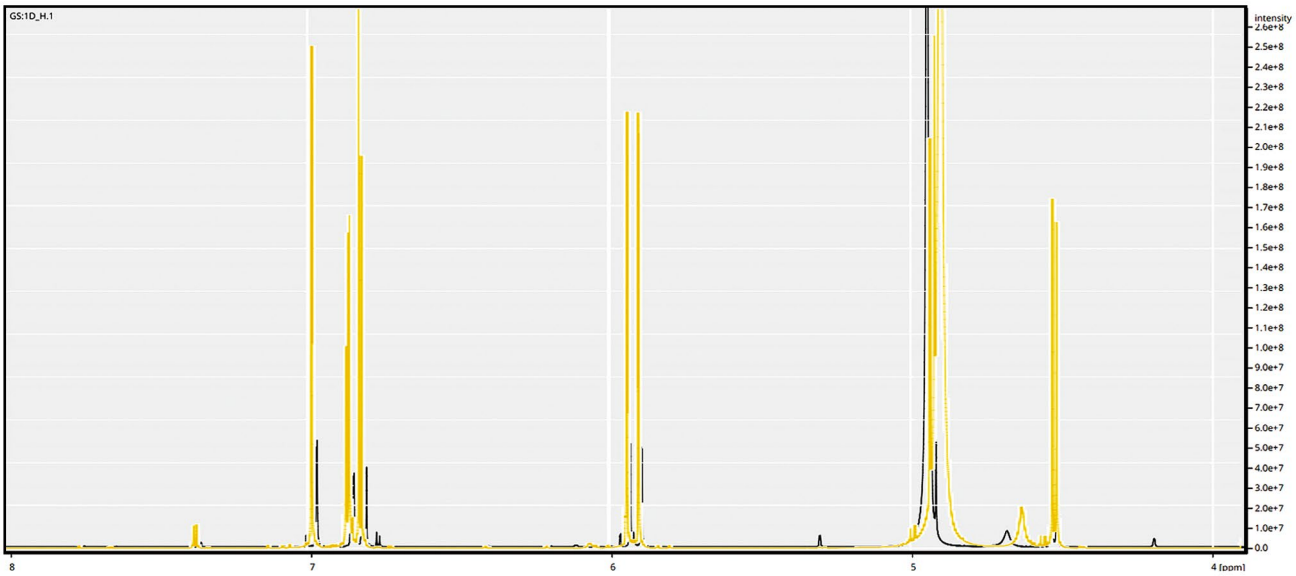


Figure 2. **1D NMR ^{1}H spectra of DHQs (gray) and DHQr (yellow)**

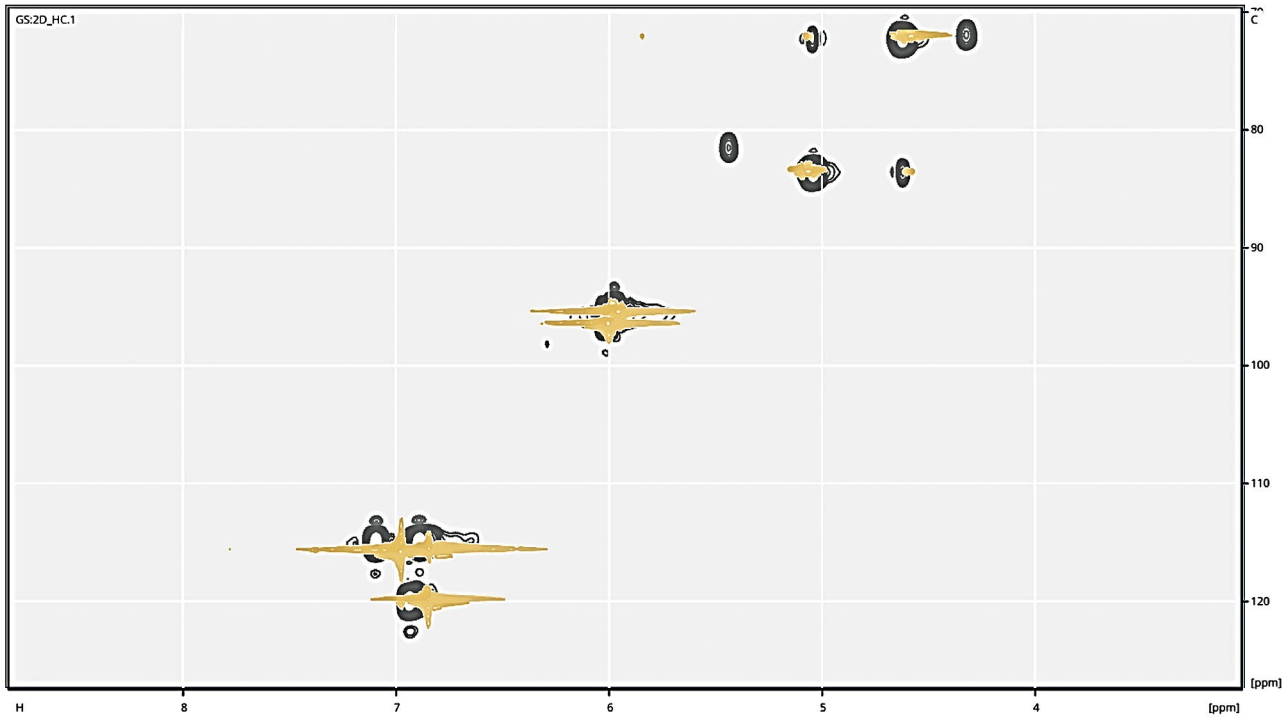


Figure 3. **2D HSQC NMR spectra of DHQs (gray) and DHQr (yellow)**

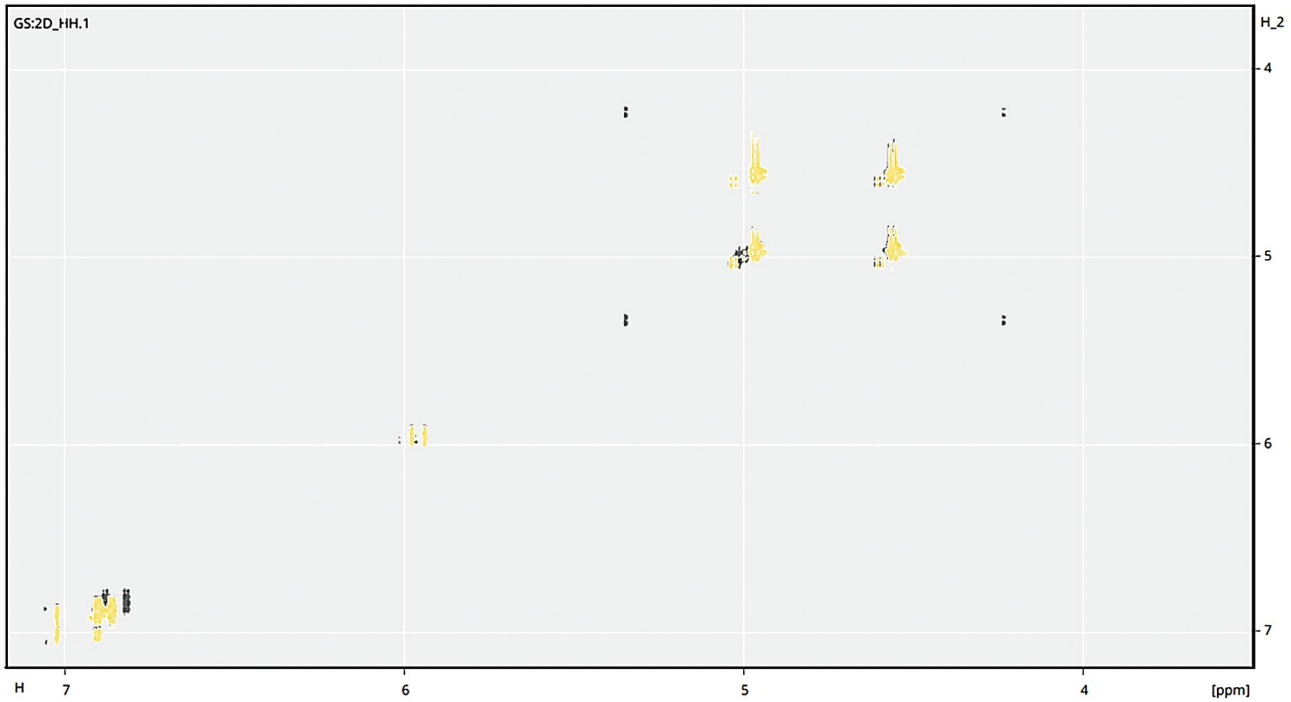


Figure 4. **COSY 1H spectra of DHQs (gray) and DHQr (yellow)**

of both H2 and H3, and the second one has these atoms in equatorial positions. The correlation coefficients between NMR data and interatomic distances obtained using Dreiding models for H2*a*H3*a* and H2*e*H3*e* conformers were 0.8260 and 0.6977, respectively. Also, the structure of *cis*-DHQ gives an opportunity to generate two conformers via Dreiding models. The correlation between NMR data and characteristic of H2*e*H2*a*-conformer was insignificantly higher ($r^2 = 0.8016$) comparing with H2*a*H2*e*-conformer ($r^2 = 0.7723$).

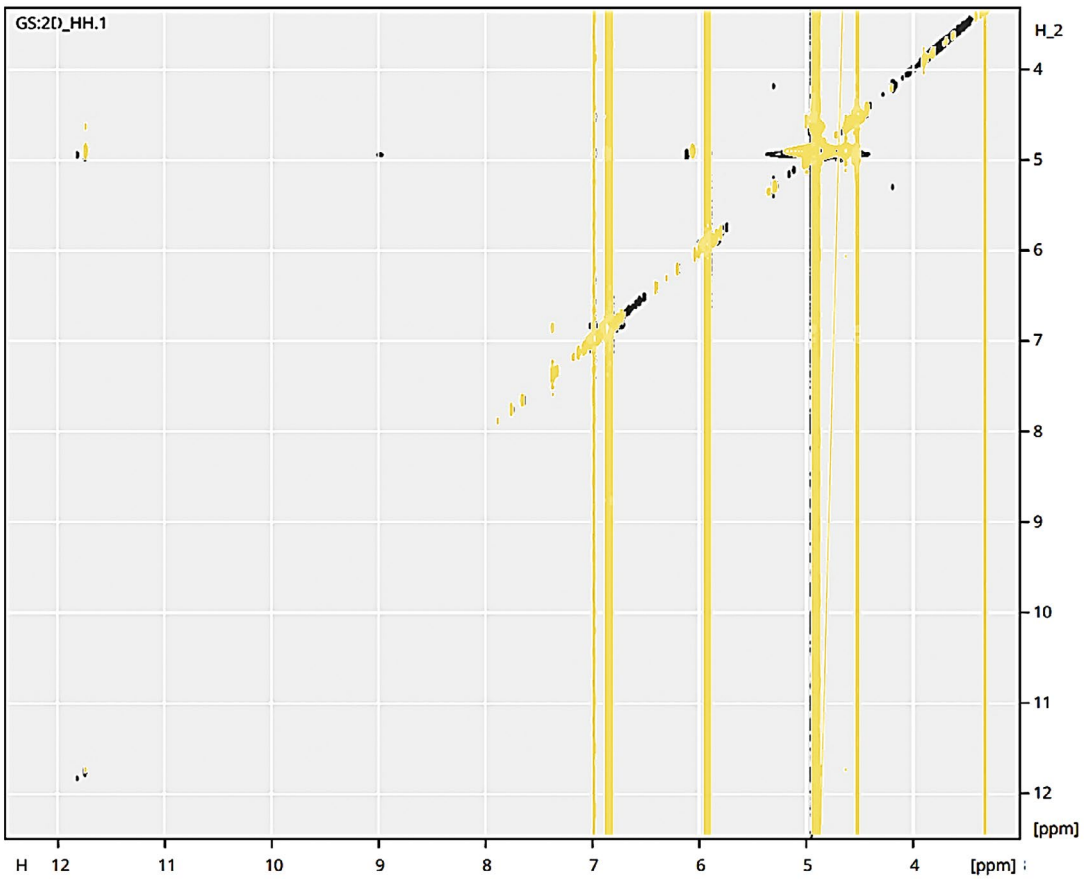


Figure 5. **NOESY spectra of DHQs (gray) and DHQr (yellow)**

Table 1. **Interatomic distances in molecules of conformers of DHQ diastereomers**

DHQ molecule		Source of data	Interatomic distance, Å								
			H2					H3			
Configuration	Conformation		H3	OH5	H8	H2′	H6′	OH5	H8	H2′	H6′
trans-	–	NMR	3.14	4.42	3.52	2.75	2.50	3.98	–	2.74	2.86
	H2*a*H3*a*	XRD	2.84	4.76	4.11	3.65	2.64	4.36	4.71	2.31	4.35
		DM	3.07	4.54	3.98	3.35	2.71	4.34	5.14	3.51	3.47
	H2*e*H3*e*		2.47	5.70	4.54	3.59	2.39	4.34	5.78	3.19	3.90
cis-	–	NMR	2.40	–	3.41	3.14	2.88	3.58	–	3.43	3.15
	H2*a*H3*e*	DM	2.47	4.62	3.98	3.47	2.27	4.14	5.74	3.78	3.59
	H2*e*H3*a*		2.47	5.70	4.46	3.43	2.43	4.34	5.26	3.59	3.63

Note. *a* – axial position of hydrogen; *e* – equatorial position of hydrogen; XRD – X-ray diffraction (mean, calculated on the basis of literature data [20–22]); DM – Dreiding models.

Together, these results provide important insights into structures of DHQ diastereomers, which will be discussed in the next section.

DISCUSSIOIN

This study set out with the aim of assessing the opportunities of NMR spectroscopy in qualitative and quantitative control of DHQ diastereomers in API.

A number of NMR data was found in literature. In general, our spectra's profiles reproduced the results of previous researches, and signal were assigned correctly [23–25]. The absence of the majority signals associated with hydrogen atoms in hydroxyl functional groups can be explained by hydrogen-deuterium exchange between solvent and flavonoid.

The majority of authors focused on the *trans*-DHQ; however, information about the spectral properties of *cis*-isomer is also available [26–29]. Most articles reported data obtained for deuterated methanol solutions of DHQ, the same way as for our research. According to this literature, the chemical shift values for H2 and H3 in methanol solutions of *trans*-DHQ varied from 4.89 ppm to 5.00 ppm and from 4.49 ppm to 4.60 ppm, respectively [26, 28–32]. In contrast, hydrogen atoms in positions 2 and 3 of *cis*-diastereomer are characterized by δ 5.30 ppm and δ 4.20 ppm, respectively [29]. The results of current study are in line with the literature data: In *trans*-isomer the chemical shift values for H2 and H3 were 4.93 ppm and 4.52 ppm, respectively, and in *cis*-DHQ they were 5.31 ppm and 4.20 ppm, respectively. So, we confirmed, that 1D NMR spectroscopy can be used in pharmaceutical analysis to identify the diastereomers of DHQ in API.

The quantitative analysis of DHQ diastereomers was performed by method of internal normalization of 1D NMR ^{1}H spectrum of DHQs. It shows that molecular ratio between *trans*- and *cis*-isomers in the analyzed sample was 7:1. This finding is contrary to our previous study [9], which reported the results of HPLC analysis of the same substance. The quantity of *cis*-DHQ was lower (9.5 %), and *trans*/*cis*-isomers ratio was 8:1. Several studies noted that validation parameters values for the quantitative analysis performed via NMR spectroscopy and HPLC are comparable [33–36]. Taking into account the fact that diastereomers may be characterized by different values of molar extinction coefficients at the same wavelengths [37–39], it can be considered that without a reference sample of *cis*-DHQ, NMR spectroscopy is a more specific and preferable method for quantitative analysis of DHQ diastereomers. Based on the results of current study, we suppose that ratio of molar extinction coefficients at 288 nm of *trans*- and *cis*-isomers of DHQ should be 1:0.875.

Our results are relevant not only for applied science but also for basic science. The 2D NMR spectra (COSY, HSQC) of *trans*-DHQ were available before our research [40]. However, according to our data, it is the first case when traces of *cis*-DHQ are observed by these methods. As 2D COSY NMR spectroscopy is characterized by high sensitivity, it can make sense for impurities control in pharmaceutical analysis.

We found that SSCC between H2 and H3 of *trans*- and *cis*-DHQ are 12.00 Hz and 2.40 Hz, respectively. So, the dihedral angles for *trans*- and *cis*-isomers are 154° and 64°. Our findings match those observed in earlier studies. In the literature, the SSCC of these signals *trans*- and *cis*-DHQ are 11.4 Hz and 2.9 Hz, respectively [26, 28–32], which corresponds to dihedral angles of 151° and 61°. However, the structural parameters in this investigation are far below those obtained by XRD. According to crystallographic data, the dihedral angle between hydrogens in *trans*-configuration varies from 165.0° to 178.6° [20–22]. Furthermore, the interatomic distances in the molecule of *trans*-isomer, obtained by NMR spectroscopy and XRD, are not identical. This contradictory observation might be explained by the fact that crystallographic data were collected exploring the solid samples, while NMR spectroscopy analyzed solutions. Firstly, the conformation of molecules in the lattice cell is the result of complex intramolecular interactions, which may be absent in solutions. Secondly, the molecules of the solvent affect the geometry of the dissolved compound. Thirdly, the fluctuations of interatomic distances due to the atomic resonance should also be considered. Anyway, in view of liquid phase inside of living organisms, the structures of DHQ diastereomers obtained by NMR spectroscopy may be more relevant for drug design using molecular modeling [41]. Nevertheless, the limitation of these data applicability is associated with the difference in physicochemical properties between deuterated methanol and bioliquids.

Based on the interatomic distances, the conformations of DHQ diastereomers can be identified. Our findings support the idea that *trans*-DHQ is set up in a form characterized by axial position of both H2 and H3. This accords with previous crystallographic data [20–22] and explained by thermodynamic efficiency of the equatorial position for bulky substituents. Contrary to expectations, this study did not find a significant evidence for equatorial position of 3,4-dihydroxyphenyl in *cis*-DHQ. The values of correlation coefficients between NMR data and parameters of Dreiding models do not highlights this point. The absence of cross-peak between H2 and OH5 in 2D NOESY NMR spectrum of DHQs supporting the H2*e*H3*a* conformation of *cis*-isomer, as spin-spin coupling is not registered in NOESY method if interatomic distance is more than 5 Å. However, this observation can be explained by low concentration of *cis*-DHQ in analyzed sample.

In general, the complex NMR analysis we performed has several important outcomes for basic and applied research and highlights the importance of further research in this area.

CONCLUSION

This study set out to assess the opportunities of NMR spectroscopy in qualitative and quantitative analysis of DHQ diastereomers using the model of DHQs. Our experiments confirmed that this method can discriminate between *trans*- and *cis*-diastereomers based on the chemical shift values for the cross-peaks of H2 and H3 (δ 4.56/4.95 ppm and δ 4.23/5.34 ppm for *trans*- and *cis*-isomer, respectively). The second major outcome was that NMR spectroscopy can be considered as more selective quantitative analysis than HPLC with UV-detection and without reference. We found that DHQs contains 12.5 % of *cis*-isomer. One of the more significant findings for drug development to emerge from this

study is the updated information about the structural parameters of DHQ diastereomers in the liquid phase. The empirical findings in this research project provide a new understanding of *cis*-isomer-enriched DHQ sample. The present study lays the groundwork for future stereoisomer control in promising chiral APIs based on the DHQ. What is now needed is the design of a reference sample for *cis*-DHQ. This would be a fruitful area for further work.

REFERENCES

1. Liu Y., Shi X., Tian Y., Zai S., Liu Y., Xiong Z., Chu S. An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:1173855. DOI: 10.3389/fphar.2023.1173855.
2. Vladimirov Yu. A., Proskurnina E. V., Demin E. M., Matveeva N. S., Lubitskiy O. B., Novikov A. A., Izmailov D. Yu., Osipov A. N., Tikhonov V. P., Kagan V. E. Dihydroquercetin (taxifolin) and other flavonoids as inhibitors of free radical formation at key stages of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*. 2009;74(3):301–307. DOI: 10.1134/S0006297909030092.
3. Orlova S. V., Tatarinov V. V., Nikitina E. A., Sheremeta A. V., Ivlev V. A., Vasil'ev V. G., Paliy K. V., Goryainov S. V. Bioavailability and Safety of Dihydroquercetin (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;55(11):1133–1137.
4. Kalinina I., Potoroko I., Sonawane S. H. Sonochemical encapsulation of taxifolin into cyclodextrine for improving its bioavailability and bioactivity for food. In: Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System. Amsterdam: Elsevier; 2020. P. 85–102. DOI: 10.1016/B978-0-12-819363-1.00005-3.
5. Abdulrazzak S. A., Vorobyev A. N., Sinitsyna N. I., Sharutin I. V., Menshova O. V., Elizarova E. V., Ivanov Yu. V., Karamyan A. S., Abramovich R. A., Potanina O. G., Sakanyan K. M. Development of Dihydroquercetin-based Oral tablets and Evalution of the General Toxic Effect. *Drug development & registration*. 2022;11(2):126–138. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-126-138.
6. Terekhov R. P., Selivanova I. A., Tyukavkina N. A., Ilyasov I. R., Zhevlakova A. K., Dzuban A. V., Bogdanov A. G., Davidovich G. N., Shylov G. V., Utenishev A. N., Kovalev D. Yu., Fenin A. A., Kabluchko T. G. Assembling the Puzzle of Taxifolin Polymorphism. *Molecules*. 2020;25(22):5437. DOI: 10.3390/molecules25225437.
7. Stenger Moura F. C., Pinna N., Vivani R., Nunes G. E., Schoubben A., Bellé Bresolin T. M., Bechold I. H., Ricci M. Exploring Taxifolin Polymorphs: Insights on Hydrate and Anhydrous Forms. *Pharmaceutics*. 2021;13(9):1328. DOI: 10.3390/pharmaceutics13091328.
8. Taldaev A., Terekhov R. P., Selivanova I. A., Pankov D. I., Anurova M. N., Markovina I. Yu., Cong Z., Ma S., Dong Z., Yang F., Liao Y. Modification of Taxifolin Properties by Spray Drying. *Scientia Pharmaceutica*. 2022;90(4):67. DOI: 10.3390/scipharm90040067.
9. Terekhov R. P., Melnikov E. S., Nikitin I. D., Tokareva M. A., Rodina T. A., Savina A. D., Pankov D. I., Zhevlakova A. K., Beloborodov V. L., Selivanova I. A. Diastereomers of Spheroidal Form and Commercially Available Taxifolin Samples. *Scientia Pharmaceutica*. 2024;92(1):5. DOI: 10.3390/scipharm92010005.
10. Vega-Villa K. R., Remsberg C. M., Takemoto J. K., Ohgami Yu., Yáñez J. A., Andrews P. K., Davies N. M. Stereospecific pharmacokinetics of racemic homoeriodictyol, isosakuranetin, and taxifolin in rats and their disposition in fruit. *Chirality*. 2011;23(4):339–348. DOI: 10.1002/chir.20926.
11. Strugar Y., Orlova A. A., Ponkratova A. A., Whaley A. K., Povydysh M. N. Isolation of Individual Compounds from the Aerial Part of *Comarum palustre* L. and Their Structure Elucidation Using Spectroscopic Methods. *Drug development & registration*. 2022;11(4):177–184. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-177-184.
12. Achanta P. S., Jaki B. U., McAlpine J. B., Friesen J. B., Niemitz M., Chen S.-N., Pauli G. F. Quantum mechanical NMR full spin analysis in pharmaceutical identity testing and quality control. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;192:113601. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113601.
13. Achanta P. S., Niemitz M., Friesen J. B., Tadjimukhamedov F. K., Bzhelyansky A., Giancaspro G. I., Chen S.-N., Pauli G. F. Pharmaceutical analysis by NMR can accommodate strict impurity thresholds: The case of choline. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022;214:114709. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.114709.
14. Belov K. V., Batista de Carvalho L. A. E., Dyshin A. A., Efimov S. V., Khodov I. A. The Role of Hidden Conformers in Determination of Conformational Preferences of Mefenamic Acid by NOESY Spectroscopy. *Pharmaceutics*. 2022;14(11):2276. DOI: 10.3390/pharmaceutics14112276.
15. Mironov V. F., Nemtarev A. V., Tsepaeva O. V., Dimukhametov M. N., Litvinov I. A., Voloshina A. D., Pashirova T. N., Titov E. A., Lyubina A. P., Amerhanova S. K., Gubaidullin A. T., Islamov D. R. Rational Design 2-Hydroxypropylphosphonium Salts as Cancer Cell Mitochondria-Targeted Vectors: Synthesis, Structure, and Biological Properties. *Molecules*. 2021;26(21):6350. DOI: 10.3390/molecules26216350.
16. Bozin T. N., Berdyshev I. M., Chukhontseva K. N., Karaseva M. A., Konarev P. V., Varizhuk A. M., Lesovoy D. M., Arseniev A. S., Kostrov S. V., Bocharov E. V., Demidyuk I. V. NMR structure of emfourin, a novel protein metalloprotease inhibitor: Insights into the mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*. 2023;299(4):104585. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104585.
17. Urban A. S., Pavlov K. V., Kamynina A. V., Okhrimenko I. S., Arseniev A. S., Bocharov E. V. Structural Studies Providing Insights into Production and Conformational Behavior of Amyloid-β Peptide Associated with Alzheimer's Disease Development. *Molecules*. 2021;26(10):2897. DOI: 10.3390/molecules26102897.
18. Panina I. S., Balandin S. V., Tsarev A. V., Chugunov A. O., Tagaev A. A., Finkina E. I., Antoshina D. V., Sheremeteva E. V., Paramonov A. S., Rickmeyer J., Bierbaum G., Efremov R. G., Shenkarev Z. O., Ovchinnikova T. V. Specific Binding of the α-Component of the Lantibiotic Lichenicidin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Predetermines Its Antimicrobial Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(2):1332. DOI: 10.3390/ijms24021332.
19. Skinner S. P., Fogh R. H., Boucher W., Ragan T. J., Mureddu L. G., Vuister G. W. CcpNmr Analysis Assign: a flexible platform for integrated NMR analysis. *Journal of Biomolecular NMR*. 2016;66(2):111–124. DOI: 10.1007/s10858-016-0060-y.
20. Terekhov R. P., Selivanova I. A., Tyukavkina N. A., Shylov G. V., Utenishev A. N., Porozov Yu. B. Taxifolin tubes: crystal engineering and characteristics. *Acta Crystallographica Section B Structural Science, Crystal Engineering and Materials*. 2019;75(2):175–182. DOI: 10.1107/S2052520619000969.
21. Nifant'ev E. E., Koroteev M. P., Kaziev G. Z., Uminskii A. A., Grachev A. A., Men'shov V. M., Tsvetkov Yu. E., Nifant'ev N. E., Bel'skii V. K., Stash A. I. On the problem of identification of the dihydroquercetin flavonoid. *Russian Journal of General Chemistry*. 2006;76:161–163. DOI: 10.1134/S1070363206010324.
22. Selivanova I. A., Tyukavkina N. A., Kolesnik Yu. A., Nesterov V. N., Kuleshova L. N., Khutoryanskii V. A., Bazhenov B. N., Saibotalov M. Yu. Study of the crystalline structure of dihydroquercetin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1999;33:222–224. DOI: 10.1007/BF02509946.
23. Khlupova M., Vasil'eva I., Shumakovich G., Zaitseva E., Chertkov V., Shestakova A., Morozova O., Yaropolov A. Enzymatic Polymerization of Dihydroquercetin (Taxifolin) in Betaine-Based Deep Eutectic Solvent and Product Characterization. *Catalysts*. 2021;11(5):639. DOI: 10.3390/catal11050639.
24. Varlamova E. G., Uspalenko N. I., Khmil N. V., Shigaeva M. I., Stepanov M. R., Ananyan M. A., Timchenko M. A., Molchanov M. V, Mironova G. D., Turovsky E. A. A Comparative Analysis of Neuroprotective Properties of Taxifolin and Its Water-Soluble Form in Ischemia of Cerebral Cortical Cells of the Mouse. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(14):11436. DOI: 10.3390/ijms241411436.

25. Rabbi F., Zada A., Nisar A., Sohail M., Khalil S. K., Shah W. A. Bioassay-Guided Isolation, Identification of Compounds from *Sterculia diversifolia* and Investigation of Their Anti-Glycation and Antioxidant Activities. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;53:1137–1144. DOI: 10.1007/s11094-020-02137-7.
26. Lundgren L. N., Theander O. *Cis*- and *trans*-dihydroquercetin glucosides from needles of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry*. 1988;27(3):829–832. DOI: 10.1016/0031-9422(88)84101-3.
27. Kiehlmann E., Li E. P. M. Isomerization of Dihydroquercetin. *Journal of Natural Products*. 1995;58(3):450–455. DOI: 10.1021/np50117a018.
28. Ohmura W., Ohara S., Hashida K., Aoyama M., Doi S. Hydrothermolysis of Flavonoids in Relation to Steaming of Japanese Larch Wood. *Holzforschung*. 2002;56(5):493–497. DOI: 10.1515/HF.2002.076.
29. Turnbull J. J., Nakajima J.-I., Welford R. W. D., Yamazaki M., Saito K., Schofield C. J. Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(2):1206–1216. DOI: 10.1074/JBC.M309228200.
30. Yoon K. D., Lee J.-Y., Kim T. Y., Kang H., Ha K.-S., Ham T.-H., Ryu S. N., Kang M.-Y., Kim Y.-H., Kwon Y.-I. In Vitro and in Vivo Anti-Hyperglycemic Activities of Taxifolin and Its Derivatives Isolated from Pigmented Rice (*Oryzae sativa* L. cv. Superhongmi). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(3):742–750. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b04962.
31. Kuspradini H., Mitsunaga T., Ohashi H. Antimicrobial activity against *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase inhibitory activity of taxifolin and some flavanonol rhamnosides from kempas (*Koompassia malaccensis*) extracts. *Journal of Wood Science*. 2009;55:308–313. DOI: 10.1007/s10086-009-1026-4.
32. Baderschneider B., Winterhalter P. Isolation and Characterization of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(6):2788–2798. DOI: 10.1021/jf010396d.
33. Podgorskii V. V., Mikhalev A. S., Kalabin G. A. Quantitative NMR spectroscopy for quality control of drugs and pharmaceuticals. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2011;45:194–197. DOI: 10.1007/s11094-011-0591-1.
34. Kuz'mina N. E., Moiseev S. V., Khorolskiy M. D., Lutceva A. I. Development and Validation of 2-Azaspiro [4,5] Decan-3-One (Impurity A) in Gabapentin Determination Method Using qNMR Spectroscopy. *Molecules*. 2021;26(6):1656. DOI: 10.3390/molecules26061656.
35. El-Adl S. M., El-sadek M. E., Hasan M. H. Determination and Validation of Piracetam in Pharmaceuticals Using Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Analytical Chemistry Letters*. 2017;7(2):271–279. DOI: 10.1080/22297928.2017.1320227.
36. Schleiff M., Sommers C., Yang J., Shen X., Rodriguez J. D., Shu Q. Development and validation of a quantitative proton NMR method for the analysis of pregnenolone. *SSRN Electronic Journal*. 2023;222:115073. DOI: 10.2139/ssrn.4151644.
37. Sheng J., Danowski W., Crespi S., Guinart A., Chen X., Stähler C., Feringa B. L. Designing P-type bi-stable overcrowded alkene-based chiroptical photoswitches. *Chemical Science*. 2023;14(16):4328–4336. DOI: 10.1039/d2sc05903g.
38. Aiken S., De Azevedo O. D. C. C., Chauhan K., Gabbutt C. D., Heron B. M., Rice C. R., Soltowska N. Synthesis of photochromic 3-arylvinyl-3*H*-naphtho[2,1-b]pyrans: An unexpected one-step annulation to cyclopenta[b]naphtho[1,2-d]furans. *Dyes and Pigments*. 2022;207:110710. DOI: 10.1016/j.dyepig.2022.110710.
39. Danowski W., van Leeuwen T., Browne W. R., Feringa B. L. Photoresponsive porous materials. *Nanoscale Advances*. 2021;3(1):24–40. DOI: 10.1039/D0NA00647E.
40. Nesterova M., Cobra P. F., Markley J. L. Taxifolin. *Biological Magnetic Resonance Bank*. 2019. DOI: 10.13018/BMSE001302.
41. Taldaev A. Kh., Nikitin I. D., Terekhov R. P., Selivanova I. A. Molecular Docking: Methodological Approaches of Risk Assessment. *Drug development & registration*. 2023;12(2):206–210. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-206-210.

Обзорная статья / Review article

УДК 615.277.3

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1786

Check for updates

CC BY 4.0

Индукторы ферроптоза – эрастин и его аналоги (обзор)

Е. В. Санарова[1]✉, А. В. Ланцова[1], Л. Л. Николаева[1, 2], Н. А. Оборотова[1], Л. М. Борисова[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:** Санарова Екатерина Викторовна. **E-mail:** sanarova8686@mail.ru

ORCID: Е. В. Санарова – https://orcid.org/0000-0002-5592-5137; А. В. Ланцова – https://orcid.org/0000-0002-0650-2023;
Л. Л. Николаева – https://orcid.org/0000-0001-8003-8241; Н. А. Оборотова – https://orcid.org/0000-0002-6986-3942;
Л. М. Борисова – https://orcid.org/0000-0003-4613-4584.

Статья поступила: 21.03.2024 **Статья принята в печать:** 15.05.2024 **Статья опубликована:** 17.05.2024

Резюме

Введение. Повышение эффективности химиотерапии – нетривиальная задача современной онкологии. Для ее успешного решения требуются знания во многих областях, в том числе в сфере физиологии, патологии, клинической онкологии, фармакологии и др. Поиск малых молекул, избирательно убивающих опухолевые клетки, привел к случайному обнаружению эрастина.

Текст. Эрастин – это уникальная молекула, имеющая в своей структуре хиназолиновый фрагмент. Не так давно стало известно, что противоопухолевый эффект данного соединения обусловлен индукцией ферроптоза – железозависимой формы клеточной гибели, обусловленной перекисным окислением липидов. Причем эрастин способен вызывать ферроптоз через различные биохимические пути, включая блокирование цистин-глутаматного транспортного канала клеточной мембраны и потенциалзависимого анионного канала митохондрий, а также активацию белка p53. Настоящий обзор освещает современное состояние исследований в области применения эрастина и его аналогов для лечения злокачественных образований.

Заключение. Фармакологическая индукция ферроптоза эрастином и его аналогами представляет собой перспективное направление в химиотерапии рака. Кроме того, эрастин и его аналоги способны повышать чувствительность к химиотерапии и лучевой терапии, что позволяет говорить о возможности их применения в комбинированном лечении злокачественных новообразований.

Ключевые слова: эрастин, аналоги эрастина, ферроптоз, активные формы кислорода, противоопухолевый эффект

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

Вклад авторов. Е. В. Санарова – идея статьи, подбор литературных данных, написание текста статьи. А. В. Ланцова, Л. Л. Николаева – анализ литературных данных с внесением дополнений и замечаний в основной текст статьи. Н. А. Оборотова, Л. М. Борисова – редактирование текста статьи и утверждение рукописи.

Финансирование. Работа проведена в рамках государственного задания по теме «Экспериментальная разработка новых лекарственных средств для терапии злокачественных опухолей» (№ 123022100036-8).

Для цитирования: Санарова Е. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Борисова Л. М. Индукторы ферроптоза – эрастин и его аналоги. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):77–83. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1786

Ferroptosis inducers – erastin and analogues (review)

Ekaterina V. Sanarova[1]✉, Anna V. Lantsova[1], Lyudmila L. Nikolaeva[1, 2], Nataliia A. Oborotova[1], Larisa M. Borisova[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 shosse, 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:** Ekaterina V. Sanarova. **E-mail:** sanarova8686@mail.ru

ORCID: Ekaterina V. Sanarova – https://orcid.org/0000-0002-5592-5137; Anna V. Lantsova – https://orcid.org/0000-0002-0650-2023;
Lyudmila L. Nikolaeva – https://orcid.org/0000-0001-8003-8241; Nataliia A. Oborotova – https://orcid.org/0000-0002-6986-3942;
Larisa M. Borisova – https://orcid.org/0000-0003-4613-4584.

Received: 21.03.2024 **Accepted:** 15.05.2024 **Published:** 17.05.2024

Abstract

Introduction. Improving the efficacy of chemotherapy is a non-trivial task of modern oncology. Its successful solution requires knowledge in many fields, including physiology, pathology, clinical oncology, pharmacology and others. The search for small molecules that selectively kill tumor cells led to the accidental discovery of erastin.

Text. Erastin is a unique molecule that has a quinazoline fragment in its structure. Not so long ago it became known that the antitumour effect of this compound is due to the induction of ferroptosis – an iron-dependent form of cell death caused by lipid peroxidation. Erastin is able to induce ferroptosis through various biochemical pathways, including blocking of cystine-glutamate transport channel of cell membrane and potential-dependent anion channel of mitochondria, as well as activation of p53 protein.

© Санарова Е. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Борисова Л. М., 2024
© Sanarova E. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Borisova L. M., 2024

Conclusion. Pharmacological induction of ferroptosis by erastin and its analogues represents a promising direction in cancer chemotherapy. In addition, erastin and its analogues are able to increase sensitivity to chemotherapy and radiation therapy, which allows us to talk about the possibility of their use in the combined treatment of malignant neoplasms.

Keywords: erastin, erastin analogues, ferroptosis, reactive oxygen species, antitumour effect

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

Contribution of the authors. Ekaterina V. Sanarova – idea of the article, selection of literary data, writing the text of the article. Anna V. Lantsova, Lyudmila L. Nikolaeva – analysis of literary data with additions and comments in the main text of the article. Nataliia A. Oborotova, Larisa M. Borisova – editing of the text of the article and approval of the manuscript.

Funding. The work was carried out within the framework of the state assignment on the topic "Experimental development of new drugs for the therapy of malignant tumours" (No. 123022100036-8).

For citation: Sanarova E. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Borisova L. M. Ferroptosis inducers – erastin and analogues. *Drug development & registration*. 2024;13(2):77–83. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1786

ВВЕДЕНИЕ

Химиотерапия, несмотря на все успехи биотерапии, остается в настоящее время ведущим методом лечения злокачественных опухолей. Однако известно, что с переходом опухоли в фазу метастатического роста препараты, вызывающие гибель опухолевых клеток по типу апоптоза или аутофагии, практически не работают [1]. Открытие альтернативного пути гибели клеток – ферроптоза – рисует новые перспективы для развития и совершенствования современной лекарственной терапии.

Ферроптоз – железозависимая, неапоптотическая форма гибели клеток, зарегистрированная в 2003 г. и признанная научным сообществом в 2012 г. после публикации в журнале «Cell» статьи «Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death» американского ученого Скотта Диксона [2, 3]. С этого момента начинается история изучения этого уникального явления и развития направления по синтезу субстанций, являющихся индукторами ферроптоза. К настоящему времени известны следующие индукторы ферроптоза: экспериментальные соединения – эрастин, RAS related lethal 3, RAS related lethal 5, бутионинсульфоксимин – и клинические препараты – сульфасалазин, сорафениб и артесунат [4].

Наиболее широко исследованным в этом плане веществом является эрастин. Это малая молекула, которая в опытах *in vitro* показала высокий уровень ферроптотической активности, но ее исследования *in vivo* ограничены плохой растворимостью в воде и метаболической нестабильностью. В связи с этим проводятся эксперименты по синтезу аналогов эрастина с повышенной растворимостью, стабильностью при введении в организм, схожей с эрастином или более высокой активностью.

Создание в будущем лекарственного препарата на основе индуктора ферроптоза позволит раздвинуть границы эффективности как в монотерапии, так и в комбинированном лечении онкологических больных.

Свойства эрастина и механизм его ферроптотического действия

Эрастин по химической структуре представляет собой 2-[1-[4-[2-(-хлорофенокси)ацетил]-1-пиперазинил-3-(2-этоксифенил)-4(3H)-хиназолинон (рисунок 1).

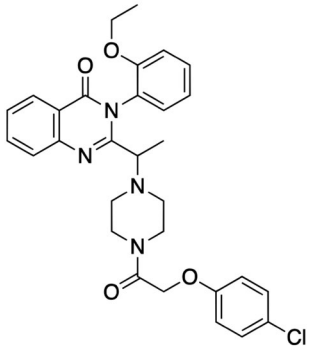


Рисунок 1. Химическая структура эрастина

Figure 1. The chemical structure of erastin

Известно, что данная субстанция плохо растворяется в воде, причем растворимость его меняется при изменении кислотности среды: так, при pH = 7 растворимость эрастина составляет 0,09 мМ, а при

pH = 3 растворимость повышается до значения 0,15 мМ [5]. Плохая растворимость, снижающая фармакологический эффект, – одна из главных преград для углубленного изучения этого уникального по своим фармакологическим свойствам вещества.

Широко известно, что железо играет важную роль во многих метаболических процессах в человеческом организме. В физиологических условиях уровень железа должен быть правильно сбалансирован в клетке и в основном регулируется трансферрином и ферритином. Избыток ионного железа приводит к «обогащению железом» и является триггером ферроптоза [6]. Это железозависимая форма клеточной смерти, характеризующаяся накоплением внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) [7]. АФК – собирательное название для большого класса молекул. Все они содержат атомы кислорода и являются сильными окислителями, а соответственно, могут вступать в реакцию с полиненасыщенными жирными кислотами липидной мембраны и вызывать перекисное окисление липидов [8]. Железо может вносить свой вклад в пул АФК в клетках через реакцию Фентона, в которой железо катализирует разложение липидных АФК [9].

Ферроптоз был выделен отдельно, так как он значительно отличается от других известных форм клеточной гибели, таких как апоптоз, некроз и аутофагия, и в то же время может быть подавлен антиоксидантами (альфа-токоферол, бутилированный гидрокситолуол и бета-каротин и др.) и хелаторами железа [10–12]. С точки зрения морфологии ферроптотические клетки демонстрируют специфические изменения в митохондриях: уменьшение размеров митохондрий и увеличение плотности митохондриальной мембраны, в то время как другие типичные признаки клеточной смерти отсутствуют [13].

Этот процесс происходит без конденсации хроматина и редукции ядер, наблюдаемых при апоптозе, клеточном и органеллярном набухании при некрозе, а также без общих черт аутофагии [14].

Эрастин – золотой стандарт в области индукторов ферроптоза, отличающийся от других индукторов ферроптоза, которые обычно запускают один путь индукции, тем, что может запускать несколько путей, а именно (рисунок 2):

1. Блокирование внутриклеточного биосинтеза глутатиона путем ингибирования системы цистин/глутаматного антипортера, что вызывает уменьшение уровня глутатиона внутри клетки и приводит к дефициту глутатионпероксидазы-4 (ГП-4), создавая тем самым дефект в антиоксидантной защите клетки, и к ее железозависимой окислительной гибели [15–18].
2. Изменение проницаемости внешней мембраны митохондрий за счет ингибирования VDAC (the voltage dependent anion channel) – пориновых белков внешней митохондриальной мембраны, что, в свою очередь, ведет к усилению митохондриального метаболизма, снижению гликолиза и увеличению производства АФК [19].
3. Активация клеточного белка p53, который является классическим опухолевым супрессором [20–23].

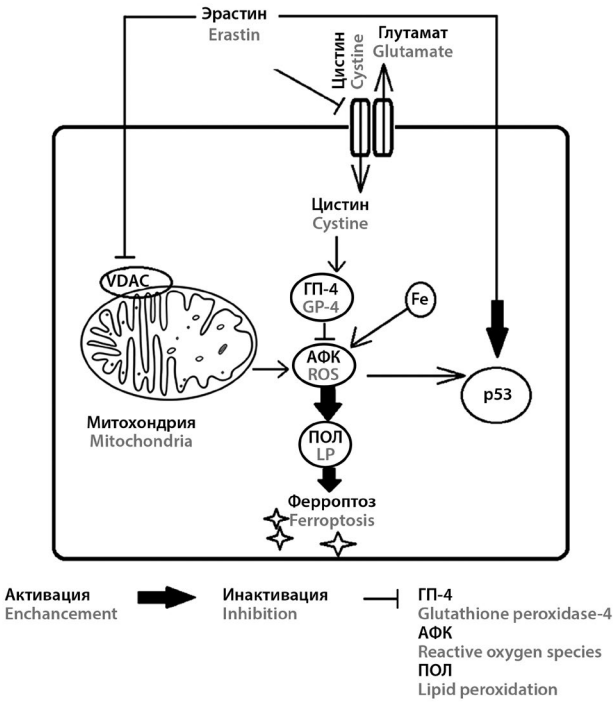


Рисунок 2. Пути индукции ферроптоза в клетке под действием эрастина [5]

Figure 2. The relevant pathways of ferroptosis induced by erastin [5]

Опыт применения эрастина и его аналогов в онкологической научной практике

Явление ферроптоза связано со многими патологическими процессами, происходящими в организме (ферроптотическую гибель клеток наблюдают при заболеваниях дыхательных путей и сердечно сосудистой системы, бактериальной инфекции), но особый интерес ферроптоз представляет для регуляции опухолевого процесса [24, 25]. Впервые ферроптоз был обнаружен в клеточной линии мелкоклеточного рака легкого HT-1080 [2], а к настоящему времени проведены исследования ферроптоза при многих формах рака (рак легкого, глиобластома, рак яичников, рак молочной железы, меланома и др.) с применением эрастина и его аналогов [26].

Известно, что в тканях рака поджелудочной железы существуют зоны гипоксии из-за плохого кровотока. Снижение фармакологической эффективности существующих противоопухолевых препаратов в этих зонах с гипоксическим состоянием обусловливает необходимость поиска новых противоопухолевых соединений. Японские ученые стремились

определить, проявляет ли эрастин противоопухолевое действие в условиях гипоксии. Линии клеток рака поджелудочной железы подвергали воздействию хлорида кобальта, агента, имитирующего гипоксию. Для изучения эффективности эрастина в условиях гипоксии были проведены анализ жизнеспособности клеток, измерение АФК и вестерн-блоттинг-анализ. Эрастин проявлял значительную цитотоксичность в условиях гипоксии. Кроме того, эрастин запускал внутриклеточное накопление АФК в условиях гипоксии. Последующее лечение антиоксидантом N-ацетилцистеином – ингибитором ферроптоза – заметно снижало цитотоксичность [27].

Недавние исследования выявили критическую роль ферроптоза в различных физиологических и патологических процессах, однако его влияние на прогрессирование стволовых клеток (СК) колоректального рака все еще не до конца ясно. В ходе экспериментальных работ обнаружено, что в колоректальных СК демонстрируется значительно более низкий уровень АФК, более высокий уровень цистеина и активность глутамат-цистинового антипортера (SLC7A11) по сравнению с клетками колоректального рака. Ингибирование работы SLC7A11 повышало уровень АФК и снижало уровень цистеина, впоследствии снижая жизнеспособность колоректальных СК. Помимо этого, было выяснено, что эрастин – ингибитор SLC7A11 – оказывает значительно более сильное цитотоксическое действие на колоректальные СК в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и ослабляет химиорезистентность этих клеток [4, 28].

Способность аналогов эрастина – производных хиназолина, индукторов ферроптоза, вызывать гибель резистентных клеток открывает новые возможности для повышения эффективности противоопухолевой терапии меланомы. Так, в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, проведенных с участием производного хиназолина OVN-002 и эрастина, было показано, что цитотоксическая активность OVN-002 была сравнима с активностью эрастина на клетках метастатической меланомы Mel Z. В экспериментах *in vivo* на меланоме B16 в дозе 50 мг/кг OVN002 оказывал противоопухолевый эффект с ТРО 81–57 % ($p < 0,05$) до 7-го дня наблюдения, тогда как для эрастина отмечали только непосредственный эффект (ТРО 65 %, $p < 0,05$). Полученные данные позволяют предположить, что соединение OVN-002 может стать потенциальным кандидатом для лечения меланомы [29, 30].

Группой российских ученых синтезирован ряд аналогов эрастина с модифицированной структурой – с заменой заместителей во 2-м и 3-м положениях хиназолинового цикла. Была выдвинута гипотеза, что такая замена приведет к усилению активности данных соединений по сравнению с эрастином и улучшит их растворимость. Исследование *in vitro* способности этих соединений, производных 3-гидроксихиназолина, индуцировать ферроптоз в клетках MCF-7 показало, что активность соединения 3 (содержащего в хиназолиновом кольце в качестве одного из радикалов Br) была сравнима с эффектом эрастина. Эти результаты подтверждены на экспериментальной модели карциномы молочной железы Ca-755 мышей. Соединение 3 показало высокий продолжительный противоопухолевый эффект в дозах 30 и 50 мг/кг при внутрибрюшинном ежедневном введении в течение 5 дней. При использовании этого соединения в дозе 50 мг/кг продолжительность жизни животных увеличилась на 36 % по сравнению с применением эрастина (УПЖ – 11 %; $p < 0,05$). Полученные данные об индукции гибели клеток рака молочной железы и первичная оценка противоопухолевой активности аналога эрастина служат веским основанием для продолжения поиска индукторов ферроптоза в этом классе соединений [31].

Существует другой аналог эрастина – имидазолкетонэрастин (ИКЭ), также созданный с целью повысить метаболическую стабильность и увеличить растворимость [5]. Эта малая молекула включает карбонил, который потенциально может образовывать обратимое ковалентное взаимодействие с белками, что должно привести к улучшению эффективности по сравнению с эрастином [32].

Эрастин и его аналоги (производные 3-гидроксихиназолина) плохо растворимы в воде, что ограничивает их исследование на этапе испытаний на животных. К таковым относится и OVF-009 – оригинальная отечественная субстанция. Высокая липофильность данного соединения требует разработки технологии с применением солюбилизаторов [33]. Для этой субстанции на этапе перехода от клеточных экспериментов к экспериментам на животных предложен эффективный солюбилизатор – высокоочищенное модифицированное касторовое масло Kolliphor® ELP, разрешенное для парентерального применения [34, 35]. Выбранный модельный состав для солюбилизации субстанции OVF-009 на основе Kolliphor® ELP позволил обеспечить концентрацию действующего вещества в растворе, пригодную для проведения в дальнейшем биологических экспериментов на животных [36].

Химиотерапия является одним из трех основных методов лечения злокачественных опухолей. Однако из-за постоянного и широкого применения химиотерапевтических препаратов опухоли проявляют различную степень лекарственной устойчивости (ЛУ), которая является основным фактором, приводящим к неэффективности химиотерапии и плохому прогнозу. Химиотерапевтические препараты уничтожают раковые клетки главным образом путем индукции апоптоза. Подавленный апоптоз или сниженная восприимчивость к апоптозу является важным механизмом приобретенной ЛУ. Существует гипотеза о том, что можно обратить вспять ЛУ с помощью

других методов, не связанных с апоптозной гибелью клеток, например с использованием субстанций, обладающих ферроптотической активностью, в частности эрастина и его аналогов.

Изучено и доказано, что эрастин может устранять резистентность многих типов клеток, устойчивых к химиотерапии. Например, было обнаружено, что он преодолевает резистентность раковых клеток головы и шеи и клеток рака яичников к цисплатину и резистентность клеток острого миелоидного лейкоза к цитарабину и доксорубицина гидрохлориду.

Как описано выше, эрастин может индуцировать гибель раковых клеток посредством неапоптотической и железозависимой формы гибели клеток. Помимо прямого индуцирования гибели раковых клеток как таковой, эрастин также можно комбинировать с химиотерапевтическими препаратами, повышая чувствительность к ним раковых клеток.

Так, было показано, что эрастин повышает чувствительность клеток рака легких к цисплатину, клеток рабдомиосаркомы к доксорубицину и актиномицину D, клеток глиобластомы к темозоломиду, СК и клеток рака молочной железы к доксорубицину [15, 37]. Также есть сообщения о повышении эрастином эффективности радиотерапии [38].

В последнее время показано, что имеет место обратный факт: некоторые соединения, например аскорбиновая кислота и ингибиторы гистондиацетилазы, способны снижать токсичность эрастина для здоровых клеток и усиливать его действие на опухолевые клетки [39, 40]. Например, природный ингибитор гистондиацетилазы – бутират натрия – подавляет пролиферацию опухолевых клеток и индуцирует апоптоз. J. Nie с сотрудниками сначала подтвердили, что бутират натрия усиливает цитотоксический эффект эрастина на клетки остеосаркомы *in vitro* и *in vivo*. А затем они обнаружили, что опосредованная бутиратом натрия активация АТФ и последующее ингибирование транскрипции SLC7A11 могут влиять на сенсибилизацию к ферроптозу [41]. Данные другого исследования показали, что витамин С может интенсивно повышать чувствительность к эрастининдуцированному ферроптозу в клетках предстательной железы и значительно снижать его цитотоксичность в нормальных клетках. В частности, комбинированное лечение эрастином и витамином С синергически индуцировало ферроптоз, включающий истощение глутатиона и накопление двухвалентного железа.

Имеются данные о комбинировании эрастина в составе наноразмерных конструкций с рапамицином в частицах на основе ферритина [42], с доксорубицином в составе частиц на основе комплекса «гидроксиэтилкрахмал – поликапролактон» [15]. Обе конструкции показали в опытах на клеточных линиях синергетический эффект классического препарата и эрастина. А в исследовании частиц с доксорубицином и эрастином они действовали, помимо опухолевых клеток, еще и на стволовые клетки опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ферроптоз, как все новое в науке, пока еще не раскрыл все свои возможности. Но расширение круга веществ, индуцирующих ферроптоз и проявляющих противоопухолевую активность, позволяет надеяться на создание в будущем эффективного лекарственного препарата с нестандартным механизмом действия. Перспективными в этом отношении являются эрастин и его аналоги, обладающие большим потенциалом в качестве нового класса противоопухолевых препаратов, применяемых как в качестве монотерапии, так и в комбинации для повышения чувствительности раковых клеток к химиотерапевтическим препаратам и к радиации. Однако, учитывая, что история эрастина и его аналогов только началась, необходимо провести дополнительные углубленные исследования, включая изучение полного спектра противоопухолевой активности, выбор оптимального пути введения и адекватной лекарственной формы и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова Л. М., Голубева И. С., Киселева М. П. Молекулярные характеристики ферроптоза. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2019;3:11–16. DOI: 10.34673/ismu.2020.49.16.002.
2. Dixon S. J., Lemberg K. M., Lamprecht M. R., Skouta R., Zaitsev E. M., Gleason C. E., Patel D. N., Bauer A. J., Cantley A. M., Yang W. S., Morrison B., Stockwell B. R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060–1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
3. Dolma S., Lessnick S. L., Hahn W. C., Stockwell B. R. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*. 2003;3(3):285–296. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00050-3.
4. Xu X., Zhang X., Wei C., Zheng D., Lu X., Yang Y., Luo A., Zhang K., Duan X., Wang Y. Targeting SLC7A11 specifically suppresses the progression of colorectal cancer stem cells via inducing ferroptosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;152:105450. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105450.
5. Zhang Y., Tan H., Daniels J. D., Zandkarimi F., Liu H., Brown L. M., Uchida K., O'Connor O. A., Stockwell B. R. Imidazole ketone erastin induces ferroptosis and slows tumor growth in a mouse lymphoma model. *Cell Chemical Biology*. 2019;26(5):623–633. DOI: 10.1016/j.chembiol.2019.01.008.
6. Чубенко В. А. Метаболизм железа и ферроптоз как терапевтическая мишень. *Практическая онкология*. 2022;23(3):127–132. DOI: 10.31917/2303127.
7. Chen Y., Fan Z., Hu S., Lu C., Xiang Y., Liao S. Ferroptosis: A New Strategy for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:830561. DOI: 10.3389/fonc.2022.830561.
8. Bayır H., Anthonymuthu T. S., Tyurina Y. Y., Patel S. J., Amoscato A. A., Lamade A. M., Yang Q., Vladimirov G. K., Philpott C. C., Kagan V. E. Achieving Life through Death: Redox Biology of Lipid Peroxidation in Ferroptosis. *Cell Chemical Biology*. 2020;27(4):387–408. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.03.014.
9. Conrad M., Pratt D. A. The chemical basis of ferroptosis. *Nature Chemical Biology*. 2019;15(12):1137–1147. DOI: 10.1038/s41589-019-0408-1.
10. Вартанян А. А. Метаболизм железа, ферроптоз, рак. *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;16(3):14–20. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20.
11. Zhou J., Tan Y., Wang R., Li X. Role of Ferroptosis in Fibrotic Diseases. *Journal of Inflammation Research*. 2022;15:3689–3708. DOI: 10.2147/JIR.S358470.
12. Friedmann Angeli J. P. Shah R., Pratt D. A., Conrad M. Ferroptosis inhibition: mechanisms and opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2017;38(5):489–498. DOI: 10.1016/j.tips.2017.02.005.

13. Mou Y., Wang J., Wu J., He D., Zhang C., Duan C., Li B. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *Journal of Hematology & Oncology.* 2019;12(1):34. DOI: 10.1186/s13045-019-0720-y.
14. Николаев А. А., Белопасов В. В. Ферроптоз в патогенезе опухолей головного мозга. *Клиническая практика*. 2022;13(4):68–73. DOI: 10.17816/clinpract114787.
15. Xu C., Li S., Chen J., Wang H., Li Z., Deng Q., Li J., Wang X., Xiong Y., Zhang Z., Yang X., Li Z. Doxorubicin and erastin co-loaded hydroxyethyl starch-polycaprolactone nanoparticles for synergistic cancer therapy. *Journal of Controlled Release.* 2023;356:256–271. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.03.001.
16. Николаев А. А., Ушакова М. В. Характеристика индукторов ферроптоза (обзор). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2023;(6):31–37. DOI: 10.29296/25877313-2023-06-05.
17. Seibt T. M., Proneth B., Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radical Biology and Medicine.* 2019;133:144–152. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.014.
18. Doll S., Freitas F. P., Shah R., Aldrovandi M., da Silva M. C., Ingold I., Goya Grocin A., Xavier da Silva T. N., Panzilius E., Scheel C. H., Mourão A., Buday K., Sato M., Wanninger J., Vignane T., Mohana V., Rehberg M., Flatley A., Schepers A., Kurz A., White D., Sauer M., Sattler M., Tate E. W., Schmitz W., Schulze A., O'Donnell V., Proneth B., Popowicz G. M., Pratt D. A., Friedmann Angeli J. P., Conrad M. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature.* 2019;575:693–698. DOI: 10.1038/s41586-019-1707-0.
19. Щеглов А. С., Царькова А. С. Перспективы использования биолюминесцентной системы *Chaetopterus variopedatus* для мониторинга ферроптоза в живых организмах. *Вестник РГМУ.* 2021;3:79–81. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.024.
20. Чумаков П. М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. *Успехи биологической химии.* 2007;47:3–52.
21. Pitolli C., Wang Y., Candi E., Shi Y., Melino G., Amelio I. p53-mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms. *Cancers.* 2019;11(12):1983. DOI: 10.3390/cancers11121983.
22. Anbarasan T., Bourdon J.-C. The emerging landscape of p53 isoforms in physiology, cancer and degenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(24):6257. DOI: 10.3390/ijms20246257.
23. Kang R., Kroemer G., Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network. *Free Radical Biology and Medicine.* 2019;133:162–168. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.074.
24. Hu Z., Zhang H., Yang S.-K., Wu X, He D., Cao K., Zhang W. Emerging role of ferroptosis in acute kidney injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019;2019:8010614. DOI: 10.1155/2019/8010614.
25. Подзолков В. И., Тарзиманова А. И., Пономарева Л. А., Попова Е. Н., Пономарев А. Б. Ферроптоз-ассоциированное повреждение как потенциальная мишень в терапии сердечно-сосудистых заболеваний. *Терапевтический архив.* 2022;94(12):1421–1425. DOI: 10.26442/00403660.2022.12.201996.
26. Liang C., Zhang X., Yang M., Dong X. Recent progress in ferroptosis inducers for cancer therapy. *Advanced Materials.* 2019;31(51):1904197. DOI: 10.1002/adma.201904197.
27. Owada S., Endo H., Shida Y., Kinoue T., Furuya H., Tatemichi M. Evaluation of Erastin as a Therapeutic Agent Under Hypoxic Conditions in Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Research.* 2021;41(12):6051–6059. DOI: 10.21873/anticanres.15424.
28. Zhao Y., Li Y., Zhang R., Wang F., Wang T., Jiao Y. The Role of Erastin in Ferroptosis and Its Prospects in Cancer Therapy. *Onco Targets and Therapy.* 2020;13:5429–5441. DOI: 10.2147/OTT.S254995.
29. Борисова Л. М., Осипов В. Н., Гусев Д. В., Голубева И. С., Киселева М. П., Вартанян А. А. Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланом. *Российский биотерапевтический журнал.* 2021;20(1):67–73. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73.
30. Вартанян А. А., Осипов В. Н., Хоченков Д. А., Гусев Д. В., Борисова Л. М. Производные хиназолина, индуцирующие ферроптоз в метастатических клетках меланомы и рака толстой кишки. Патент РФ на изобретение RU 2722308 C1. 28.05.2020. Бюл. № 16.
31. Борисова Л. М., Осипов В. Н., Голубева И. С. Киселева М. П., Хоченков Д. А., Вартанян А. А. Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии.* 2022;9(1):48–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56.
32. Larraufie M.-H., Yang W. S., Jiang E., Thomas A. G., Slusher B. S., Stockwell B. R. Incorporation of metabolically stable ketones into a small molecule probe to increase potency and water solubility. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2015;25(21):4787–4792. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.07.018.
33. Ампилогова И. Н., Карлина М. В., Макаров В. Г., Макарова М. Н. Взаимосвязь фармацевтической разработки и доклинических исследований. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):155–163. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163.
34. Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Дмитриева М. В., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Лаврухин Н. И., Бунятян Н. Д. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(2):52–59.
35. Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Санарова Е. В., Ланцова А. В., Оборотова Н. А. Особенности создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для парентерального применения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;2(11):96–112.
36. Санарова Е. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л. Осипов В. Н., Гусев Д. В., Борисова Л. М. Солюбилизация производного 3-гидроксихиназолина, обладающего противоопухолевой активностью. *Российский биотерапевтический журнал*. 2023;22(4):60–67. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-4-60-67.
37. Sato M., Kusumi R., Hamashima S., Kobayashi S., Sasaki S., Komiyama Y., Izumikawa T., Conrad M., Bannai S., Sato H. The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system x_c^- and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells. *Scientific Reports.* 2018;8(1):968. DOI: 10.1038/s41598-018-19213-4.
38. Shibata Y., Yasui H., Higashikawa K., Miyamoto N., Kuge Y. Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation in vitro and in vivo. *PLoS ONE.* 2019;14(12):e0225931. DOI: 10.1371/journal.pone.0225931.
39. Zille M., Kumar A., Kundu N., Bourassa M. W., Wong V. S. C., Willis D., Karuppagounder S. S., Ratan R. R. Ferroptosis in Neurons and Cancer Cells Is Similar But Differentially Regulated by Histone Deacetylase Inhibitors. *eNeuro.* 2019;6(1):ENEURO.0263–18.2019. DOI: 10.1523/ENEURO.0263-18.2019.
40. Liu Y., Huang P., Li Z., Xu C., Wang H., Jia B., Gong A., Xu M. Vitamin C Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Erastin-Induced Ferroptosis by Activating the AMPK/Nrf2/HMOX1 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2022;2022:5361241. DOI: 10.1155/2022/5361241.
41. Nie J., Ling Y., Jin M., Chen Z., Liu W., Shen W., Fang T., Li J., He Y. Butyrate enhances erastin-induced ferroptosis of osteosarcoma cells via regulating ATF3/SLC7A11 pathway. *European Journal of Pharmacology.* 2023;957:176009. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.176009.
42. Li Y., Wang X., Yan J., Liu Y., Yang R., Pan D., Wang L., Xu Y., Li X., Yang M. Nanoparticle ferritin-bound erastin and rapamycin: a nanodrug combining autophagy and ferroptosis for anticancer therapy. *Biomaterials Science.* 2019;7:3779–3787. DOI: 10.1039/c9bm00653b.

REFERENCES

1. Borisova L. M., Golubeva I. S., Kiseleva M. P. Molecular determinants of ferroptosis. *Siberian Medical Journal (Irkutsk).* 2019;3:11–16. (In Russ.) DOI:10.34673/ismu.2020.49.16.002.
2. Dixon S. J., Lemberg K. M., Lamprecht M. R., Skouta R., Zaitsev E. M., Gleason C. E., Patel D. N., Bauer A. J., Cantley A. M., Yang W. S., Morrison B., Stockwell B. R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012;149(5):1060–1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
3. Dolma S., Lessnick S. L., Hahn W. C., Stockwell B. R. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell.* 2003;3(3):285–296. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00050-3.
4. Xu X., Zhang X., Wei C., Zheng D., Lu X., Yang Y., Luo A., Zhang K., Duan X., Wang Y. Targeting SLC7A11 specifically suppresses the progression of colorectal cancer stem cells via inducing ferroptosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020;152:105450. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105450.

5. Zhang Y., Tan H., Daniels J. D., Zandkarimi F., Liu H., Brown L. M., Uchida K., O'Connor O. A., Stockwell B. R. Imidazole ketone erastin induces ferroptosis and slows tumor growth in a mouse lymphoma model. *Cell Chemical Biology*. 2019;26(5):623–633. DOI: 10.1016/j.chembiol.2019.01.008.
6. Chubenko V. A. Iron metabolism and ferroptosis as a therapeutic target. *Practical oncology*. 2022;23(3):127–132. (In Russ.) DOI: 10.31917/2303127.
7. Chen Y., Fan Z., Hu S., Lu C., Xiang Y., Liao S. Ferroptosis: A New Strategy for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:830561. DOI: 10.3389/fonc.2022.830561.
8. Bayır H., Anthonymuthu T. S., Tyurina Y. Y., Patel S. J., Amoscato A. A., Lamade A. M., Yang Q., Vladimirov G. K., Philpott C. C., Kagan V. E. Achieving Life through Death: Redox Biology of Lipid Peroxidation in Ferroptosis. *Cell Chemical Biology*. 2020;27(4):387–408. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.03.014.
9. Conrad M., Pratt D. A. The chemical basis of ferroptosis. *Nature Chemical Biology*. 2019;15(12):1137–1147. DOI: 10.1038/s41589-019-0408-1.
10. Vartanian A. A. Iron metabolism, ferroptosis and cancer. *Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(3):14–20. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20.
11. Zhou J., Tan Y., Wang R., Li X. Role of Ferroptosis in Fibrotic Diseases. *Journal of Inflammation Research*. 2022;15:3689–3708. DOI: 10.2147/JIR.S358470.
12. Friedmann Angeli J. P. Shah R., Pratt D. A., Conrad M. Ferroptosis inhibition: mechanisms and opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2017;38(5):489–498. DOI: 10.1016/j.tips.2017.02.005.
13. Mou Y., Wang J., Wu J., He D., Zhang C., Duan C., Li B. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12(1):34. DOI: 10.1186/s13045-019-0720-y.
14. Nikolaev A. A., Belopasov V. V. Ferroptosis in the Pathogenesis of Brain Tumors. *Journal of Clinical Practice*. 2022;13(4):68–73. (In Russ.) DOI: 10.17816/clinpract114787.
15. Xu C., Li S., Chen J., Wang H., Li Z., Deng Q., Li J., Wang X., Xiong Y., Zhang Z., Yang X., Li Z. Doxorubicin and erastin co-loaded hydroxyethyl starch-polycaprolactone nanoparticles for synergistic cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2023;356:256–271. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.03.001.
16. Nikolaev A. A., Ushakova M. V. Characteristics of ferroptose inductors (review). *Problems of Biological Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2023;(6):31–37. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2023-06-05.
17. Seibt T. M., Proneth B., Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;133:144–152. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.014.
18. Doll S., Freitas F. P., Shah R., Aldrovandi M., da Silva M. C., Ingold I., Goya Grocin A., Xavier da Silva T. N., Panzilius E., Scheel C. H., Mourão A., Buday K., Sato M., Wanninger J., Vignane T., Mohana V., Rehberg M., Flatley A., Schepers A., Kurz A., White D., Sauer M., Sattler M., Tate E. W., Schmitz W., Schulze A., O'Donnell V., Proneth B., Popowicz G. M., Pratt D. A., Friedmann Angeli J. P., Conrad M. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*. 2019;575:693–698. DOI: 10.1038/s41586-019-1707-0.
19. Scheglov A. S., Tsarkova A. S. The prospects of using the bioluminescent system of *Chaetopterus variopedatus* to study ferroptosis in living organisms. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2021;3:79–81. (In Russ.) DOI: 10.24075/vrgmu.2021.024.
20. Chumakov P. M. Protein p53 and its universal functions in multicellular organism. *Uspekhi biologicheskaya khimiya*. 2007;47:3–52. (In Russ.)
21. Pitolli C., Wang Y., Candi E., Shi Y., Melino G., Amelio I. p53-mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms. *Cancers*. 2019;11(12):1983. DOI: 10.3390/cancers11121983.
22. Anbarasan T., Bourdon J.-C. The emerging landscape of p53 isoforms in physiology, cancer and degenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(24):6257. DOI: 10.3390/ijms20246257.
23. Kang R., Kroemer G., Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;133:162–168. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.074.
24. Hu Z., Zhang H., Yang S.-K., Wu X, He D., Cao K., Zhang W. Emerging role of ferroptosis in acute kidney injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:8010614. DOI: 10.1155/2019/8010614.
25. Podzolkov V. I., Tarzimanova A. I., Ponomareva L. A., Popova E. N., Ponomarev A. B. Ferroptosis-associated lesion as a potential target for cardiovascular disease. *Therapeutic archive*. 2022;94(12):1421–1425. (In Russ.) DOI: 10.26442/00403660.2022.12.201996.
26. Liang C., Zhang X., Yang M., Dong X. Recent progress in ferroptosis inducers for cancer therapy. *Advanced Materials*. 2019;31(51):1904197. DOI: 10.1002/adma.201904197.
27. Owada S., Endo H., Shida Y., Kinoue T., Furuya H., Tatemichi M. Evaluation of Erastin as a Therapeutic Agent Under Hypoxic Conditions in Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Research*. 2021;41(12):6051–6059. DOI: 10.21873/anticanres.15424.
28. Zhao Y., Li Y., Zhang R., Wang F., Wang T., Jiao Y. The Role of Erastin in Ferroptosis and Its Prospects in Cancer Therapy. *Onco Targets and Therapy*. 2020;13:5429–5441. DOI: 10.2147/OTT.S254995.
29. Borisova L. M., Osipov V. N., Gusev D. V., Golubeva I. S., Kiseleva M. P., Vartanian A. A. 3-Hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in metastatic melanoma cells. *Russian Journal of Biotherapy*. 2021;20(1):67–73. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73.
30. Vartanyan A. A., Osipov V. N., Khochenkov D. A., Gusev D. V., Borisova L. M. Quinazoline derivatives inducing ferroptosis in metastatic cells of melanoma and colon cancer. Patent RUS RU 2722308 C1. 28.05.2020. Bul. No. 16. (In Russ.)
31. Borisova L. M., Osipov V. N., Golubeva I. S., Kiseleva M. P., Hochenkov D. A., Vartanyan A. A. 3-Hydroxyquinazoline derivatives, analogues of erastin, induced ferroptosis in breast cancer cells. *Advances in Molecular Oncology*. 2022;9(1):48–56. (In Russ.) DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56.
32. Larraufie M.-H., Yang W. S., Jiang E., Thomas A. G., Slusher B. S., Stockwell B. R. Incorporation of metabolically stable ketones into a small molecule probe to increase potency and water solubility. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015;25(21):4787–4792. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.07.018.
33. Ampilogova I. N., Karlina M. V., Makarov V. G., Makarova M. N. The Interconnection Between Pharmaceutical Development and Preclinical Research. *Drug development & registration*. 2023;12(2):155–163. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-155-163.
34. Gulyakin I. D., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Dmitrieva M. V., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Orlova O. L., Polozkova A. P., Lavrukhin H. I., Bunyatyan N. D. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. *Drug development & registration*. 2016;(2):52–59. (In Russ.)
35. Gulyakin I. D., Nikolaeva L. L., Sanarova E. V., Lantsova A. V., Oborotova N. A. Features of creating dosage forms of antitumour drugs for parenteral use. *Drug development & registration*. 2015;2(11):96–112. (In Russ.)
36. Sanarova E. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Osipov V. N., Gusev D. V., Borisova L. M. Solubilization of 3-hydroxyquinazoline derivative with antitumor activity. *Russian Journal of Biotherapy*. 2023;22(4):60–67. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-4-60-67.
37. Sato M., Kusumi R., Hamashima S., Kobayashi S., Sasaki S., Komiyama Y., Izumikawa T., Conrad M., Bannai S., Sato H. The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system x_c^- and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells. *Scientific Reports*. 2018;8(1):968. DOI: 10.1038/s41598-018-19213-4.
38. Shibata Y., Yasui H., Higashikawa K., Miyamoto N., Kuge Y. Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation in vitro and in vivo. *PLoS ONE*. 2019;14(12):e0225931. DOI: 10.1371/journal.pone.0225931.
39. Zille M., Kumar A., Kundu N., Bourassa M. W., Wong V. S. C., Willis D., Karuppagounder S. S., Ratan R. R. Ferroptosis in Neurons and Cancer Cells Is Similar But Differentially Regulated by Histone Deacetylase Inhibitors. *eNeuro*. 2019;6(1):ENEURO.0263–18.2019. DOI: 10.1523/ENEURO.0263-18.2019.
40. Liu Y., Huang P., Li Z., Xu C., Wang H., Jia B., Gong A., Xu M. Vitamin C Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Erastin-Induced Ferroptosis by Activating the AMPK/Nrf2/HMOX1 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022:5361241. DOI: 10.1155/2022/5361241.
41. Nie J., Ling Y., Jin M., Chen Z., Liu W., Shen W., Fang T., Li J., He Y. Butyrate enhances erastin-induced ferroptosis of osteosarcoma cells via regulating ATF3/SLC7A11 pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2023;957:176009. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.176009.
42. Li Y., Wang X., Yan J., Liu Y., Yang R., Pan D., Wang L., Xu Y., Li X., Yang M. Nanoparticle ferritin-bound erastin and rapamycin: a nanodrug combining autophagy and ferroptosis for anticancer therapy. *Biomaterials Science*. 2019;7:3779–3787. DOI: 10.1039/c9bm00653b.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.322; 615.451.16

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1682

Check for updates

CC BY 4.0

Технология сухого экстракта лабазника вязолистного и первичная оценка профиля его безопасности

Е. Ю. Авдеева✉, М. Г. Скороходова, В. В. Шейкин, Т. В. Кадырова, М. В. Белоусов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ **Контактное лицо:** Авдеева Елена Юрьевна. **E-mail:** elenaavdeev@yandex.ru

ORCID: Е. Ю. Авдеева – https://orcid.org/0000-0001-7061-9843; М. Г. Скороходова – https://orcid.org/0000-0002-4362-4206; В. В. Шейкин – https://orcid.org/0000-0002-0600-5764; Т. В. Кадырова – https://orcid.org/0000-0002-2119-0259; М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Статья поступила: 20.12.2023 **Статья принята в печать:** 02.05.2024 **Статья опубликована:** 03.05.2024

Резюме

Введение. Лекарственные средства природного происхождения отличаются рядом преимуществ по сравнению с синтетическими препаратами и занимают существенную долю в ассортименте аптек. Потенциал с точки зрения разработки новых фитопрепаратов имеет лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., сем. *Rosaceae*), отличающийся богатым составом фенольных соединений и разнообразными видами биологической активности. В эксперименте *in vivo* экстракт *F. ulmaria* проявил иммуномодулирующую, противовоспалительную, остеогенную активность и эффективно стимулировал миелопоэз в условиях микробного поражения костной ткани.

Цель. Отработка оптимальной технологии получения сухого экстракта *F. ulmaria методом ремацерации* и исследование его острой токсичности.

Материалы и методы. Технологию получения экстракта отрабатывали в лабораторном реакторе, снабженном обогревающейся водяной рубашкой и мешалкой. Содержание флавоноидов определяли методом дифференциальной спектрометрии. Сыпучесть определяли на тестере для определения сыпучести порошков и гранул, насыпную плотность – на тестере насыпной плотности порошков и гранулятов, влажность – на анализаторе влажности. Определение острой токсичности проводили на белых крысах линии Вистар обоего пола.

Результаты и обсуждение. Сухой экстракт *F. ulmaria*, полученный методом ремацерации 70%-м этанолом, эффективен в условиях микробного поражения костной ткани и костного мозга, что определило выбор экстрагента и вид экстракта. Определены оптимальные параметры получения экстракта (трехкратная ремацерация при температуре водяной рубашки 80 °С, соотношение сырья и экстрагента 1 : 14, время 30 мин), его основные технологические характеристики и предложен способ их улучшения путем влажного гранулирования. При исследовании острой токсичности экстракта, согласно результатам токсикометрии на протяжении 14 дней после введения и данным некропсии, исследуемый экстракт отнесен к малотоксичным и малоопасным веществам.

Заключение. Сухой экстракт *F. ulmaria*, полученный методом ремацерации с помощью 70%-го этанола, обладает специфической активностью в условиях микробного поражения костной ткани. Оптимальные параметры экстракции позволяют повысить выход целевых компонентов, технологические параметры экстракта целесообразно улучшить методом влажного гранулирования. Оценка острой токсичности сухого экстракта *F. ulmaria* наряду с высокой биологической активностью дает перспективу для его дальнейшего изучения и внедрения в медицинскую практику.

Ключевые слова: *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., сухой экстракт, технология, ремацерация, флавоноиды, острая токсичность

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

Вклад авторов. Е. Ю. Авдеева, М. В. Белоусов планировали и разрабатывали эксперименты. Е. Ю. Авдеева, М. Г. Скороходова, В. В. Шейкин, Т. В. Кадырова осуществляли эксперименты. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Соответствие принципам этики. При проведении экспериментов руководствовались принципами, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинской декларации. Одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ (заключение № 5539 от 02.10.2017).

Для цитирования: Авдеева Е. Ю., Скороходова М. Г., Шейкин В. В., Кадырова Т. В., Белоусов М. В. Технология сухого экстракта лабазника вязолистного и первичная оценка профиля его безопасности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):84–92. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1682

Technology of dry extract from the *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and preliminary assessment of its safety profile

Elena Yu. Avdeeva✉, Marina G. Skorokhodova, Vladimir V. Sheikin, Tatyana V. Kadyrova, Mikhail V. Belousov

Siberian State Medical University, SSMU. 2, Moskovskij trakt, Tomsk, 634050, Russia

✉ **Corresponding author:** Elena Yu. Avdeeva. **E-mail:** elenaavdeev@yandex.ru

© Авдеева Е. Ю., Скороходова М. Г., Шейкин В. В., Кадырова Т. В., Белоусов М. В., 2024
© Avdeeva E. Yu., Skorokhodova M. G., Sheikin V. V., Kadyrova T. V., Belousov M. V., 2024

ORCID: Elena Yu. Avdeeva – https://orcid.org/0000-0001-7061-9843; Marina G. Skorokhodova – https://orcid.org/0000-0002-4362-4206; Vladimir V. Sheikin – https://orcid.org/0000-0002-0600-5764; Tatyana V. Kadyrova – https://orcid.org/0000-0002-2119-0259; Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Received: 20.12.2023 **Accepted:** 02.05.2024 **Published:** 03.05.2024

Abstract

Introduction. Medicines of natural origin have advantages over synthetic drugs and occupy a significant share in the assortment of pharmacies. *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., characterized by a chemical composition rich in phenolic compounds and various types of biological activity has the potential in terms of the development of new herbal medicines. In an in vivo experiment, *F. ulmaria* extract showed immunomodulatory, anti-inflammatory, osteogenic activity and effectively stimulated myelopoiesis in conditions of microbial damage of bone tissue.

Aim. Development of an optimal technology for obtaining dry extract of *F. ulmaria* by remaceration and investigation of its acute toxicity.

Materials and methods. The technology of extract was developed in a laboratory reactor equipped with a water heater jacket and a stirrer. The content of flavonoids was determined by differential spectrometry. Flowability was determined on a flowability tester for powders and granules, bulk density was determined on a bulk density tester for powders and granules, moisture content was developed on a moisture content analyzer. Acute toxicity was determined on Wistar rats.

Results and discussion. The dry extract of *F. ulmaria*, obtained using 70 % ethanol by remaceration, is effective in conditions of microbial damage of bone tissue and bone marrow, which determined the choice of extragent and the type of extract. The optimal parameters for obtaining the extract were determined (three-fold maceration at a water jacket temperature of 80 °C, the ratio of raw materials to extragent 1 : 14, time 30 min), its main technological characteristics were determined and a wet granulation method for improving them was proposed. In the study of acute toxicity of the extract, according to the results of toxicometry for 14 days after administration and necropsy data, the studied extract was classified as low-toxic substance.

Conclusion. The dry extract of *F. ulmaria*, obtained by remaceration using 70 % ethanol, has specific activity in conditions of microbial damage to bone tissue. Optimal extraction parameters allow to increase the yield of target components, it is advisable to improve the technological parameters of the extract by wet granulation. The assessment of the safety profile of the dry extract from *F. ulmaria*, along with its high biological activity, provides a perspective for its further study and implementation into medical practice.

Keywords: *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., dry extract, technology, remaceration, flavonoids, acute toxicity

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 Yu. Avdeeva, Mikhail V. Belousov planned and developed experiments. Elena Yu. Avdeeva, Marina G. Skorokhodova, Vladimir V. Sheikin, Tatyana V. Kadyrova carried out experiments. All authors participated in the discussion of the results.

Compliance with the principles of ethics. The experimental studies were governed the principles set out in the European Community directives (86/609/EEC) and the Helsinki Declaration and were approved by the local ethical Committee of the Siberian State Medical University (conclusion No. 5539 dated 02.10.2017).

For citation: Avdeeva E. Yu., Skorokhodova M. G., Sheikin V. V., Kadyrova T. V., Belousov M. V. Technology of dry extract from the *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and preliminary assessment of its safety profile. *Drug development & registration*. 2024;13(2):84–92. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1682

ВВЕДЕНИЕ

В номенклатуре лекарственных средств, применяемых в медицинской практике, определенную долю занимают фитопрепараты. Будучи сложными по составу, фитопрепараты оказывают многостороннее системное действие на организм, как правило, малотоксичны, редко оказывают побочное действие и дают возможность длительного приема, что особенно ценно при терапии хронических патологий, профилактике и реабилитации.

Значительный потенциал с точки зрения разработки новых фитопрепаратов и биологически активных добавок имеет лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., сем. *Rosaceae*), химический состав и биологическая активность которого довольно хорошо изучены. Растение содержит комплекс биологически активных веществ, представленный преимущественно фенольными соединениями [1–2]. В надземной части *F. ulmaria* обнаружен широкий набор фенолокислот (салициловая, галловая, *n*-кумаровая, хлорогеновая, кофейная, анисовая и др.), флавоноидов (кемпферол, кверцетин, лютеолин, спиреозид, гиперозид, рутин, авикулярин, кемпферол-4′-глюкозид, изокверцитрин, филимарин) и эллаготанинов (эллаговая кислота, телимаграндин II, ругозин D) [3–6]. Причем содержание фенолокислот в надземной части *F. ulmaria* в пересчете на кофейную кислоту составляет 1,9–2,3 % [5], флавоноидов – 4,0–9,8 %, дубильных веществ – порядка 7,3–11,9 % [3].

Лабазник вязолистный обладает широким спектром биологической активности. Экспериментально выявлена противовоспалительная [7–9], антиоксидантная [2, 9–10], диуретическая [11], антидепрессантная [12], гастропротекторная [10], гепатопротекторная [13], ноотропная [14], противоопухолевая [15], противоподагрическая [16] активность *F. ulmaria*.

В результате экспериментов, проводимых в условиях хронического модельного остеомиелита, и терапии с применением сухого экстракта *F. ulmaria*, полученного с помощью 70%-го этанола методом ремацерации, наблюдается уменьшение воспалительного процесса в зоне поражения, нормализация показателей иммунологической реактивности, выраженная активация регенераторных процессов в костной ткани. В костном мозге выявлена стимуляция гранулопоэза с достоверным увеличением количества миелобластов и зрелых форм гранулоцитов по сравнению с контролем (животные с модельным остеомиелитом, не получавшие лечения) [17–18]. Таким образом, экстракт *F. ulmaria* является перспективным кандидатом для расширения арсенала средств с иммуномодулирующей, противовоспалительной, остеогенной активностью, стимулирующих миелопоэз в условиях микробного поражения костной ткани.

Отработка оптимальной технологии, оценка эффективности и безопасности прототипа нового лекарственно средства является необходимым и важным этапом на пути его разработки [19]. Поэтому **целью настоящей работы** явился выбор оптимальных параметров извлечения целевых компонентов экстракта лабазника вязолистного, эффективного в условиях микробного поражения костной ткани, отработка технологии получения сухого экстракта и исследование его острой токсичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали надземную часть лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.), собранную в фазу цветения в июле 2017 г. в Томской области в окрестностях п. Межениновка. Воздушно-сухой растительный материал с влажностью 6,5 ± 0,5 % измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм. Технологический процесс моделировали в лабораторном реакторе (Radley's, Великобритания), снабженном обогревающейся водяной рубашкой и мешалкой RZR 2020 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия) при скорости 300 об/мин. Экстракцию сырья осуществляли методом ремацерации при температуре водяной рубашки 80 °С, используя 70%-й водный этанол в качестве экстрагента. Экстракты, полученные после каждого приема экстракции, объединяли, экстрагент удаляли под вакуумом при температуре не выше 50 °С. Сконцентрированный густой экстракт высушивали методом конвективной сушки до содержания влаги не более 5 %.

Для определения содержания флавоноидов 0,1 г (точная навеска) сухого экстракта растворяли в 70%-м этаноле в мерной колбе вместимостью 50 мл и доводили тем же этанолом до метки (раствор А). 20 мл раствора А помещали в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляли 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 2 ч. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 3 мл 5%-го этанольного раствора алюминия хлорида и доводили 95%-м этанолом до метки. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при 425 нм через 45 мин. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца кверцетина. Для этого 1 мл 0,02%-го стандартного раствора кверцетина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 3 мл 5%-го раствора алюминия хлорида и доводили 95%-м этанолом до метки.

Приготовление раствора стандартного образца кверцетина: 0,0100 г (точная навеска) ГСО кверцетина, высушенного до постоянной массы при температуре 100–105 °С, растворяли в мерной колбе вместимостью 50 мл в 20 мл 95%-го этанола, прибавляли 1 каплю концентрированной хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора тем же этанолом до метки.

Расчет содержания суммы флавоноидов (%) осуществляли по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot M_o \cdot 50 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_o \cdot M \cdot 1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - W)} = \frac{A \cdot M_o \cdot 10\,000}{A_o \cdot M \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_o – оптическая плотность ГСО кверцетина; M_o – масса ГСО кверцетина, г; M – масса навески экстракта, г; W – содержание влаги в экстракте, %.

Сыпучесть сухого экстракта определяли на тестере для определения сыпучести порошков и гранул GTL (ERWEKA GmbH, Германия). Сыпучесть выражали через объем порошка, прошедшего через отверстие воронки за единицу времени, и расчитывали по формуле:

$$C = \frac{m}{F \cdot t},$$

где C – сыпучесть, г/(см^2 · с); m – масса порошка, взятого для испытания, г; F – площадь сечения нижней части воронки; t – время высыпания порошка, с.

Насыпную плотность определяли на тестере насыпной плотности порошков и гранулятов SVM 101 (ERWEKA GmbH, Германия) и вычисляли по формуле:

$$НП = \frac{m}{V},$$

где НП – насыпная плотность порошка, г/см^3; V – объем порошка после уплотнения, см^3; m – масса порошка, взятого для анализа, г.

Влажность экстракта и гранул определяли на анализаторе влажности AND MS-70 (Япония).

Определение острой токсичности [20] проводили на белых крысах линии Вистар обоего пола массой 280–300 г (лаборатория биологических моделей ФГБОУ ВО СибГМУ, г. Томск). Животных содержали в

стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище.

Животных распределяли на три группы: интактные (группа 1) и получавшие дозы соответственно 5000 мг/кг (группа 2) и 10 000 мг/кг (группа 3). Экстракт вводили через зонд в желудок в виде водной суспензии. Для достижения больших доз экстракт вводили повторно с интервалом в 20–30 минут. Острую токсичность оценивали по нервно-соматическим показателям, данным анализов крови, весовым коэффициентам и макроскопическому исследованию внутренних органов. Период наблюдения составил 14 суток. Анализ крови осуществляли на автоматическом гематологическом анализаторе для ветеринарии PCE 90 Vet (High Technology, Inc., США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 17.0, вычисляли среднее арифметическое значение *M* и его стандартную ошибку *m*. Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследованиях, проведенных ранее, было выявлено, что сухой экстракт *F. ulmaria*, полученный с помощью 70%-го этанола методом ремацерации при температуре водяной рубашки 80 °С, эффективен в условиях микробного поражения костной ткани и костного мозга [17–18]. Этот факт определил выбор экстрагента – 70%-го водного этанола, способ экстракции (ремацерация) и вид экстракта (сухой). Кроме того, в экспериментах, проведенных в лабораторных условиях, было обнаружено, что максимальный выход флавоноидов из травы *F. ulmaria* происходит при экстракции сырья, измельченного до 1–2 мм 70%-м водным этанолом при температуре водяной рубашки 80 °С (таблица 1).

Для выбора оптимальных параметров извлечения целевых веществ в условиях моделирования процесса экстракции в лабораторном реакторе варьировали соотношение сырья и экстрагента, время и кратность экстракции (таблица 2). Принимая во внимание содержание суммы флавоноидов в экстракте, оптимальное соотношение сырья и экстрагента составило 1 : 14. Увеличение времени экстракции при принятом соотношении сырья и экстрагента способствовало выходу экстрактивных веществ, но содержание суммы флавоноидов при этом снижалось. Таким образом, оптимальное время для извлечения целевых веществ составило 30 мин. Также целесообразно увеличение кратности экстракции до трехкратной при принятых соотношении сырья и экстрагента и времени экстракции.

Таблица 1. Влияние концентрации этанола, температуры и измельченности сырья на выход флавоноидов из надземной части *F. ulmaria*

Table 1. Effect of ethanol concentration, temperature and grinding of raw materials on the yield of flavonoids from the aboveground part of *F. ulmaria*

Условия экстракции Extraction conditions		Сумма флавоноидов, % The amount of flavonoids, %
Концентрация этанола, % Ethanol concentration, %	20	2,5 ± 0,1
	40	3,5 ± 0,5
	70	3,9 ± 0,3
	95	2,3 ± 0,1
Температура экстракции, °С Extraction temperature, °С	60	3,0 ± 0,1
	70	3,2 ± 0,1
	80	3,7 ± 0,1
	90	3,4 ± 0,1
Размер частиц, мм Particle size, mm	5	2,5 ± 0,1
	3	3,4 ± 0,1
	2	4,1 ± 0,1
	1	5,1 ± 0,1
	0,5–0,25	2,0 ± 0,1

Таблица 2. Содержание флавоноидов в сухом экстракте *F. ulmaria* в зависимости от изменения параметров экстракции

Table 2. The content of flavonoids in the dry extract of *F. ulmaria* depending on the change in extraction parameters

№	Соотношение фаз Phase ratio	Время, ч Time, h	Кратность экстракции Number of extractions	Сумма экстрактивных веществ, г The amount of extractive substances, g	Сумма флавоноидов, % The amount of flavonoids, %
1	1 : 7	1,0	2	46,50 ± 1,39	4,09 ± 0,12
2	1 : 10	1,0	2	48,88 ± 1,50	4,06 ± 0,10
3	1 : 14	1,0	2	47,72 ± 1,43	4,81 ± 0,14
4	1 : 14	0,5	2	44,14 ± 1,32	6,41 ± 0,19
5	1 : 14	2,0	2	48,20 ± 1,45	3,88 ± 0,12
6	1 : 14	0,5	3	45,76 ± 1,40	6,53 ± 0,20

С использованием оптимальных параметров (трехкратная экстракция, соотношение сырья и экстрагента 1 : 14, время 30 мин) в лабораторном экстракторе, снабженном обогревающейся водяной рубашкой и мешалкой, были получены 5 серий сухого экстракта *F. ulmaria* с целью исследования технологических параметров. Во всех сериях сухой экстракт представлял собой темно-зеленый порошок с приятным запахом. Влажность сухого экстракта составила 4,25 ± 0,55 %, сумма флавоноидов в пересчете на кверцетин – 6,50 ± 0,20 %.

С целью дальнейшей разработки предполагаемой лекарственной формы определяли основные технологические параметры сухого экстракта – сыпучесть и насыпную плотность. Проведенные исследования показали, что сухой экстракт лабазника представляет собой несыпучий (0 г/с) порошок с высокой насыпной плотностью (0,94 ± 0,05 г/см^3).

Для улучшения технологических параметров экстракт смешивали непосредственно со вспомогательными веществами: наполнителями (лактоза, глюкоза, микрокристаллическая целлюлоза), скользящими (стеарат кальция) – и определяли сыпучесть полученной смеси. Полученные данные позволили сделать заключение, что добавление вспомогательных веществ не улучшает параметр сыпучести до требуемых показателей (таблица 3).

Таблица 3. Сыпучесть смесей сухого экстракта *F. ulmaria* и вспомогательных веществ

Table 3. Flowability of mixtures of dry extract of *F. ulmaria* and excipients

Наполнители Fillers	**Сыпучесть, г/см² · с** Flowability, g/cm² · sec	**Сыпучесть, после добавления 1 % стеарата кальция** Flowability, after addition of 1 % calcium stearate
Лактоза Lactose	2,275 ± 0,21	2,811 ± 0,25
МКЦ Microcrystalline cellulose	1,744 ± 0,16	1,810 ± 0,17
Глюкоза Glucose	5,233 ± 0,40	3,9 ± 0,29

Так как улучшить технологические параметры экстракта путем перемешивания со вспомогательными веществами не представляется возможным, целесообразно использовать прием гранулирования. Для получения гранулята использовали метод влажного гранулирования. Сухой экстракт смешивали с необходимым количеством наполнителя, к полученной массе добавляли раствор связывающего вещества (70%-й этанол) и перемешивали до образования однородной, влажной, пластичной массы. Полученную массу протирали через лабораторное сито с диаметром отверстия 1 мм. Гранулы сушили конвективным способом при 60 °С (влажность гранул не более 1,5 %) и проводили регрануляцию. Критериями оценки являлись внешний вид (равномерное окрашивание, отсутствие посторонних включений), фракционный состав (основная фракция с размером частиц от 0,5 до 1 мм составила 90 %), сыпучесть, насыпная плотность.

Использование в качестве наполнителя лактозы позволило получить требуемые технологические характеристики (таблица 4): сыпучесть составила в среднем 12,32 ± 1,19 г/см^2 · с, насыпная плотность – 0,69 ± 0,03 г/см^3. Полученный таким образом гранулят можно использовать в дальнейшем для разработки капсулированной лекарственной формы.

Таблица 4. Изменение сыпучести в зависимости от процентного содержания экстракта *F. ulmaria* в грануляте на основе лактозы и глюкозы

Table 4. Change in flowability depending on the percentage of *F. ulmaria* extract in the granulate based on lactose and glucose

Содержание экстракта, % Extract content, %	**Сыпучесть, г/см² · с** Flowability, g/cm² · sec	
	Лактоза Lactose	**Глюкоза** Glucose
90	11,30 ± 1,12	8,18 ± 0,79
70	13,35 ± 1,25	7,27 ± 0,68
60	11,26 ± 1,00	9,43 ± 0,92
50	11,31 ± 0,99	7,42 ± 0,69
30	14,40 ± 1,12	7,64 ± 0,70
Среднее значение The average value	12,32 ± 1,19	7,99 ± 0,72

Для первичной оценки безопасности сухого экстракта *F. ulmaria* исследовали его острую токсичность. В течение первых суток после введения экстракта наблюдали клиническую картину интоксикации (таблица 5). У животных групп 2 и 3 отмечались заторможенность, вялость, птоз, брадипное. Эти симптомы проходили в группе 2 через 3 часа, в группе 3 они были более выражены и сохранялись до 7 часов, частота дыхания в обеих группах нормализовалась только через трое суток. В группах, получавших экстракт, отмечался повышенный диурез в течение трех суток, цвет мочи был ярко-желтым. Достоверных различий в динамике массы тела в группах интактных животных и получавших экстракт не выявили.

На 5-е сутки у животных был осуществлен забор крови. Как видно из таблицы 6, значительных различий в гемограмме интактных и опытных животных не наблюдалось, за исключением того, что в группах 2 и 3 наблюдалась тенденция к уменьшению количества моноцитов и тромбоцитов, а также к увеличению средней концентрации гемоглобина в эритроцитах. На 14-е сутки опыта осуществляли патолого-анатомическое вскрытие. Весовые коэффициенты органов опытных животных (см. таблицу 5), а также их макроскопическая картина не отличались от интактных. Осложнений, гибели животных не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование лабазника вязолистного в официальной медицине имеет реальные перспективы. Разработка и внедрение фитопрепаратов на его основе довольно актуальны, так как доклинические испытания показывают эффективность этого вида, обусловленную богатым составом фенольных компонентов, на различных экспериментальных моделях *in vivo*.

Таблица 5. Нервно-соматические показатели и весовые коэффициенты (ВК) органов крыс после введения сухого экстракта *F. ulmaria* (*M* ± *m*, *n* = 10)

Table 5. Neuromuscular parameters and weight coefficients (WC) of rat organs after administration of dry extract of *F. ulmaria* (*M* ± *m*, *n* = 10)

Определяемые параметры Defined parameters	**Группа 1** Group 1	**Группа 2** Group 2	**Группа 3** Group 3
Масса тела, г (до введения / через 2 недели) Body weight, g (before administration / after 2 weeks)	336 ± 32 / 346 ± 34	358 ± 17 / 374 ± 19	359 ± 13 / 371 ± 19
Частота дыхания / мин (до введения / через 3 ч / через 24 ч / через 3 суток) Respiratory rate / min (before administration / after 3 hours / after 24 hours / after 3 days)	112 ± 8 / 82 ± 12 / 116 ± 10 / 115±10	111 ± 3 / 65 ± 5 / 69 ± 9 / 108 ± 4	114 ± 2 / 76 ± 3 / 62 ± 4 / 109 ± 2
Частота сердечных сокращений / мин (до введения / через 3 ч / через 24 ч) Heart rate / min (before administration / after 3 hours / after 24 hours)	310 ± 10 / 320 ± 10 / 310 ± 10	310 ± 10 / 332 ± 20 / 310 ± 10	310 ± 10 / 333 ± 30 / 310 ± 10
Количество перемещений в открытом поле / мин (через 1 ч / 24 ч) Number of movements in the open field / min (after 1 hour / 24 hours)	11 ± 3 / 9 ± 4	4 ± 2 / 11 ± 2	5 ± 3 / 12 ± 5
Реакция на раздражители (в течение 3 ч) Reaction to stimulation (within 3 hours)	+	+++	+++
Птоз (в течение 3 ч) Ptosis (within 3 hours)	–	+	+++
ВК сердца WC of the heart	0,0031 ± 0,0004	0,0035 ± 0,0002	0,0035 ± 0,0002
ВК печени WC of the liver	0,0454 ± 0,0030	0,0438 ± 0,0018	0,0422 ± 0,0020
ВК селезенки WC of the spleen	0,0041 ± 0,0011	0,0043 ± 0,0003	0,0037 ± 0,0010
ВК почек WC of the kidneys	0,0097 ± 0,0008	0,0093 ± 0,0004	0,0088 ± 0,0007

Примечание. «–» – Явления не наблюдали. «+» – Явления слабо выражены. «+++» – Явления сильно выражены.

Note. "–" – No phenomena were observed. "+" – The phenomena are weakly expressed. "+++" – The phenomena are strongly expressed.

Таблица 6. Данные анализов крови крыс после введения сухого экстракта *F. ulmaria* (*M* ± *m*, *n* = 10)

Table 6. Blood test data from rats after administration of dry extract of *F. ulmaria* (*M* ± *m*, *n* = 10)

Определяемые параметры Defined parameters	**Группа 1** Group 1	**Группа 2** Group 2	**Группа 3** Group 3
Эритроциты Erythrocytes	9,2 ± 0,4	9,1 ± 0,3	8,7 ± 0,4
Средний объем эритроцита Average erythrocytes volume	59,1 ± 1,5	60,6 ±1,2	59,5 ± 3,2
Распределение эритроцитов Distribution of erythrocytes	11,9 ± 0,9	11,0 ± 0,3	11,3 ± 0,7
Лейкоциты Leucocytes	22,9 ± 2,3	21,0 ± 4,8	21,2 ± 3,2
Лимфоциты Lymphocytes	15,3 ± 2,8	15,0±3,4	14,6 ± 2,5
Гранулоциты Granulocytes	6,5 ± 0,7	5,4 ± 1,4	5,6±1,8
Моноциты Monocytes	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,2*
Гемоглобин Hemoglobin	135 ± 11	144 ± 7	136 ± 9
Среднее содержание гемоглобина в эритроците The average hemoglobin content in the erythrocyte	14,5 ± 0,5	15,8 ± 0,4	15,7 ± 0,6

Окончание таблицы 6

Определяемые параметры Defined parameters	**Группа 1** Group 1	**Группа 2** Group 2	**Группа 3** Group 3
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах The average concentration of hemoglobin in erythrocytes	249 ± 5	262 ± 3	263 ± 6
Гематокрит Hematocrit	54,4±2,8	55,2 ± 2,2	51,5±2,5
Тромбоциты Thrombocytes	654 ± 35	572 ± 73	604 ± 87
Тромбокрит Thrombocrit	0,492 ± 0,080	0,389 ± 0,078	0,393 ± 0,094
Средний объем тромбоцита Average thrombocyte volume	7,4 ± 0,2	7,0 ± 0,9	6,6 ± 0,2*
Распределение тромбоцитов Thrombocytes distribution	15,8 ± 0,1	15,4 ± 0,3	15,3 ± 0,2

Примечание. * Различия достоверны в сравнении с группой 1.

Note. *Differences are significant in comparison with group 1.

Научный интерес к разработке препаратов на основе извлечений из цветков и травы лабазника вязолистного подтверждается рядом публикаций. Описаны эксперименты по разработке геля-дерматопротектора с экстрактом из цветков растения [21]. Предложена технология получения сухого экстракта лабазника вязолистного, обладающего ноотропной активностью, методом реперколяции для получения таблеток на его основе [22–24].

В настоящей работе предложен способ получения сухого экстракта *F. ulmaria* методом ремацерации, технологические параметры отработаны в лабораторном реакторе, снабженном обогревающейся водяной рубашкой и мешалкой. Определены некоторые технологические параметры, которые оказались неудовлетворительными. Ввиду того, что улучшить технологические параметры экстракта путем перемешивания со вспомогательными веществами не представляется возможным, предложен оптимальный способ получения гранул, удовлетворяющих технологическим требованиям.

В доклинических испытаниях доказана эффективность полученного сухого экстракта в условиях микробного поражения костной ткани. На этапе разработки нового лекарственного средства, кроме доказательства эффективности, необходима и оценка его безопасности [19]. Результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 дней после острого введения, а также данные некропсии позволили отнести полученный сухой экстракт *F. ulmaria* к практически нетоксичным веществам по классификации Ходжа и Стернера или к веществам малоопасным (IV класс опасности, ГОСТ 12.1.007-76).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сухой экстракт *F. ulmaria*, полученный методом ремацерации с помощью 70%-го водного этанола, обладает иммуномодулирующей, противовоспалительной, остеогенной активностью и стимулирует миелопоэз в условиях экспериментального микробного поражения костной ткани.

В результате моделирования способа получения экстракта *F. ulmaria* методом ремацерации 70%-м этанолом при температуре водяной рубашки 80 °С в лабораторном реакторе выявили, что максимальный выход целевых компонентов из надземной части происходит при трехкратной экстракции, соотношении сырья и экстрагента 1:14 и времени экстракции 30 мин. Для улучшения технологических параметров экстракта целесообразен метод влажного гранулирования с использованием в качестве наполнителя лактозы, что позволяет получить гранулы с сыпучестью 12,32 ± 1,19 г/см^2 · с и насыпной плотностью порядка 0,69 ± 0,03 г/см^3.

Оценка острой токсичности полученного сухого экстракта *F. ulmaria* показала, что экстракт относится к малоопасным и малотоксичным веществам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bijttebier S., Van der Auwera A., Voorspoels S., Noten B., Hermans N., Pieters L., Apers S. A first step in the quest for the active constituents in *Filipendula ulmaria* (Meadowsweet): Comprehensive phytochemical identification by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *Planta Medica.* 2016;82:559–572. DOI: 10.1055/s-0042-101943.
2. Savina T., Lisun V., Feduraev P., Skrypnik L. Variation in Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Different Plant Organs of Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.). *Molecules*. 2023;28(8):3512. DOI: 10.3390/molecules28083512.

3. Буданцев А. Л., ред. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euforbiaceae – Haloragaceae. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК; 2009. 513 с.
4. Olennikov D. N., Kashchenko N. I., Chirikova N. K. Meadowsweet Teas as New Functional Beverages: Comparative Analysis of Nutrients, Phytochemicals and Biological Effects of Four *Filipendula* Species. *Molecules*. 2017;22(1):16. DOI: 10.3390/molecules22010016.
5. Smolarz H. D., Sokolowska-Wosniak A. Chromatografic analysis of phenolic acids in *F. ulmaria* (L.) Maxim. and *F. hexapetala* Gilib. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2003;12(1):77–82.
6. Fecka I. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from Meadowsweet and Dog Rose. *Phytochemical Analysis*. 2009;20(3):177–190. DOI: 10.1002/pca.1113.
7. Van der Auwera A., Peeters L., Foubert K., Piazza S., Vanden Berghe W., Hermans N., Pieters L. In Vitro Biotransformation and Anti-Inflammatory Activity of Constituents and Metabolites of *Filipendula ulmaria*. *Pharmaceutics*. 2023;15(4):1291. DOI: 10.3390/pharmaceutics15041291.
8. Горбачева А. В., Аксиненко С. Г., Пашинский В. Г. Лабазник вязолистный в фитотерапии воспалительных процессов. Томск: Издательство Томского государственного педагогического университета; 2005. 305 с.
9. Samardžić S., Arsenijević J., Božić D., Milenković M., Tešević V., Maksimović Z. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018;213:132–137. DOI: 10.1016/j.jep.2017.11.013.
10. Sukhikh S., Ivanova S., Skrypnik L., Bakhtiyarova A., Larina V., Krol O., Prosekov A., Frolov A., Povydysh M., Babich O. Study of the Antioxidant Properties of *Filipendula ulmaria* and *Alnus glutinosa*. *Plants*. 2022;11(18):2415. DOI: 10.3390/plants11182415.
11. Куркин В. А., Сазанова К. Н., Шарипова С. Х., Зайцева Е. Н., Дубищев А. В., Гладунова Е. П. Диуретическая активность густого экстракта и флавоноидов плодов лабазника вязолистного *Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim. *Наука и инновации в медицине*. 2021;6(4):68–72. DOI: 10.35693/2500-1388-2021-6-4-68-72.
12. Куркин В. А., Сазанова К. Н., Зайцева Е. Н., Шарипова С. Х., Правдивцева О. Е., Авдеева Е. В., Гладунова Е. П., Варина Н. Р. Антидепрессантная активность флавоноидов и густого экстракта плодов лабазника вязолистного. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(8):10–12. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-8-10-12.
13. Шилова И. В., Геренг Е. А., Жаворонок Т. В., Суслов Н. И., Новожеева Т. П. Гепатопротекторные свойства экстракта лабазника вязолистного. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2010;2:28–32.
14. Шилова И. В., Самылина И. А., Суслов Н. И. Разработка ноотропных средств на основе растений Сибири. Томск: Печатная мануфактура; 2013. 268 с.
15. Amosova E. N., Shilova I. V., Zueva E. P., Rybalkina O. Yu. Influence of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. Extract on Lewis Lung Carcinoma Development and Cytostatic Therapy Effectiveness in Mice. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53:458–461. DOI: 10.1007/s11094-019-02019-7.
16. Gainche M., Ogeron C., Ripoche I., Senejoux F., Cholet J., Decombat C., Delort L., Berthon J.-Y., Saunier E., Caldefie Chezet F. Chalard P. Xanthine Oxidase Inhibitors from *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and Their Efficient Detections by HPTLC and HPLC Analyses. *Molecules*. 2021;26(7):1939. DOI: 10.3390/molecules26071939.
17. Авдеева Е. Ю., Скороходова М. Г., Суходоло И. В., Порохова Е. Д., Слизовский Г. В., Муштоватова Л. С., Решетов Я. Е., Иванов С. Д., Белоусов М. В. Эффективность экстрактов *Saussurea controversa* и *Fillipendula ulmaria* на фоне антибиотикотерапии остеомиелита в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2019;82(12):41–46. DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-12-41-46.
18. Перевозчикова Т. В., Авдеева Е. Ю., Файт Е. А., Скороходова М. Г., Краснов Е. А. Влияние экстрактов *Saussurea controversa* и *Fillipendula ulmaria* на иммунологическую реактивность крыс с экспериментальным остеомиелитом. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016;79(7):16–20. DOI: 10.30906/0869-2092-2016-79-7-16-20.
19. Подпружников Ю. В., Немченко А. С., Андрюкова Л. Н., Емшанова С. В., Козельская Т. П., Чистяков В. В. Хрестоматия фармацевтического качества. М.: ООО «Группа Ремедиум»; 2015. 432 с.
20. Миронова А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
21. Жилина И. В., Степанова Э. Ф., Голова Г. А. Разработка состава и технология геля с экстрактом из цветков лабазника вязолистного для использования в качестве дерматопротектора. *Фундаментальные исследования*. 2011;9(2):349–351.
22. Крылов Н. Н., Шевченко А. М. Разработка технологии получения сухого экстракта травы лабазника вязолистного. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2016;33(5):141–144.
23. Шилова И. В., Хоружая Т. Г., Самылина И. А. Технология и стандартизация экстрактов лабазника вязолистного. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(5):42–46. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-5-42-46.
24. Шилова И. В., Хоружая Т. Г., Самылина И. А. Разработка состава, технологии и стандартизация таблеток с экстрактом лабазника вязолистного сухим. *Химико-фармацевтический журнал*. 2013;47(10):41–44.

REFERENCES

1. Bijttebier S., Van der Auwera A., Voorspoels S., Noten B., Hermans N., Pieters L., Apers S. A first step in the quest for the active constituents in *Filipendula ulmaria* (Meadowsweet): Comprehensive phytochemical identification by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *Planta Medica*. 2016;82:559–572. DOI: 10.1055/s-0042-101943.
2. Savina T., Lisun V., Feduraev P., Skrypnik L. Variation in Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Different Plant Organs of Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.). *Molecules*. 2023;28(8):3512. DOI: 10.3390/molecules28083512.
3. Budantsev A. L., editor. Plant resources of Russia. Wild flowering plants, their component composition and biological activity. Volume 2. Families Actinidiaceae – Malvaceae, Euforbiaceae – Haloragaceae. St. Petersburg.; Moscow: Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK; 2009. 513 p. (In Russ.)
4. Olennikov D. N., Kashchenko N. I., Chirikova N. K. Meadowsweet Teas as New Functional Beverages: Comparative Analysis of Nutrients, Phytochemicals and Biological Effects of Four *Filipendula* Species. *Molecules*. 2017;22(1):16. DOI: 10.3390/molecules22010016.
5. Smolarz H. D., Sokolowska-Wosniak A. Chromatografic analysis of phenolic acids in *F. ulmaria* (L.) Maxim. and *F. hexapetala* Gilib. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2003;12(1):77–82.
6. Fecka I. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from Meadowsweet and Dog Rose. *Phytochemical Analysis*. 2009;20(3):177–190. DOI: 10.1002/pca.1113.
7. Van der Auwera A., Peeters L., Foubert K., Piazza S., Vanden Berghe W., Hermans N., Pieters L. In Vitro Biotransformation and Anti-Inflammatory Activity of Constituents and Metabolites of *Filipendula ulmaria*. *Pharmaceutics*. 2023;15(4):1291. DOI: 10.3390/pharmaceutics15041291.
8. Gorbacheva A. V., Aksinenko S. G., Pashinsky V. G. Meadowsweet in phytotherapy of inflammatory processes. Tomsk: Izdatel'stvo Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta; 2005. 305 p. (In Russ.)
9. Samardžić S., Arsenijević J., Božić D., Milenković M., Tešević V., Maksimović Z. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018;213:132–137. DOI: 10.1016/j.jep.2017.11.013.

10. Sukhikh S., Ivanova S., Skrypnik L., Bakhtiyarova A., Larina V., Krol O., Prosekov A., Frolov A., Povydysh M., Babich O. Study of the Antioxidant Properties of *Filipendula ulmaria* and *Alnus glutinosa*. *Plants*. 2022;11(18):2415. DOI: 10.3390/plants11182415.
11. Kurkin V. A., Sazanova K. N., Sharipova S. K., Zaitceva E. N., Dubishchev A. V., Gladunova E. P. Diuretic activity of thick extract and flavonoids of fruits of the *Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim. *Science and innovation in medicine*. 2021;6(4):68–72. (In Russ.) DOI: 10.35693/2500-1388-2021-6-4-68-72.
12. Kurkin V. A., Sazanova K. N., Zaitseva E. N., Sharipova S. K., Pravdivtseva O. E., Avdeeva E. V., Gladunova E. P., Varina N. R. Antidepressant activity of flavonoids and thick extract from *Filipendula ulmaria* fruit. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(8):10–12. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-8-10-12.
13. Shilova I. V., Gereng E. A., Zhavoronok T. V., Suslov N. I., Novozheeva T. P. Hepatoprotective properties of the extract of meadowsweet. *Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2010;2:28–32. (In Russ.)
14. Shilova I. V., Samylina I. A., Suslov N. I. Development of nootropic drugs based on Siberian plants. Tomsk: Pechatnaya manufaktura; 2013. 268 p. (In Russ.)
15. Amosova E. N., Shilova I. V., Zueva E. P., Rybalkina O. Yu. Influence of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. Extract on Lewis Lung Carcinoma Development and Cytostatic Therapy Effectiveness in Mice. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53:458–461. DOI: 10.1007/s11094-019-02019-7.
16. Gainche M., Ogeron C., Ripoche I., Senejoux F., Cholet J., Decombat C., Delort L., Berthon J.-Y., Saunier E., Caldefie Chezet F. Chalard P. Xanthine Oxidase Inhibitors from *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and Their Efficient Detections by HPTLC and HPLC Analyses. *Molecules*. 2021;26(7):1939. DOI: 10.3390/molecules26071939.
17. Avdeeva E. Yu., Skorokhodova M. G., Sukhodolo I. V., Porokhova E. D., Slizovskii G. V., Mushtovatova L. S., Ivanov S. D., Reshetov Ya. E., Belousov M. V. The efficiency of *Saussurea controversa* and *Fillipendula ulmaria* extracts on the background of antibiotic therapy of osteomyelitis in experiment. *Experimental and clinical pharmacology*. 2019;82(12):41–46. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-12-41-46.
18. Perevozchikova T. V., Avdeeva E. Yu., Fait E. A., Skorokhodova M. G., Krasnov E. A. Influence of *Saussurea controversa* and *Fillipendula ulmaria* extracts on immunological reactivity of rats with experimental osteomyelitis. *Experimental and clinical pharmacology*. 2016;79(7):16–20. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2016-79-7-16-20.
19. Podpruzhnikov Yu. V., Nemchenko A. S., Andryukova L. N., Emshanova S. V., Kozelskaya T. P., Chistyakov V. V. Textbook of pharmaceutical quality. Moscow: LLC «Gruppa Remedium»; 2015. 432 p. (In Russ.)
20. Mironova A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
21. Zhilina I. V., Stepanova E. F., Golova G. A. Working out of structure and technology of gel with the extract from flowers *Filipendula ulmariae* for use as the dermatology overshoe. *Basic research*. 2011;9(2):349–351. (In Russ.)
22. Krylov N. N., Shevchenko A. M. Development of technology for dry meadowsweet herb extract. *Scientific bulletin of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy*. 2016;33(5):141–144. (In Russ.)
23. Shilova I. V., Khoruzhaya T. G., Samylina I. A. Technology and standardization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. extract. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(5):42–46. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-5-42-46.
24. Shilova I. V., Khoruzhaya T. G., Samylina I. A. Development of composition, technology and standardization of tablets containing dry extract of meadowsweet *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013;47(10):41–44. (In Russ.)

XI РОССИЙСКИЙ ФОРУМ БИОТЕХНОЛОГИЙ

24 - 27 СЕНТЯБРЯ 2024, наукоград КОЛЬЦОВО

БИЗНЕС-ФОРУМ

ДЛЯ БИЗНЕСА,
НАУКИ, ВЛАСТИ
И ИНФРАСТРУКТУРЫ

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ВИРУСОЛОГИЯ,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ,
ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА,
БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОФИЗИКА,
БИОИНФОРМАТИКА

ОТРАСЛЕВАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ
КОМПАНИЙ

OPENBIO.RU

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.074; 615.322; 615.014; 615.282

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1772

Check for updates

CC BY 4.0

Алгоритм разработки комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения с антимикробным действием: от научного поиска до лекарственной формы

В. А. Филатов✉, О. Ю. Куляк, Е. И. Каленикова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). 119192, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1

✉ **Контактное лицо:** Филатов Виктор Андреевич. **E-mail:** filatovviktor097@gmail.com

ORCID: В. А. Филатов – https://orcid.org/0000-0001-7179-8062; О. Ю. Куляк – https://orcid.org/0000-0003-0385-3474;
Е. И. Каленикова – https://orcid.org/0000-0003-0068-2788.

Статья поступила: 28.02.2024 **Статья принята в печать:** 21.05.2024 **Статья опубликована:** 17.05.2024

Резюме

Введение. Несмотря на доказанную клиническую эффективность противогрибковых и противовоспалительных лекарственных препаратов для профилактики и лечения себорейного дерматита, актуален поиск новых мишеней и разработка новых субстанций с благоприятным действием на микрофлору кожи головы, низким риском развития резистентности бактерий и побочных эффектов.

Цель. Поэтапная разработка антимикробной комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения: от научного поиска перспективных субстанций, анализа их состава методом ГХ-МС, оценки *in silico* степени сродства отдельных компонентов к патогенетическим мишеням, выбора оптимального состава комбинированной субстанции по результатам тестирования *in vitro* антимикробного действия до создания препарата на ее основе в форме лекарственного шампуня для терапии себорейного дерматита.

Материалы и методы. Объекты исследования: эфирное масло листьев чайного дерева, 1,8-цинеол, α-(-)-бисаболол и комбинированная субстанция на их основе в массовом соотношении 1 : 1 : 1. Методы: молекулярный докинг (AutoDock, версия 4.2), прогноз фармакологической активности (Phyto4Health), ТСХ, ГХ-МС, оценка антимикробной активности *in vitro*.

Результаты и обсуждение. По результатам литературного поиска были выбраны 3 перспективных вещества для разработки комбинированной субстанции растительного происхождения: эфирное масло листьев чайного дерева, 1,8-цинеол и α-(-)-бисаболол. На основании молекулярного докинга предсказано таргетированное действие компонентов эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола на домены в составе ABC-транспортеров мембраны микроорганизмов, участвующих в патогенезе себорейного дерматита, и обоснована возможность их применения для терапии. Разработана комбинированная субстанция на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола в массовом соотношении 1 : 1 : 1. Проведена оценка подлинности субстанции методами ТСХ и ГХ-МС, и в ее составе количественно выявлены 15 терпенов с преобладанием терпинен-4-ола (16,98 %), 1,8-цинеола (25,63 %) и α-(-)-бисаболола (27,67 %). Установлена синергетическая и таргетированная антимикробная активность субстанции в отношении *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Malassezia furfur* в сравнении с бензалкония хлоридом, кетоконазолом и климбазолом. На основе изученной субстанции разработан состав нового лекарственного шампуня, обладающего выраженным противогрибковым эффектом (более 99 %) в отношении *M. furfur* без видимого подавления нормальной микрофлоры. Для новой субстанции растительного происхождения и лекарственного шампуня оценены показатели качества в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи.

Заключение. Разработана субстанция растительного происхождения, обладающая синергетической и таргетированной антимикробной активностью и представляющая интерес для дальнейшего изучения в качестве лекарственного средства и активной фармацевтической субстанции новых продуктов для лечения себорейного дерматита.

Ключевые слова: разработка, себорейный дерматит, чайное дерево, 1,8-цинеол, бисаболол, антимикробное действие, лекарственный шампунь, докинг, фармацевтический анализ, ТСХ, ГХ-МС

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

Вклад авторов. В. А. Филатов отвечал за планирование дизайна экспериментов, их проведение, обработку, интерпретацию полученных данных и формулирование выводов, разработку состава лекарственного шампуня. О. Ю. Куляк, Е. И. Каленикова редактировали и анализировали материалы, оказывали консультационную помощь в проведении экспериментов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, написании и оформлении статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и ЦКП НО «Арктика» ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова» при административной и финансовой поддержке ООО «Сплат Глобал» и Московского филиала АО «Скайлаб».

Для цитирования: Филатов В. А., Куляк О. Ю., Каленикова Е. И. Алгоритм разработки комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения с антимикробным действием: от научного поиска до лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):94–105. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1772

© Филатов В. А., Куляк О. Ю., Каленикова Е. И., 2024
© Filatov V. A., Kulyak O. Yu., Kalenikova E. I., 2024

Algorithm for the development of a multicomponent pharmaceutical substance of plant origin with antimicrobial action: from science search to dosage form

Viktor A. Filatov✉, **Olesya Yu. Kulyak, Elena I. Kalenikova**

Lomonosov Moscow State University. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia

✉ **Corresponding author:** Viktor A. Filatov. **E-mail:** filatovviktor097@gmail.com

ORCID: Viktor A. Filatov – https://orcid.org/0000-0001-7179-8062; Olesya Yu. Kulyak – https://orcid.org/0000-0003-0385-3474; Elena I. Kalenikova – https://orcid.org/0000-0003-0068-2788.

Received: 28.02.2024 **Accepted:** 21.05.2024 **Published:** 17.05.2024

Abstract

Introduction. Despite the proven clinical efficacy of antifungal and anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of seborrheic dermatitis, the search for new targets and the development of new substances with a beneficial effect on the scalp microflora, with a low risk of antimicrobial resistance and adverse effects, are relevant.

Aim. Development of the antimicrobial multicomponent pharmaceutical substance of plant origin in stages: from a literature search for promising substances, analysis of their composition by GC-MS, *in silico* evaluation of the affinity of individual components to pathogenetic targets, selection of the optimal composition of a multicomponent substance based on the results of *in vitro* research of antimicrobial action and the making of a medical dosage form based on it – a medicinal shampoo for the treatment of seborrheic dermatitis.

Materials and methods. Objects of research: tea tree essential oil, 1,8-cineole, α-(-)-bisabolol and the multicomponent substance based on them. Methods: molecular docking (AutoDock version 4.2), prediction of pharmacological activity (Phyto4Health), TLC, GC-MS, study of antimicrobial activity *in vitro*.

Results and discussion. Based on the results of a literature search, 3 promising substances were selected for the development of a multicomponent plant-based substance: tea tree essential oil, 1,8-cineole and α-(-)-bisabolol. Molecular docking predicted the targeted activity of the phytochemicals of tea tree essential oil, 1,8-cineole and α-(-)-bisabolol on the domains of ABC-transporters of microorganisms involved in the pathogenesis of seborrheic dermatitis and justified the possibility of use for therapy. The multicomponent substance has been developed based on tea tree essential oil, 1,8-cineole and α-(-)-bisabolol in a mass ratio of 1:1:1. The qualitative composition of the substance was assessed by TLC and GC-MS methods, and 15 terpenes were quantitatively identified in its composition with a predominance of terpinen-4-ol (16.98 %), 1,8-cineole (25.63 %) and α-(-)-bisabolol (27.67 %). The synergistic antimicrobial activity of the substance has been established against *S. epidermidis*, *S. aureus*, *C. albicans* and *M. furfur* in comparison with benzalkonium chloride, ketoconazole and climbazole. The composition of a new medical shampoo based on the investigated substance has been developed, which has a pronounced antifungal effect (more than 99.0 %) against *M. furfur* without visible suppression of normal microflora. For the novel substance of plant origin and medical shampoo, quality parameters were assessed in accordance with the Russian Pharmacopoeia of XIV edition.

Conclusion. A substance of plant origin with synergistic and targeted antimicrobial activity has been developed. It has an interest for further study as a drug and API for new products for the treatment of seborrheic dermatitis.

Keywords: seborrheic dermatitis, tea tree oil, eucalyptol, bisabolol, antimicrobial activity, medical shampoo, docking, TLC, GC-MS

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

Contribution of the authors. Viktor A. Filatov was responsible for planning the design of experiments, conducting them, processing, interpreting the obtained data and formulating conclusions, developing the composition of medical shampoo. Olesya Yu. Kulyak and Elena I. Kalenikova edited and analyzed the materials, provided consulting assistance in conducting experiments. All authors participated in the discussion of the results, writing and design of the original article.

Funding. The results of the research were obtained using the equipment of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M. V. Lomonosov Moscow State University (Lomonosov MSU), Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Kazan (Volga Region) Federal University" and the Central Public Educational Institution "Arctic" of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Northern (Arctic) Federal University named M. V. Lomonosov" with the administrative and financial support of LLC "Splat Global" and the Moscow branch of JSC "Skylab".

For citation: Filatov V. A., Kulyak O. Yu., Kalenikova E. I. Algorithm for the development of a multicomponent pharmaceutical substance of plant origin with antimicrobial action: from science search to dosage form. *Drug development & registration*. 2024;13(2):94–105. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1772

ВВЕДЕНИЕ

Новая национальная стратегия развития фармацевтического рынка «Фарма-2030» на ближайшие десять лет предусматривает разработку и вывод на рынок новых лекарственных препаратов (ЛП). Для ускорения разработки инновационных ЛП наиболее перспективен комплексный подход, включающий этапы от литературного поиска перспективных субстанций, оценки *in silico* степени их сродства к патогенетическим мишеням, прогнозирования и тестирования *in vitro* фармакологической активности до создания ЛП [1–2]. Современные методы био-

информатики и медицинской химии позволяют оценить взаимосвязь структуры биологически активных соединений и их активности, предсказать фармакологические эффекты и оптимизировать процесс разработки новых субстанций [3]. Разработка новых субстанций растительного происхождения с антимикробным эффектом позволит расширить номенклатуру лекарственных средств (ЛС) для лечения дерматологических заболеваний.

Дерматологические заболевания кожи головы и волос в значительной мере влияют на качество жизни людей. По оценкам эпидемиологов, себорейный дерматит (СД) и его более легкая форма, перхоть, распространены у 50 % взрослой популяции и у 42 % новорожденных в отдельных странах мира [4–5]. С точки зрения патофизиологии СД – это хроническое рецидивирующее заболевание кожных покровов с изменением качественного состава микрофлоры, увеличением секреции кожного себума, нарушением эпидермального барьера и активным воспалением[1] [6]. Детальный патогенез СД остается неясным [7].

Высокая распространенность СД и наличие большого перечня ассоциированных заболеваний подчеркивает актуальность поиска новых ЛС для профилактики и лечения данной патологии. Согласно клиническим рекомендациям [8] обычно используется комплексная терапия фунгицидными, противовоспалительными и глюкокортикоидными препаратами для наружного применения. Несмотря на их значительный терапевтический эффект и уровни убедительности рекомендаций А-В, такой подход на практике ведет к нарушению биоразнообразия микрофлоры кожи головы [9], формированию резистентности микроорганизмов к назначенной фунгицидной терапии [10] и зачастую к побочным эффектам при длительном применении ЛП [11]. ЛС для терапии СД включают как монокомпонентные, так и многокомпонентные препараты. При этом среди присутствующих на рынке РФ ЛП для лечения СД из различных фармакологических групп невозможно выделить ЛС с оптимальным соотношением безопасности и эффективности.

В последние годы в условиях поиска средств для лечения дерматологических заболеваний человека особое внимание привлекают новые субстанции растительного происхождения и лекарственные растительные препараты [12–13], применение которых характеризуется многоцелевым действием на патогенетические мишени СД, приемлемой дерматологической совместимостью и меньшим риском развития антимикробной резистентности [14–16].

[1] Дерматит себорейный (2020). Клинические рекомендации. Доступно по: https://medi.ru/klinicheskie-rekomendatsii/dermatit-seborejnyj_13921/ Ссылка активна на 08.02.2024.

Несмотря на отсутствие в клинических рекомендациях РФ от 2020 года показаний к применению субстанций из растительного сырья для терапии СД, данные научной литературы свидетельствуют о наличии антимикробной фармакологической активности у эфирных масел [17–18], их индивидуальных соединений [19] и растительных экстрактов [20].

Анализ научной литературы позволил выбрать 3 вещества для разработки комбинированной субстанции растительного происхождения: эфирное масло листьев чайного дерева (*Melaleuca alternifolia*), 1,8-цинеол и α-(-)-бисаболол. Эфирное масло чайного дерева из листьев дикорастущего растения *Melaleuca alternifolia* [21] характеризуется высоким содержанием монотерпенов, в частности терпинен-4-ола, терпинолена, α-терпинена [22]. Богатый фитохимический состав масла определяет антисептический [23], фунгицидный [24], противовоспалительный [25] эффекты. Данные литературы свидетельствуют о наличии у эфирного масла листьев чайного дерева эффективности в лечении СД [26], не достигающей, однако, уровня клинической значимости [27].

Для повышения эффективности субстанции в качестве дополнительного компонента был рассмотрен 1,8-цинеол (эвкалиптол) из эфирного масла листьев *Eucalyptus globulus*, известного своими антибактериальными свойствами [28]. Данный моноциклический терпен с кислородным фрагментом может увеличивать проникновение компонентов через клеточные стенки микроорганизмов [29–30].

Сесквитерпеновый спирт α-(-)-бисаболол, обнаруженный и выделенный из эфирных масел *Vanillosmopsis erythropappa*, *Chamomilla recutita* и *Lavandula angustifolia*, известен своим противовоспалительным, ранозаживляющим и антибактериальным эффектом [31]. Наибольшей антибактериальной активностью обладает именно α-(-)-бисаболол, а не его рацемическая смесь [32].

В связи со значительным фитохимическим и фармакологическим потенциалом эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола данные вещества растительного происхождения были выбраны как потенциальные компоненты для разработки комбинированной субстанции и изучения ее таргетированной антимикробной активности, способствующей терапии СД.

Цель исследования – разработка антимикробной комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения поэтапно: от литературного поиска перспективных субстанций, анализа их состава методом ГХ-МС, оценки *in silico* степени сродства отдельных компонентов к патогенетическим мишеням, выбора оптимального состава комбинированной субстанции по результатам тестирования антимикробного действия *in vitro* до создания препарата на ее основе в форме лекарственного шампуня для терапии СД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанции и вспомогательные вещества

В качестве объектов исследования использовали эфирное масло листьев чайного дерева (Bernardi Group, Франция), 1,8-цинеол из листьев *Eucalyptus* spp. (Wuxi Lous Essence Co., Ltd., Китай), α-(-)-бисаболол из листьев *Hymenocrater yazdianus* (Merck KGaA, Германия) и комбинированную субстанцию на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола в массовом соотношении 1:1:1. Именно этот состав показал максимальную синергетическую и таргетированную антимикробную активность в отношении стандартных штаммов микроорганизмов, участвующих в патогенезе СД (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*, *Candida albicans*), сопоставимую с клинически рекомендованными синтетическими субстанциями бензалкония хлорида, кетоконазола и климбазола [33–34].

В качестве стандартных образцов (СО) для ТСХ и ГХ-МС использовали терпинен-4-ол (чистота 99,5 %, Ernesto Ventos S.A., Испания), 1,8-цинеол (чистота 99,5 %, Ernesto Ventos S.A., Испания) и α-(-)-бисаболол из листьев *Vanillomospsis erythropappa* (чистота 95 %, Ernesto Ventos S.A., Испания). Для сравнительной оценки антимикробной активности разработанной субстанции растительного происхождения были использованы субстанции кетоконазола (Sigma-Aldrich, США), климбазол (Symrise AG, Германия) и бензалкония хлорид (ООО ПК «Реми», Россия).

В качестве вспомогательных веществ (ВВ) с надлежащими техническими спецификациями производителей для разработки формулы лекарственного шампуня использовались кокосульфат натрия Sulfopon® 1216 G (BASF, Германия), кокоглюкозид Plantacare® 818 UP (BASF, Германия), кокамидопропилбетаин Dehyton® PK 45 (BASF, Германия), лаурилглюкозид Plantacare® 1200 UP (BASF, Германия), поликватерниум-67 SoftCAT™ Polymer SL-30 (Dow, Южная Корея), глицерин (Roquette, Франция), глютамат диацетат тетранатриевая соль Dissolvine® GL (Nouryon, Нидерланды), триметилглицин GENENCARE® OSMS BA (IFF, Финляндия), пантенол D-Panthenol® 75W (BASF, Германия), токоферила ацетат Vitamin E Acetate Care (BASF, Германия), консервант на основе бензоата натрия и сорбата калия Euxyl™ K712 (Schulke & Mayr GmbH, Германия), лимонной кислоты моногидрат (Sunshine Biotech International Co., Ltd., Таиланд).

Приготовление испытуемого раствора комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения: эфирное масло листьев чайного дерева, 1,8-цинеол и α-(-)-бисаболол смешивали в массовом соотношении 1:1:1. 0,2 мл полученной *комбинированной* субстанции растворяли в 10 мл толуола, затем разбавляли в 8 раз толуолом.

Оценка подлинности субстанции методом ТСХ

Реактивы и расходные материалы для ТСХ: хроматографические пластинки со слоем силикагеля на алюминиевой подложке марки «TLC Silica gel 60 F254» размером 10 × 10 см (Merck KGaA, Германия), хлороформ («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), этилацетат («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), толуол («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), метанол («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), муравьиная кислота («х.ч.», ООО «Химмед-синтез», Россия), уксуснокислый раствор пара-анисового альдегида в метаноле (ОФС.1.3.0001 «Реактивы. Индикаторы»).

Приготовление растворов СО терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола: 50 мкл СО каждой субстанции растворяли в 10 мл толуола, далее каждый полученный раствор разбавляли в 8 раз толуолом.

Подвижная фаза.

В целях выбора наиболее оптимальной подвижной фазы для ТСХ новой комбинированной субстанции изучались следующие смеси: толуол – этилацетат (85:15), толуол – этилацетат (80:20), толуол – этилацетат – метанол (85:10:5), толуол – этилацетат – метанол – муравьиная кислота (90:4:4:2).

На хроматографическую пластинку наносили 10 мкл испытуемого раствора и растворов СО полосами шириной 1 см, сушили на воздухе, помещали в камеру и хроматографировали восходящим способом. Далее её вынимали из камеры, сушили около 10 мин, опрыскивали уксуснокислым раствором анисового альдегида в метаноле с помощью мелкодисперсного распылителя, выдерживали при 100–105 °С в течение 10 мин и просматривали при дневном свете.

Оценка подлинности и количественное определение субстанции методом ГХ-МС

Определение полного химического состава комбинированной субстанции растительного происхождения и количественное определение компонентов проводились методом ГХ-МС с использованием для расчета процентной нормализации [35] в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.2.0004.15 «Газовая хроматография» Государственной фармакопеи (ГФ) XIV издания[1]. Проверку пригодности хроматографической системы проводили в соответствии с ОФС.1.5.2.0001.15 «Эфирные масла»[2].

Приготовление испытуемого раствора субстанции для ГХ-МС: 1,5 мл новой субстанции растворяли в 10 мл хлороформа, далее последовательно разбавляли хлороформом в 200 раз.

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: https://femb.ru/record/pharmacopea14. Ссылка активна на 23.02.2024.

[2] Там же.

Приготовление стандартного раствора субстанции для ГХ-МС: растворяли 0,15 мг терпинен-4-ола, 0,5 мг 1,8-цинеола и 0,5 мг α-(-)-бисаболола в 10 мл хлороформа, далее последовательно разбавляли хлороформом в 200 раз.

Условия хроматографирования: газовый хроматограф Shimadzu GCMS-TQ8040 с автосамплером AOC-5000 Plus и масс-детектором Shimadzu QP2010 Ultra (Япония); хроматографическая колонка HP-INNOWax, 30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм; газ-носитель – гелий; деление потока – 1:40; скорость потока газа-носителя – 1,5 мл/мин; температура инжектора – 240 °С; программа градиента температур термостата колонки: 0–1 мин – 80 °С, подъем температуры со скоростью 10 °С/мин до 140 °С, затем подъем температуры со скоростью 20 °С/мин до 240 °С, выдерживание при конечной температуре 240 °С в течение 10 мин. Объем вводимой пробы составил 1 мкл [35]. Оценку количественного содержания компонентов субстанции проводили методом внутренней нормализации, устанавливая пределы процентного содержания компонентов в субстанции.

Масс-спектрометр: электронная ионизация (EI) при 70 эВ; квадрупольный анализатор масс; диапазон – 29–500 m/z; температура интерфейса детектора – 240 °С. Интерпретацию масс-спектров и индексов удерживания компонентов субстанции осуществляли с помощью известных библиотеки данных NIST-2017.

Валидация методики ГХ-МС была проведена в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ XIV издания по следующим параметрам: специфичности, аналитической области, линейности, правильности, прецизионности в виде повторяемости (сходимости) и промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности[1].

Молекулярный докинг и определение вида фармакологической активности методами in silico

Молекулярный докинг идентифицированных ГХ-МС соединений осуществлялся в отношении мишени ABC-транспортеров микроорганизмов с использованием программы AutoDock 4.2, а прогностическая оценка их фармакологической активности – с использованием программы Phyto4Health [36]. При изучении каждого вида фармакологической активности оценивали вероятности наличия (Pa, %) и отсутствия (Pi, %) ее проявления лигандом. Фармакологическая активность принималась значимой от значения вероятности Pa > 0,5 при минимальном значении Pi.

Для определения антимикробной активности использовался метод двукратных серийных разведений в жидких питательных средах Мюллера – Хинтон и декстрозного агара Сабуро с использованием 96-луночных планшетов [37]. Тест-культуры с концентрацией 106 КОЕ/мл: стандартные штаммы *S. aureus* ATCC® 29213, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *S. epidermidis* ATCC® 14990, *Micrococcus luteus* ATCC® 10240a, а также *C. albicans* ATCC® 10231 и *M. furfur* ATCC® 14251. Разведения исследуемых веществ от 40 до 1,25 мг/мл готовили в бульоне Мюллера – Хинтон с добавлением 0,3%-го полисорбата-20, далее вносили в лунки в количестве 200 мкл и двукратно разводили. Субстанции сравнения: бензалкония хлорид, кетоконазол и климбазол. Отрицательный контроль: лунки, не содержащие тестируемых веществ (контроль роста культуры). Инкубировали при 37 °С в течение 24–48 ч. Оценку жизнеспособности проводили визуально с использованием 0,01%-го раствора резазурина. За наименьшую минимальную подавляющую концентрацию (МПК) исследуемого вещества принимают концентрацию разведения, где не происходит образования розового продукта трансформации резазурина.

Определение антимикробного взаимодействия соединений в субстанции методом шахматной доски [38]. Показателем характера совместного антимикробного действия веществ являлся индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК), который рассчитывали по формуле [39].

Определение противогрибкового эффекта лекарственного шампуня с комбинированной субстанцией растительного происхождения методом серийных макроразведений и расчетом показателя снижения Log_{10}CFU [33]. Тест-культуры *C. albicans* ATCC® 10231 и *M. furfur* ATCC® 14251 с концентрацией 106 КОЕ/мл в количестве 1 мл смешивали с 9 мл лекарственного шампуня. Инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Отрицательный контроль: пробирки, не содержащие тестируемых веществ. Оценку роста проводили на среде CHROMagar™ Malassezia путем расчета показателя Log_{10}CFU, снижение которого более чем на 2 единицы соответствовало 99,0%-му противогрибковому действию лекарственного шампуня.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»[2] с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel (версия 2016). Рассчитывали среднее значение со стандартными отклонениями в каждой исследуемой группе. Статистическую значимость различий полученных данных принимали при уровне $p < 0,05$.

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: https://femb.ru/record/pharmacopea14. Ссылка активна на 23.02.2024.

[2] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: https://femb.ru/record/pharmacopea14. Ссылка активна на 23.02.2024.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор подвижных фаз для аналитической методики ТСХ осуществляли на основе научных данных о ТСХ многокомпонентных субстанций и их индивидуальных соединений [39, 40], рекомендующих в качестве компонентов подвижной фазы комбинации толуола, этилацетата и муравьиной кислоты. Изучались подвижные фазы «толуол – этилацетат» (85:15; 80:20) и с добавлением метанола – «толуол – этилацетат – метанол» (85:10:5), «толуол – этилацетат – метанол – муравьиная кислота» (90:4:4:2). Введение метанола в последние две подвижные фазы увеличивало скорость движения фронта растворителя и за счет увеличения полярности улучшало разделение зон. Оптимальное разделение терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола достигалось в подвижной фазе «толуол – этилацетат – метанол» (85:10:5).

По результатам планарной ТСХ в восходящем токе растворителя было обнаружено 5 пятен, соответствующих терпинен-4-олу, 1,8-цинеолу, α-(-)-бисабололу и двум неидентифицированным соединениям из класса терпенов (рисунок 1, таблица 1). Для каждого обнаруженного вещества рассчитывали R_f, фиксировали цвет и сравнивали с зонами СО терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола.

Метод ГХ-МС позволил провести качественный анализ основных компонентов комбинированной субстанции по их временам удерживания и количественное определение (рисунок 2). Всего было обнаружено 15 соединений с преобладанием терпинен-4-ола (16,98 %), 1,8-цинеола (25,63 %) и α-(-)-бисаболола (27,67 %), определяющих основной антимикробный эффект субстанции [35]. Химические структуры терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола представлены на рисунке 3.

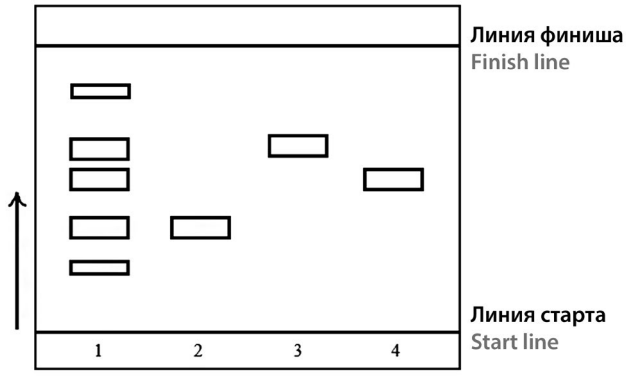


Рисунок 1. Хроматограмма комбинированной субстанции на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола:

1 – комбинированная субстанция; 2 – СО терпинен-4-ола; 3 – СО 1,8-цинеола; 4 – СО α-(-)-бисаболола

Figure 1. Chromatogram of the combined substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole and α-(-)-bisabolol:

1 – combined substance; 2 – SS of terpinene-4-ol; 3 – SS of 1,8-cineole; 4 – SS of α-(-)-bisabolol

Терпинен-4-ол является преобладающим компонентом эфирного масла листьев чайного дерева [23]. 1,8-цинеол также является вторичным метаболитом в составе эфирного масла чайного дерева с содержанием до 10 % [41], поэтому пик 1,8-цинеола является суммированным из чистой субстанции 1,8-цинеола и вторичного 1,8-цинеола из эфирного масла листьев чайного дерева.

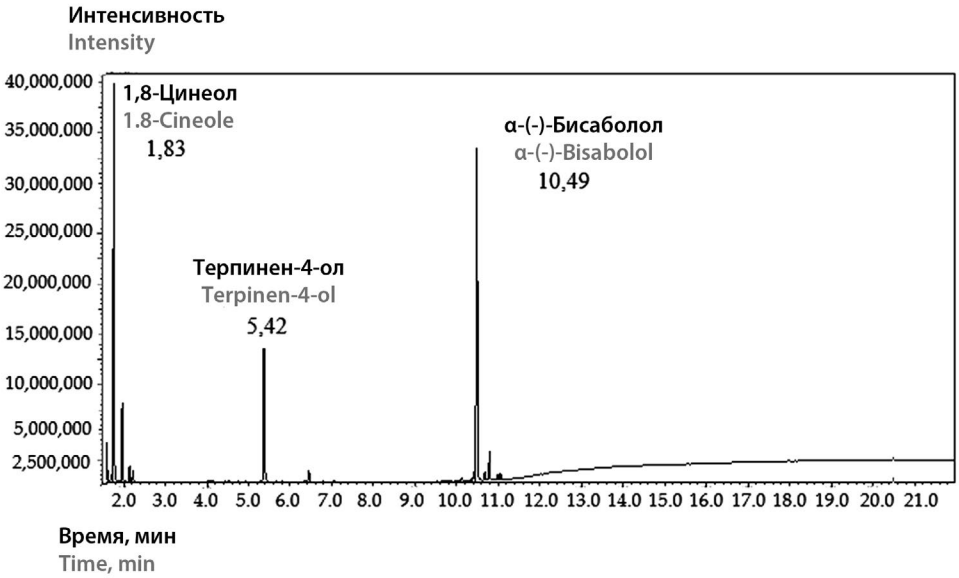


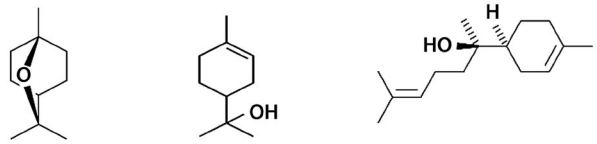
Рисунок 2. ГХ-МС комбинированной субстанции на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола

Figure 2. GC-MS of the combined substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole and α-(-)-bisabolol

Таблица 1. Показатели подлинности новой комбинированной субстанции методом планарной ТСХ

Table 1. Qualitative parameters of the novel combined substance by planar TLC

№	Соединение Compound	Окраска пятна в видимом свете Color of a spot under sunlight	$R_f \pm SD$ ($n = 3$)
1	Не идентифицировано Not identified	Коричневая Brown	0,47 ± 0,01
2	Терпинен-4-ол Terpinen-4-ol	Красно-коричневая Red-brown	0,54 ± 0,03
3	α-(-)-Бисаболол α-(-)-Bisabolol	Розовато-красная Pinkish red	0,64 ± 0,03
4	1,8-Цинеол 1,8-Cineole	Фиолетово-коричневая Purple-brown	0,71 ± 0,02
5	Не идентифицировано Not identified	Розово-пурпурная Pink-purple	0,97 ± 0,01



1,8-Цинеол 1.8-Cineole — **Терпинен-4-ол** Terpinen-4-ol — **α-(-)-Бисаболол** α-(-)-Bisabolol

Рисунок 3. Химические формулы терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола

Figure 3. Chemical structures of terpinene-4-ol, 1,8-cineole and α-(-)-bisabolol

В субстанции превалируют монотерпены и различные терпеноиды (таблица 2). β-Бисаболол, фарнезол и транс-геранилгераниол являются родственными примесями α-(-)-бисаболола [35]. Хорошее разделение соединений в комбинированной субстанции обусловлено выбранными условиями хроматографирования и детектирования. В частности, использование масс-детектирования позволило определить α-фелландрен и α-терпинен даже при близких временах удерживания.

Выбранная методика ГХ-МС была валидирована в соответствии с требованиями Ph. Eur. 11.0, ГФ XIV издания и параметрами рекомендаций ICH[1, 2] для последующего химического анализа и контроля качества субстанции в лабораторных условиях [35].

Хроматографическая система была пригодной: >10000 теоретических тарелок, разрешение между основными пиками >2,0 и относительное стандартное отклонение площадей пиков терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола менее 3,2 %. Совпадение масс-спектров соединений с масс-спектрами из библиотеки NIST-2017 составило более 96 %. Выбранная аналитическая область методики обладала линейностью ($R^2 > 0,995$). Открываемость терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола находилась в пределах от 98,3 до 101,6 % ($n = 9$). Коэффициент вариации результатов шести измерений имел значение от 1,28 до 2,47 %. Коэффициент вариации в рамках внутрилабораторной прецизионности находился в пределах от 1,27 до 2,56 %.

Таблица 2. Соединения комбинированной субстанции, идентифицированные методом ГХ-МС

Table 2. Compounds of the combined substance identified by GC-MS

Название идентифицированного вещества Name of identified compound	Химический класс Chemical class	t_R, мин t_R, min	Относительное содержание, % Relative content, %
β-Мирцен β-Myrcene	Ациклический монотерпен Acyclic monoterpene	1,55	0,27 ± 0,01
α-Фелландрен α-Phellandrene	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	1,66	3,86 ± 0,02
α-Терпинен α-Terpinene	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	1,67	3,86 ± 0,02
D-Лимонен D-Limonene	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	1,77	0,45 ± 0,03
1,8-Цинеол 1,8-Cineole	Бициклический оксид монотерпена Bicyclic epoxygenated monoterpene	1,83	25,63 ± 0,12
γ-Терпинен γ-Terpinene	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	2,05	10,36 ± 0,05
м-Цимол *m*-Cymene	Ароматический монотерпен Aromatic monoterpene	2,23	3,78 ± 0,01
Терпинен-4-ол Terpinene-4-ol	Бициклический окси монотерпен Bicyclic oxygenated monoterpene	5,42	16,98 ± 0,09
α-Терпинеол α-Terpineol	Циклический монотерпен Cyclic monoterpene	6,49	15,31 ± 0,03
δ-Кадинен δ-Cadinene	Бициклический сесквитерпен Bicyclic sesquiterpene	7,08	0,31 ± 0,01
β-Бисаболол β-Bisabolol	Сесквитерпен Sesquiterpene	10,13	0,27 ± 0,02
β-Кариофиллен β-Caryophyllene	Сесквитерпен Sesquiterpene	10,2	0,79±0,01
α-(-)-Бисаболол α-(-)-Bisabolol	Моноциклический сесквитерпеновый спирт Monocyclic sesquiterpene alcohol	10,49	27,67 ± 0,21
Фарнезол Farnesol	Ациклический монотерпен Acyclic monoterpene	10,80	2,52 ± 0,01
Транс-геранилгераниол Trans-geranylgeraniol	Ациклический монотерпен Acyclic monoterpene	11,00	0,55 ± 0,01

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Доступно по: https://femb.ru/record/pharmacopea14. Ссылка активна на 23.02.2024.

[2] European Pharmacopoeia 8.0. Available at: https://archive.org/details/EuropeanPharmacopoeia80/page/n5/mode/2up. Accessed: 23.02.2024.

Молекулярный докинг выявил значительное сродство основных компонентов субстанции с TMD- и NBD-доменами в составе ABC-транспортера микроорганизмов (рисунок 4). Средние значения энергии связывания терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и (-)-α-бисаболола составили –4,6, –4,2 и –5,1 ккал/моль соответственно. Олигомицин А и кетоконазол обладали более значительным, выше среднего сродством к TMD-домену, но не обеспечивали ингибирования NBD-домена и, соответственно, полной защиты от обратного выброса ЛС из клеток микроорганизмов. Климбазол обладал сопоставимым сродством к мишени, как и основные соединения субстанции. Связывание с несколькими доменами мишени позволяет повысить антимикробную активность и снизить риск развития антимикробной резистентности.

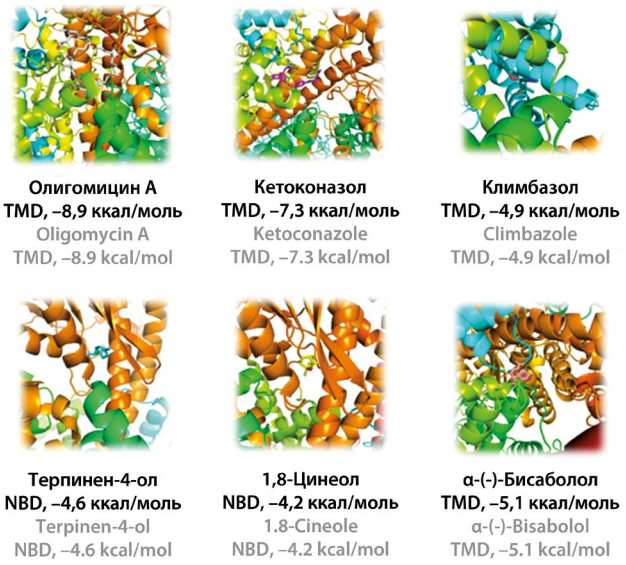


Рисунок 4. Сродство и энергии связывания изучаемых соединений с доменами ABC-транспортеров микроорганизмов

Figure 4. Affinity and binding energies of investigated compounds for domains of ABC-transporters

С помощью программы Phyto4Health для терпинен-4-ола, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола было предсказано наличие нескольких видов фармакологической активности: противовоспалительной, фунгицидной, иммуносупрессивной, анальгетической и противопсориатической (таблица 3). Использование комбинированной субстанции позволит влиять на различные патогенетические составляющие СД. Для 1,8-цинеола предсказана низкая собственная антибактериальная активность, однако соединение может увеличивать проникновение терпинен-4-ола и α-(-)-бисаболола в клетки микроорганизмов. α-(-)-Бисаболол является усилителем фунгицидного действия других соединений при совместном присутствии. Наличие у соединений противовоспалительной активности, включая анальгетическую активность, позволит нивелировать воспалительные проявления при СД.

Таблица 3. Прогноз фармакологической активности соединений с использованием программы Phyto4Health

Table 3. Prediction of the pharmacological activity of compounds using Phyto4Health tool

Название соединения Compound name	Активность Activity	Pa	Pi
1,8-Цинеол 1,8-Cineole	Анальгетическая Analgesic	0,728	0,011
	Противовоспалительная Anti-inflammatory	0,552	0,068
Терпинен-4-ол Terpinene-4-ol	Противовоспалительная Anti-inflammatory	0,875	0,007
	Иммуносупрессивная Immunosuppressant	0,786	0,004
	Анальгетическая Analgesic	0,685	0,015
	Фунгицидная Antifungal	0,613	0,007
α-(-)-Бисаболол α-(-)-Bisabolol	Противовоспалительная Anti-inflammatory	0,848	0,009
	Противопсориатическая Antipsoriatic	0,641	0,008
	Иммуносупрессивная Immunosuppressant	0,602	0,013
	Фунгицидная Antifungal	0,586	0,009
	Усилитель фунгицидной активности Antifungal enhancer	0,533	0,004

Бензалкония хлорид проявил неселективную антимикробную активность, нарушая качественный состав нормальной микрофлоры кожи головы и увеличивая риск развития резистентности. По результатам исследований, комбинированная субстанция обладала синергетической антимикробной активностью в отношении *S. epidermidis* и *S. aureus*, в то время как влияние на нормальную микрофлору – *M. luteus* было минимальным (таблица 4). МПК комбинированной субстанции составила 1,25 мг/мл в отношении *S. epidermidis* и *S. aureus*. Объединение эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола и α-(-)-бисаболола позволило увеличить антибактериальную активность субстанции и сделать ее таргетированной в отношении патогенетической микрофлоры СД [33].

Новая комбинированная субстанция проявила выраженную противогрибковую активность (таблица 5). МПК комбинированной субстанции составила 5,0 мг/мл и 2,5 мг/мл в отношении *M. furfur* и *C. albicans* соответственно. Кетоконазол продемонстрировал более высокую противогрибковую активность, однако чувствительность микроорганизмов к данному ЛС снижается ввиду резистентности [10]. Климбазол обладает средней фунгицидной активностью и не является средством выбора при терапии СД, при

этом широко распространен как инструмент для устранения перхоти в составе парфюмерно-косметических средств.

Таблица 4. Антибактериальная активность объектов исследования в отношении тест-штаммов бактерий себорейного дерматита

Table 4. Antibacterial activity of the studied objects against bacterial test-strains

Название объектов исследования Studied object name	МПК, мг/мл MIC, mg/mL		
	S. aureus ATCC 29213	*S. epidermidis* ATCC 14990	*M. luteus* ATCC 10240a
1,8-Цинеол 1,8-Cineole	40,00	2,50	40,00
Эфирное масло листьев чайного дерева Tea tree essential oil	40,00	1,25	40,00
α-(-)-Бисаболол α-(-)-Bisabolol	5,00	1,25	20,00
Субстанция на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола, α-(-)-бисаболола (1 : 1 : 1) Substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole, α-(-)-bisabolol (1 : 1 : 1 mass ratio)	1,25	1,25	20,00
Бензалкония хлорид Benzalkonium chloride	5,00	5,00	5,00

Комбинации эфирного масла листьев чайного дерева с 1,8-цинеолом (1 : 1) и эфирного масла листьев чайного дерева с α-(-)-бисабололом (1 : 1) обладали явным синергизмом в отношении *C. albicans*, *S. epidermidis* и *S. aureus* (таблица 6). Добавление небольшого количества 1,8-цинеола снизило МПК эфирного масла листьев чайного дерева в 4 раза и позволило достичь индекса синергизма FICI < 1,0 в отношении *C. albicans* и *S. epidermidis*. Остальные комбинации веществ обладали аддитивным действием в отношении микроорганизмов.

По результатам проведенных исследований *in silico* и *in vitro* был разработан состав инновационного лекарственного шампуня в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0041.18 «Шампуни лекарственные» ГФ XIV издания (таблица 7). Новый состав обладал высокой пенообразующей способностью (пенное число 222 ± 3), достаточной устойчивостью пены (0,87 ± 0,02), средней вязкостью 5764 ± 27 и слабокислым pH 5,56 ± 0,10 [40], прошел цикл испытаний стабильности при 40 ± 2 °C в течение 6 месяцев.

Таблица 5. Противогрибковая активность объектов исследования в отношении тест-штаммов бактерий себорейного дерматита

Table 5. Antifungal activity of the studied objects against bacterial test-strains

Название объектов исследования Studied object name	МПК, мг/мл MIC, mg/mL	
	C. albicans ATCC 10231	*M. furfur* ATCC 14251
1,8-Цинеол 1,8-Cineole	40,00	40,00
Эфирное масло листьев чайного дерева Tea tree essential oil	5,00	40,00
α-(-)-Бисаболол α-(-)-Bisabolol	20,00	20,00
Субстанция на основе эфирного масла чайного дерева, 1,8-цинеола, α-(-)-бисаболола (1 : 1 : 1) Substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole, α-(-)-bisabolol (1 : 1 : 1 mass ratio)	2,50	5,00
Климбазол Climbazole	10,00	10,00
Кетоконазол Ketoconazole	2,50	2,50

Выбор диапазона содержания активной фармацевтической субстанции в составе лекарственного шампуня обоснован данными об антимикробной активности. Противогрибковый эффект нового лекарственного шампуня был оценен в сравнении с климбазолом и кетоконазолом. МПК разведений фармацевтической субстанции в отношении выбранных стандартных штаммов бактерий и дрожжеподобных грибов составляет 1,25 и 2,50 мг/мл, что в составе лекарственного шампуня соответствовало концентрациям 0,125 и 0,25 масс.%. Лекарственный шампунь с 0,5 масс.% многокомпонентной субстан-

Таблица 6. Индексы антимикробного взаимодействия между соединениями субстанции

Table 6. Indexes of antimicrobial interaction between compounds in the substance

Значения FICI, Mean ± SD FICI values, Mean ± SD	Штаммы микроорганизмов Strains of microorganisms		
	C. albicans ATCC 10231	*S. aureus* ATCC 29213	*S. epidermidis* A TCC 14990
Эфирное масло листьев чайного дерева + 1,8-цинеол Tea tree essential oil + 1,8-Cineole	1,056 ± 0,159	1,913 ± 0,276	0,344 ± 0,125
Эфирное масло листьев чайного дерева + α-(-)-бисаболол Tea tree essential oil + α-(-)-Bisabolol	0,523 ± 0,014	1,025 ± 0,013	0,625 ± 0,261
1,8-цинеол + α-(-)-бисаболол 1,8-Cineole + α-(-)-Bisabolol	1,316 ± 0,472	3,052 ± 0,565	1,500 ± 0,435

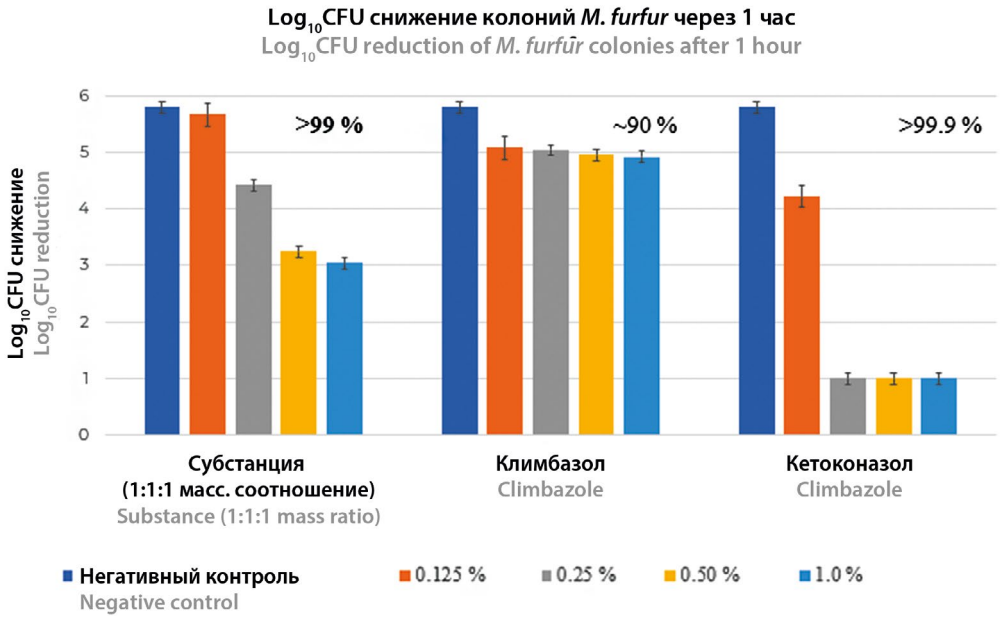


Рисунок 5. Противогрибковая эффективность лекарственных шампуней с активными субстанциями

Figure 5. Antifungal effect of the medical shampoos with active substances

ции подавлял рост *M. furfur* более чем на 2 порядка, что равнозначно 99%-му противогрибковому эффекту после 1 часа контакта (рисунок 5). Однако максимально выраженный антимикробный эффект лекарственного шампуня, сопоставимый с климбазолом и кетоконазолом, достигался при концентрации 1 масс.%. Данный эффект был значимее, чем у климбазола во всех концентрациях [42].

Таблица 7. Состав нового лекарственного шампуня с комбинированной субстанцией растительного происхождения

Table 7. Composition of the novel medical shampoo with the combined substance of plant origin

Название субстанции Name of substance	**Функция** Function	**Количество, масс.%** Quantity, wt.%
Вода очищенная Purified water	Растворитель Solvent	до 100,00
Кокосульфат натрия Sodium coco-sulfate	Анионное ПАВ Anionic surfactant	6,00
Кокоглюкозид Coco glucoside	Неионное ПАВ Nonionic surfactant	7,50
Лаурилглюкозид Lauryl glucoside	Неионное ПАВ Nonionic surfactant	5,00
Кокамидопропилбетаин Cocamidopropyl betaine	Амфотерное ПАВ Amphoteric surfactant	5,00
Поликватерниум-67 Polyquaternium-67	Кондиционирующий агент Conditioning agent	0,30
Глицерин Glycerine	Сорастворитель Cosolvent	3,00
Глютамат диацетат тетранатриевая соль Tetrasodium glutamate diacetate	Комплексообразователь Complexing agent	0,50
Субстанция на основе эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеола, α-(-)-бисаболола (1 : 1 : 1) Substance based on tea tree essential oil, 1,8-cineole, α-(-)-bisabolol (1 : 1 : 1 mass ratio)	Активная фармацевтическая субстанция Active pharmaceutical substance	1,00
Бетаин Betaine	Увлажняющий компонент Moisturising agent	1,00
Пантенол Panthenol	Увлажняющий компонент Moisturising agent	0,50
Токоферила ацетат Tocopheryl acetate	Антиоксидант Antioxidant	0,05
Сорбат калия и бензоат натрия Euxyl™ K712 Potassium sorbate and sodium benzoate Euxyl™ K712	Консервант Preservative	0,70
Лимонной кислоты моногидрат Citric acid monohydrate	Регулятор pH pH regulator	0,75

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для разработки новой комбинированной фармацевтической субстанции растительного происхождения для терапии СД применен комплексный подход с использованием молекулярного моделирования и методов медицинской химии. Субстанция про-

анализирована методами ТСХ и ГХ-МС. На хроматограммах идентифицированы терпены с преобладанием 1,8-цинеола, терпинен-4-ола и α-(-)-бисаболола. Разработанная методика ГХ-МС валидирована для последующего контроля качества.

Терпинен-4-ол из эфирного масла листьев чайного дерева, 1,8-цинеол и α-(-)-бисаболол обладали достаточным сродством к доменам ABC-транспортеров, позволяя повысить антимикробную активность и снизить риск антимикробной резистентности патогенной микрофлоры СД. Их прогнозируемая фармакологическая активность предполагает воздействие на основные патогенетические мишени СД для коррекции хронической воспалительной реакции с одновременной регуляцией качественного состава микрофлоры кожи головы.

Разработанная субстанция обладает значительной и таргетированной антимикробной активностью в отношении стандартных штаммов микроорганизмов, участвующих в патогенезе СД. Именно многокомпонентный химический состав обусловливает синергетическое антибактериальное и фунгицидное действие, сопоставимое с бензалкония хлоридом и кетоконазолом. Лекарственный шампунь с новой субстанцией соответствовал требованиям Государственной фармакопеи, обладал приятными органолептическими характеристиками и значительным противогрибковым эффектом. Представленные результаты подтверждают перспективность дальнейших исследований новой субстанции растительного происхождения, разработку инновационных ЛП для лечения СД, исследование их безопасности, дерматологической переносимости и клинической эффективности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Katiyar C., Gupta A., Kanjilal S., Katiyar S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda).* 2012;33(1):10–19. DOI: 10.4103/0974-8520.100295.
2. Earm K., Earm Y. E. Integrative approach in the era of failing drug discovery and development. *Integrative Medicine Research.* 2014;3(4):211–216. DOI: 10.1016/j.imr.2014.09.002.
3. Pinzi L., Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(18):4331. DOI: 10.3390/ijms20184331.
4. Choeng W. K., Yeung C. K., Torsekar R. G., Suh D. H., Ungpakorn R., Widaty S., Azizan N. Z., Gabriel M. T., Tran H. K., Chong W. S., Shih I.-H., Dall'Oglio F., Micali G. Treatment of seborrhoeic dermatitis in Asia: a consensus guide. *Skin Appendage Disorders.* 2016;1(4):187–196. DOI: 10.1159/000444682.
5. Gupta A. K., Madzia S. E., Batra R. Etiology and management of Seborrheic dermatitis. *Dermatology.* 2004;208(2):89–93. DOI: 10.1159/000076478.
6. Borda L. J., Wikramanayake T. C. Seborrheic Dermatitis and Dandruff: A Comprehensive Review. *Journal of Clinical and Investigative Dermatology.* 2015;3(2):10. DOI: 10.13188/2373-1044.1000019.
7. Adalsteinsson J. A., Kaushik S., Muzumdar S., Guttman-Yassky E., Ungar J. An update on the microbiology, immunology and genetics of seborrheic dermatitis. *Experimental Dermatology.* 2020;29(5):481–489. DOI: 10.1111/exd.14091.
8. Polonskaya A. S., Shatokhina E. A., Kruglova L. S. Seborrheic dermatitis: current ideas of the etiology, pathogenesis, and treatment approaches. 2020;19(4):451–458. (In Russ.) DOI: 10.17116/klinderma202019041451.
9. Tao R., Li R., Wang R. Skin microbiome alterations in seborrheic dermatitis and dandruff: A systematic review. *Experimental Dermatology.* 2021;30(10):1546–1553. DOI: 10.1111/exd.14450.
10. Leong C., Chan J. W. K., Lee S. M., Lam Y. I., Goh J. P. Z., Ianiri G., Dawson T. L. Azole resistance mechanisms in pathogenic *Malassezia furfur*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2021;65(5):1975–2000. DOI: 10.1128/AAC.01975-20.
11. Bukvić Mokos Z., Kralj M., Basta-Juzbašić A., Lakoš Jukić I. Seborrheic dermatitis: an update. *Acta Dermatovenerologica Croatica.* 2012;20(2):98–104.
12. Reuter J., Merfort I., Schempp C. M. Botanicals in dermatology: an evidence-based review. *American Journal of Clinical Dermatology.* 2010;11(4):247–267. DOI: 10.2165/11533220-000000000-00000.
13. Olisova O. Y., Snarskaya E. S., Gladko V. V., Burova E. P. Russian traditional medicine in dermatology. *Clinics in Dermatology.* 2018;36(3):325–337. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2018.03.007.
14. Karimi A., Majlesi M., Rafieian-Kopaei M. Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. *Journal of Nephropharmacology.* 2015;4(1):27–30.
15. Lynch N., Berry D. Differences in perceived risks and benefits of herbal, over-the-counter conventional, and prescribed conventional, medicines, and the implications of this for the safe and effective use of herbal products. *Complementary Therapies in Medicine.* 2007;15(2):84–91. DOI: 10.1016/j.ctim.2006.06.007.
16. Enioutina E. Yu., Teng L., Fateeva T. V., Brown J. C. S., Job K. M., Bortnikova V. V., Krepkova L. V., Gubarev M. I., Sherwin C. M. T. Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: combating microbial resistance. *Expert Review of Clinical Pharmacology.* 2017;10(11):1203–1214. DOI: 10.1080/17512433.2017.1371591.
17. Abers M., Schroeder S., Goelz L., Sulser A., St Rose T., Puchalski K., Langland J. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021;21(1):124. DOI: 10.1186/s12906-021-03285-3.
18. Jain S., Arora P., Nainwal L. M. Essential Oils as Potential Source of Anti-dandruff Agents: A Review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.* 2022;25(9):1411–1426. DOI: 10.2174/1386207324666210712094148.
19. Mączka W., Duda-Madej A., Górny A., Grabarczyk M., Wińska K. Can eucalyptol replace antibiotics? *Molecules.* 2021;26(16):4933. DOI: 10.3390/molecules26164933.
20. Mustarichie R., Rostinawati T., Pitaloka D. A. E., Saptarini N. M., Iskandar Y. Herbal Therapy for the Treatment of Seborrhea Dermatitis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology.* 2022;2022(15):2391–2405. DOI: 10.2147/CCID.S376700.
21. Ayatollahi A., Firooz A., Lotfali E., Mojab F., Fattahi M. Herbal Therapy for the Management of Seborrheic Dermatitis: A Narrative Review. *Recent Advances in Anti-Infective Drug Discovery.* 2021;16(3):209–226. DOI: 10.2174/2772434416666211029113213.
22. Brophy J. J., Davies N. W., Southwell I. A., Stiff I. A., Williams L. R. Gas chromatographic quality control for oil of Melaleuca terpinen-4-ol type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1989;37:1330–1335.
23. Carson C. F., Hammer K. A., Riley T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews.* 2006;19(1):50–62. DOI: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006.
24. Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology.* 2003;95(4):853–860. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x.
25. Brand C., Ferrante A., Prager R. H., Riley T. V., Carson C. F., Finlay-Jones J. J., Hart P. H. The water-soluble components of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflammation Research.* 2001;50(4):213–219. DOI: 10.1007/s000110050746.

26. Waldroup W., Scheinfeld N. Medicated shampoos for the treatment of seborrheic dermatitis. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2008;7(7):699–703.
27. Satchell A. C., Saurajen A., Bell C., Barnetson R. S. Treatment of dandruff with 5% tea tree oil shampoo. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2002;47(6):852–855. DOI: 10.1067/mjd.2002.122734.
28. Dhakad A. K., Pandey V. V., Beg S., Rawat J. M., Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017;98(3):833–848. DOI: 10.1002/jsfa.8600.
29. Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(11):8022–8028.
30. Zengin H., Baysal A. H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*. 2014;19(11):17773–177798. DOI: 10.3390/molecules191117773.
31. Kamatou G. P. P., Viljoen A. M. A review of the application and pharmacological properties of α-bisabolol and α-bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2010;87(1):1–7.
32. 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.
33. Filatov V. A., Kulyak O. Yu., Kalenikova E. I. Chemical Composition and Antimicrobial Potential of a Plant-Based Substance for the Treatment of Seborrheic Dermatitis. *Pharmaceuticals*. 2023;16(3):328. DOI: 10.3390/ph16030328.
34. Filatov V. A., Kulyak O. Yu., Kalenikova E. I. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of an active plant-based quadrocomplex for skin hygiene. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2022;10(5):905–921.
35. Filatov V. A., Ilin E. A., Kulyak O. Yu., Kalenikova E. I. Development and Validation of a Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Analysis of the Novel Plant-Based Substance with Antimicrobial Activity. *Antibiotics*. 2023;12(10):1558. DOI: 10.3390/antibiotics12101558.
36. Ionov N., Druzhilovskiy D., Filimonov D., Poroikov V. Phyto4Health: Database of Phytocomponents from Russian Pharmacopoeia Plants. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2023;63(7):1847–1851. DOI: 10.1021/acs.jcim.2c01567.
37. Bellio P., Fagnani L., Nazzicone L., Celenza G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*. 2021;8:101543. DOI: 10.1016/j.mex.2021.101543.
38. Odds F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(1):1. DOI: 10.1093/jac/dkg301.
39. Piovan A., Caniato R., Brun P., Costa V. D., Filippini R. Rapid and feasible TLC screening of tea tree oil commercial samples. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2021;10(1):175–180. DOI: 10.22271/phyto.2021.v10.i1c.13304.
40. Shaha A., Salunkhe V. R. Development and validation of a high performance thin layer chromatographic method for determination of 1,8-Cineole in *Callistemon Citrinus*. *Pharmacognosy Research*. 2014;6(2):143–147.
41. Hendry E. R., Worthington T., Conway B. R., Lambert P. A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;64(6):1219–1225. DOI: 10.1093/jac/dkp362.
42. Filatov V. A., Kulyak O. Yu., Kalenikova E. I. The Development of Medical Shampoo with a Plant-Based Substance for the Treatment of Seborrheic Dermatitis. *Medical Sciences Forum*. 2023;21(1):51. DOI: 10.3390/ECB2023-14084.

Research article / Оригинальная статья

UDC 615.072

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1505

Check for updates

CC BY 4.0

Identification and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in yellow wood anemone (*Anemone ranunculoides* L.) by UHPLC-DAD-HESI/MS analysis

Alexander N. Luferov[1], Natalia V. Bobkova[1], Dmitrii O. Bokov[1, 2]✉, Mikhail N. Rodin[1]✉✉, Ekaterina V. Sergunova[1], Tatiana Yu. Kovaleva[1], Tamara D. Rendyuk[1], Angelina V. Strelyaeva[1], Alla M. Antsyshkina[1], Tatiana V. Prostodusheva[1], Svetlana G. Zaichikova[1], Vera M. Baeva[1], Irina B. Perova[2], Konstantin I. Eller[2], Vladimir V. Bessonov[2]

[1] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[2] Federal Government Budgetary Institution of Science "Federal research center of nutrition and biotechnology". 2/14, Ustyinsky proezd, Moscow, 109240, Russia

✉ **Corresponding author:** Dmitrii O. Bokov. **E-mail:** bokov_d_o@staff.sechenov.ru
✉✉ **Corresponding author:** Mikhail N. Rodin. **E-mail:** m.rodin2010@yandex.ru

ORCID: Alexander N. Luferov – https://orcid.org/0000-0003-2397-7378; Natalia V. Bobkova – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019; Dmitrii O. Bokov – https://orcid.org/0000-0003-2968-2466; Mikhail N. Rodin – https://orcid.org/0000-0001-9532-6879; Ekaterina V. Sergunova – https://orcid.org/0000-0002-7194-5525; Tatiana Yu. Kovaleva – https://orcid.org/0000-0002-5961-9030; Tamara D. Rendyuk – https://orcid.org/0000-0002-0359-3847; Angelina V. Strelyaeva – https://orcid.org/0000-0002-2510-8144; Alla M. Antsyshkina – https://orcid.org/0000-0003-2129-9585; Tatiana V. Prostodusheva – https://orcid.org/0000-0002-7731-6797; Svetlana G. Zaichikova – https://orcid.org/0000-0001-7447-8881; Vera M. Baeva – https://orcid.org/0000-0002-1916-1299; Irina B. Perova – https://orcid.org/0000-0001-5975-1376; Konstantin I. Eller – https://orcid.org/0000-0003-1046-4442; Vladimir V. Bessonov – https://orcid.org/0000-0002-3587-5347.

Received: 10.08.2023 **Accepted:** 14.03.2024 **Published:** 15.03.2024

Abstract

Introduction. Yellow wood anemone (*Anemone ranunculoides* L.) is a herbaceous perennial. This plant grows in the European parts of Russia, Ciscaucasia, Siberia, Central Europe and other regions. It has many different pharmacological activities: immunomodulatory, sedative, anti-inflammatory, antitoxic, diuretic, antibacterial, antioxidant, antitumor and antirheumatic activity. These various effects are due to their biologically active compounds, which include ephemeroids, protoanemonin, saponins, tannins, resins, ascorbic acid, ranunculin, oils lipids and triterpene glycosides. As to phenolic compounds, currently there is no sufficient information on flavonoids and hydroxycinnamic acids (HCAs) profiles in different species of genus *Anemone*. Because these groups of compounds are quite specific for yellow wood anemone, their detailed study seems to be relevant.

Aim. The objective of this research is to identify and quantify flavonoids, HCAs, and their conjugates in Yellow wood anemone leaves, flowers and rhizomes with roots.

Materials and methods. The identification was carried out by using ultra-high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometric detection (UHPLC–DAD–ESI-MS) with quantification of individual compounds by external calibration method.

Results and discussion. Among the 47 compounds, 30 flavonoids and 17 derivatives of HCAs were detected. Quercetin glycosides were found to be the major flavonoids in aerial parts whereas chalcone glycosides – in underground parts. The major HCA in rhizomes with roots was feruloyltartaric acid (1.18 mg/g) whereas chlorogenic acid was predominant in leaves and flowers (8.68 mg/g and 2.62 mg/g accordingly). The total content of phenolic compounds was estimated at 60 mg/g on a dry weight basis.

Conclusion. As a result of the research a detailed profile of flavonoids and HCAs acids of anemon was described. The data obtained can serve to identify this species in the standardization of medicinal plant materials and taxonomic studies.

Keywords: *Anemone ranunculoides*, flavonoids, hydroxycinnamic acids

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 N. Luferov, Natalia V. Bobkova, Dmitrii O. Bokov, Ekaterina V. Sergunova, Tatiana Yu. Kovaleva, Tamara D. Rendyuk, Angelina V. Strelyaeva, Alla M. Antsyshkina, Tatiana V. Prostodusheva, Svetlana G. Zaichikova, Vera M. Baeva, Irina B. Perova, Konstantin I. Eller, Vladimir V. Bessonov planning of the experiment. Dmitrii O. Bokov, Mikhail N. Rodin, Irina B. Perova carried out experimental studies. Alexander N. Luferov, Natalia V. Bobkova, Dmitrii O. Bokov, Mikhail N. Rodin, Ekaterina V. Sergunova, Tatiana Yu. Kovaleva, Tamara D. Rendyuk, Angelina V. Strelyaeva, Alla M. Antsyshkina, Tatiana V. Prostodusheva, Svetlana G. Zaichikova, Vera M. Baeva, Irina B. Perova, Konstantin I. Eller, Vladimir V. Bessonov participated in writing the text of the article, including the conclusion and discussion of the results. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

For citation: Luferov A. N., Bobkova N. V., Bokov D. O., Rodin M. N., Sergunova E. V., Kovaleva T. Yu., Rendyuk T. D., Strelyaeva A. V., Antsyshkina A. M., Prostodusheva T. V., Zaichikova S. G., Baeva V. M., Perova I. B., Eller K. I., Bessonov V. V. Identification and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in yellow wood anemone (*Anemone ranunculoides* L.) by UHPLC-DAD-HESI/MS analysis. *Drug development & registration*. 2024;13(2):106–117. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1505

© Luferov A. N., Bobkova N. V., Bokov D. O., Rodin M. N., Sergunova E. V., Kovaleva T. Yu., Rendyuk T. D., Strelyaeva A. V., Antsyshkina A. M., Prostodusheva T. V., Zaichikova S. G., Baeva V. M., Perova I. B., Eller K. I., Bessonov V. V., 2024
© Луферов А. Н., Бобкова Н. В., Боков Д. О., Родин М. Н., Сергунова Е. В., Ковалёва Т. Ю., Рендюк Т. Д., Стреляева А. В., Анцышкина А. М., Простодушева Т. В., Зайчикова С. Г., Баева В. М., Перова И. Б., Эллер К. И., Бессонов В. В., 2024

Идентификация и количественное определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот ветреницы лютичной (*Anemone ranunculoides* L.) методом UHPLC-DAD-HESI/MS

А. Н. Луферов[1], Н. В. Бобкова[1], Д. О. Боков[1, 2]✉, М. Н. Родин[1]✉✉, Е. В. Сергунова[1], Т. Ю. Ковалёва[1], Т. Д. Рендюк[1], А. В. Стреляева[1], А. М. Анцышкина[1], Т. В. Простодушева[1], С. Г. Зайчикова[1], В. М. Баева[1], И. Б. Перова[2], К. И. Эллер[2], В. В. Бессонов[2]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»). 109240, Россия, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

✉ **Контактное лицо:** Боков Дмитрий О. **E-mail:** bokov_d_o@staff.sechenov.ru
✉✉ **Контактное лицо:** Родин Михаил Н. **E-mail:** m.rodin2010@yandex.ru

ORCID: А. Н. Луферов – https://orcid.org/0000-0003-2397-7378; Н. В. Бобкова – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019;
Д. О. Боков – https://orcid.org/0000-0003-2968-2466; М. Н. Родин – https://orcid.org/0000-0001-9532-6879;
Е. В. Сергунова – https://orcid.org/0000-0002-7194-5525; Т. Ю. Ковалёва – https://orcid.org/0000-0002-5961-9030;
Т. Д. Рендюк – https://orcid.org/0000-0002-0359-3847; А. В. Стреляева – https://orcid.org/0000-0002-2510-8144;
А. М. Анцышкина – https://orcid.org/0000-0003-2129-9585; Т. В. Простодушева – https://orcid.org/0000-0002-7731-6797;
С. Г. Зайчикова – https://orcid.org/0000-0001-7447-8881; В. М. Баева – https://orcid.org/0000-0002-1916-1299;
И. Б. Перова – https://orcid.org/0000-0001-5975-1376; К. И. Эллер – https://orcid.org/0000-0003-1046-4442;
В. В. Бессонов – https://orcid.org/0000-0002-3587-5347.

Статья поступила: 10.08.2023 **Статья принята в печать:** 14.03.2024 **Статья опубликована:** 15.03.2024

Резюме

Введение. Ветреница лютичная (*Anemone ranunculoides* L.) – многолетнее травянистое растение произрастает в европейской части России, Предкавказье, Сибири, Центральной Европе и в других регионах. Ветреница лютичная обладает разнообразной фармакологической активностью: иммуномодулирующей, седативной, противовоспалительной, антитоксической, мочегонной, антибактериальной, антиоксидантной, противоопухолевой и противоревматической. Эти многочисленные эффекты обусловлены биологически активными соединениями, входящими в состав этого эфемероида, среди которых протоанемонин, сапонины, танины, смолы, аскорбиновая кислота, ранункулин, масла, липиды и тритерпеновые гликозиды. Говоря о фенольных соединениях, следует отметить, что в настоящее время нет достаточной информации о профиле флавоноидов и гидроксикоричных кислот (ГКК) разных видов рода *Anemone*. Поскольку эти группы соединений достаточно специфичны для ветреницы лютичной, их детальное изучение представляется актуальным.

Цель. Целью данного исследования является идентификация и количественное определение флавоноидов, ГКК и их конъюгатов в листьях, цветках и корневищах с корнями ветреницы лютичной.

Материалы и методы. Идентификацию проводили методом UHPLC-DAD-HESI/MS, для количественного определения индивидуальных соединений использовался метод внешнего стандарта.

Результаты и обсуждение. Среди 47 соединений обнаружено 30 флавоноидов и 17 производных ГКК. Установлено, что в надземной части основными флавоноидами являются гликозиды кверцетина, а в подземной части – халконовые гликозиды. Основной ГКК в корневищах с корнями была ферулоилвинная кислота (1,18 мг/г), тогда как в листьях и цветках преобладала хлорогеновая кислота (8,68 мг/г и 2,62 мг/г соответственно). Общее содержание фенольных соединений составило 60 мг/г в пересчете на сухую массу сырья.

Заключение. В результате представлен подробный профиль флавоноидов и ГКК ветреницы лютичной. Полученные данные могут использоваться для идентификации этого вида при стандартизации лекарственного растительного сырья и в таксономических исследованиях.

Ключевые слова: *Anemone ranunculoides*, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты

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

Вклад авторов. А. Н. Луферов, Н. В. Бобкова, Д. О. Боков, Е. В. Сергунова, Т. Ю. Ковалёва, Т. Д. Рендюк, А. В. Стреляева, А. М. Анцышкина, Т. В. Простодушева, С. Г. Зайчикова, В. М. Баева, И. Б. Перова, К. И. Эллер, В. В. Бессонов осуществляли планирование эксперимента. Д. О. Боков, М. Н. Родин, И. Б. Перова проводили экспериментальные исследования. А. Н. Луферов, Н. В. Бобкова, Д. О. Боков, М. Н. Родин, Е. В. Сергунова, Т. Ю. Ковалёва, Т. Д. Рендюк, А. В. Стреляева, А. М. Анцышкина, Т. В. Простодушева, С. Г. Зайчикова, В. М. Баева, И. Б. Перова, К. И. Эллер, В. В. Бессонов участвовали в написании текста статьи, включая заключение и обсуждение результатов. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Для цитирования: Луферов А. Н., Бобкова Н. В., Боков Д. О., Родин М. Н., Сергунова Е. В., Ковалёва Т. Ю., Рендюк Т. Д., Стреляева А. В., Анцышкина А. М., Простодушева Т. В., Зайчикова С. Г., Баева В. М., Перова И. Б., Эллер К. И., Бессонов В. В. Идентификация и количественное определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот ветреницы лютичной (*Anemone ranunculoides* L.) методом UHPLC-DAD-HESI/MS. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):106–117. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1505

INTRODUCTION

The genus *Anemone* L. includes more than 150 species[1], which are a fairly large taxonomic group within the subfamily, *Ranunculoideae* Arn. family *Ranunculaceae* Juss. [1–3]. Windflowers (anemones) are distributed mainly in the extratropical regions of Eurasia and North and South America [2, 4].

Yellow wood anemone (*Anemone ranunculoides* L.), also known as yellow anemone or buttercup anemone, is a herbaceous perennial 5–20 (25) cm high. *Anemone ranunculoides* belongs to the subgenus *Anemonoides*

[1] The Plant List. Available at: http://www.theplantlist.org/ Accessed: 28.09.2023.

(Mill.) Luferov, section *Sylvia* Spach, and subsection *Ranunculoides* (Starodubtsev) Luferov. Characteristic features of the subgenus *Anemonoides* are petiolate stem leaves, sessile or almost sessile nuts with short pubescence, as well as arcuate or hook-shaped stylodia. For section *Sylvia*, diagnostic features are long (rarely short) horizontal rhizomes; nuts with coarse hairs. The subsection *Ranunculoides* includes species with jointed rhizomes, consisting of thick and thin sections of different lengths. Tepals of a simple perianth, 5–7 (rarely up to 12), appressed-hairy on the underside [1–6]. Blossoms in April – May, bears fruit in the second half of May – June; it is spring ephemeroid.

The main habitats of plants of this species are broad-leaved (*Querqus*, *Acer*, *Fraxinus*, *Fagus*, *Tilia* species) and small-leaved (*Betula*, *Populus*, *Alnus incana* species) forests, as well as in mixed forests with *Picea* species, less often other conifers, among thickets of species *Corylus*, *Sambucus*, *Euonymus*, *Viburnum*, and other shrubs, on edges, glades, in parks and gardens. The plant is a European-West Siberian-Caucasian forest species in terms of its geographical distribution [3]. Many anemones contain valuable biologically active compounds that provide their healing effect in various diseases. For example, they are used as antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, antitoxic, diuretic, antitumor, antirheumatic, immunomodulatory, sedative agents [1, 7, 8]. *Anemone nemorosa* L. is known as a folk antitumor agent [9]. In traditional medicine, *A. ranunculoides* drugs are used for stomach pain, whooping cough, gout, paralysis, and also as a drug of enhancing the activity of the kidneys and lungs. An alcoholic tincture of *A. ranunculoides* is used externally for edema, rheumatism and radiculitis [10]. Buttercup anemone is used to produce homeopathic medicines [11]. Insufficient chemical and pharmacological knowledge of *Anemone* species limits the possibilities of their use in practical pharmacy. The use of anemones poses a certain danger due to the content of toxic anemonol, which, when dried, turns into an equally toxic anemonin.

The chemical composition of biologically active substances of the plant is not well studied. Buttercup anemone is one of the most common forest ephemeroids. Contains the toxic substance protoanemonin, saponins, tannins, resins, ascorbic acid. Fresh leaves contain the substance ranunculin, which, when dried, breaks down into protoanemonin and glucose. Protoamonin is a mitotic poison, an oily liquid with a pungent odor and taste; by the chemical structure, it belongs to lactones. It polymerizes to form anemonin – a crystalline substance, sparingly soluble in water and well – in organic solvents. All these active ingredients form the basis of the chemical composition of buttercup anemone [12]. Oils lipids with specific fatty acid composition are accumulated in seeds [13]. *A. ranunculoides* aerial part contain saponins (ranunculin). Anemonin and ranunculin, the potent anti-inflammatory and anticancer compounds, are abundant in tribes *Ranunculeae* and *Anemoneae* [1].

Another important group of biologically active compounds (BAS) in *A. ranunculoides* is triterpene glycosides. Six glycosides, anemonosides A, B, C, D, E, and F in the order of increasing polarity gave an aglycone which was identified as an oleanolic acid (by chromatography, IR spectroscopy, and a mixed melting point). Data on the composition of *A. ranunculoides* flavonoids and hydroxycinnamic acids (HCAs), as well as for other species of *Anemone* genus, are not available in the literature. Because these groups of compounds are quite specific for anemone, their detailed study seems to be relevant (figure 1).

Figure 1. ***A. ranunculoides*** **at blooming stage**

MATERIALS AND METHODS

Standards and reagents

For high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometric detection (HPLC–DAD–ESI-MS) analysis Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 liquid chromatograph (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) interfaced with a TSQ Endura triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) was used. UHPLC system was equipped with a degasser, triple pump, and column compartments with autosampler and a PDA detector controlled by Chromeleon 7.2 Software. Samples were separated on a Waters NovaPak® C18 (150 × 4.6 mm, 4 µm; Waters Corporation, USA) maintained at 25 °C. The following gradient elution program was applied at a flow rate of 0.5 mL/min, where eluent A was 0.1 % (v/v) formic acid in water and eluent B was 0.1 % (v/v) formic acid in acetonitrile: 0–10 min 15–30 % (v/v) B, 10–20 min 30–45 % (v/v) B, 20–30 min 45–60 % (v/v) B, 30–35 min 60–70 % (v/v) B, 35–38 min 70 % (v/v) B, 38–40 min 70–15 % (v/v) B, 40-50 min 15 % (v/v) B. Injection volume was 10 mL.

Analytical wavelengths were 290, 338, 350, 370 nm; UV spectra were recorded between 190 and 700 nm. Ionization was carried out by a heated electrospray in positive (HESI/MS^+) and negative ion mode (HESI/MS^-) in the m/z range from 150 to 1000 Da. Scanning speed

was 1000 Da/sec; quadrupole resolution Q1: 0.7. Parameters of the ionization source were: capillary voltage – 3500 V (positive mode) and 2500 V (negative mode); Sheath gas (nitrogen) flow: 5.6 l/min; auxiliary gas flow: 10.1 l/min; sweep gas flow: 2.7 l/min; ion transfer tube temperature: 350 °C; evaporator temperature: 400 °C. As standard samples, commercially available individual substances were used: rutin (≥94 %, Sigma), kaempferol-3-O-glucoside (≥95 %, PhytoLab GmbH & Co. KG, Germany), apigenin-7-O-glucoside (≥97.0 %, Sigma-Aldrich, USA), isoliquiritin (≥95 %, Shanghai Tauto Biotech Co., China), caftaric acid (≥98 %, Fluka), chlorogenic acid (≥95 %, Sigma-Aldrich, USA), caffeic acid (≥98.0 %, Sigma), trans-ferulic acid (99 %, Aldrich), chicoric acid (≥95 %, Sigma), *p*-coumaric acid (≥98.0 %, Sigma).

Identification of flavonoids and HCAs derivatives based on comparison of retention times, UV- and mass-spectra with those of above-mentioned standards and literature data. Quantification of individual compounds was carried out by external standard calibration method using DAD signals: 370 nm (chalcone glycosides), 350 nm (flavonolglycosides), 338 nm (apigenin derivatives), 330 nm (caffeic, ferulic acids and their derivatives), 310 nm (*p*-coumaric acid and it's derivatives). Rutin, kaempferol-3-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoside, isoliquiritin calibration curves were created at concentration range 0.001–0.100 mg/mL ($R^2 > 0.999$), and HCAs standards – at concentration range 0.0005–0.150 mg/mL ($R^2 > 0.999$). These calibration curves were used for quantitative estimation of similar compounds from appropriate groups mentioned above. Screening assessment makes it possible to make a preliminary quantification without assessing the detector response of each compound.

Plant material and sample preparation

Aerial parts (stems with leaves, flowers) and underground parts (rhizomes with roots) were collected in Moscow, Russia (55° 41' 23.83" N, 37° 48' 1.95" E) during the blooming stage in April 2018. The raw materials were dried for one week at 25 °C. Plant samples were authenticated in the Pharmaceutical Natural Sciences Department (Sechenov University, Russia); voucher specimens were deposited.

0.5–1.0 g of the sample (accurately weighed) was transferred to a 50 ml round bottom flask, 25 ml of 60 % aqueous methanol was added, placed in a boiling water bath under reflux for 1 h. Then the sample was transferred into a 25 ml volumetric flask, brought 60 % aqueous methanol to the mark, centrifuged at 15 000 rpm for 5 minutes.

RESULTS AND DISCUSSION

Flavonoids

Data of chromatographic detection of the main flavonoid compounds of aboveground and underground parts of *A. ranunculoides* are given in table 1 and in figures 2–6. Three flavonoid glycosides found in extracts from roots with rhizomes were identified as chalcone derivatives based on specific band I UV absorption at 365–370 nm and minor band II – at 235–255 nm (small shoulder in UV spectra) and ions with 425, 439, 601 m/z in the mass spectra. Ions with 425, 439 and 601 m/z are presumably correspond to hexoside, glucuronide and hexoside-glucuronide of chalcone aglicon with 263 m/z respectively. These compounds are found exclusively in the underground part. A richer flavonoid composition is characteristic of the *A. ranunculoides* herb (stems and leaves). The ions with 303, 287, 271 m/z along with characteristic UV spectra data found in extracts indicated that the discovered compounds belonged to derivatives of quercetin, kaempferol, and apigenin. In the herb, 9 quercetin glycosides (No. 1–5, 7, 10, 21, 22), 2 kaempferol glycosides (No. 9, 24) and one apigenin (No. 28) were found. Flowers contain 14 quercetin glycosides (No. 1–8, 10, 15, 16, 17, 21, 22), 10 kaempferol glycosides (11, 12, 13, 19, 23, 24, 25, 27, 29, 30), two apigenin glycosides (20, 28) were found to be present. Moreover, compound No. 9 (kaempferol glycoside) is present only in the herb; while 15 compounds are present in flowers that are not found in other parts of the plant (No. 6, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 23, 25, 27, 29, 30).

Table 1. Flavonoids composition and content in the rhizomes with roots (1), leaves (2) and flowers (3) of *A. ranunculoides*

№	Flavonoid	Rt, min (±0.1)	λ_{max}, nm (±2)	m/z		Content, mg/g		
				HESI/MS$^+$	HESI/MS$^-$	1	2	3
1	Quercetin + rhamnose + hexose + glucuronic acid isomer	12.5	255, 270, 350	787 [M + H]$^+$, 641 [M – rha + H]$^+$, 479 [M – rha – hex + H]$^+$, 303 [M – rha – hex – gluA + H]$^+$	785 [M – H]$^-$	–	0.316	0.047
2	Quercetin + rhamnose + hexose + glucuronic acid isomer	12.7	255, 270, 350	787 [M + H]$^+$, 641 [M – rha + H]$^+$, 479 [M – rha – hex + H]$^+$, 303 [M – rha – hex – gluA + H]$^+$	785 [M – H]$^-$, 639 [M – rha – H]$^-$	–	0.570	0.055
3	Quercetin + rhamnose + hexose + glucuronic acid	12.8	255, 270, 355	787 [M + H]$^+$, 641 [M – rha + H]$^+$, 479 [M – rha – hex + H]$^+$, 303 [M – rha – hex – gluA + H]$^+$	785 [M – H]$^-$, 639 [M – rha – H]$^-$	–	2.634	0.426

Continuation of table 1

№	Flavonoid	Rt, min (±0.1)	λ_{max}, nm (±2)	m/z		Content, mg/g		
				HESI/MS$^+$	HESI/MS$^-$	1	2	3
4	Quercetin + rhamnose + 2 hexoses	13.1	255, 270, 350	773 [M + H]$^+$, 627 [M – rha + H]$^+$, 611 [M – hex + H]$^+$, 465 [M – rha – hex + H]$^+$, 303 [M – rha – 2hex + H]$^+$	771 [M – H]$^-$, 625 [M – rha – H]$^-$, 609 [M – hex – H]$^-$	–	3.736	0.958
5	Quercetin + pentose + glucuronic acid + hexose	13.3	350	773 [M + H]$^+$, 641 [M – pent + H]$^+$, 465 [M – pent – gluA + H]$^+$, 303 [M – pent – gluA – hex + H]$^+$	771 [M – H]$^-$, 639 [M – pent – H]$^-$, 463 [M – rha – gluA – H]$^-$	–	0.077	0.136
6	Quercetin + 2 hexoses	13.4	350	627 [M + H]$^+$, 465 [M – 2hex + H]$^+$	625 [M – H]$^-$, 463 [M – 2hex – H]$^-$	–	–	0.113
7	Quercetin + rhamnose + hexose + pentose	13.8	255, 270, 355	743 [M + H]$^+$, 597 [M – rha + H]$^+$, 435 [M – rha – hex + H]$^+$, 303 [M – rha – hex – pent + H]$^+$	741 [M – H]$^-$, 595 [M – rha – H]$^-$	–	7.340	1.442
8	Quercetin + rhamnose + hexose + pentose isomer	14.0	255, 270, 355	743 [M + H]$^+$, 597 [M – rha + H]$^+$, 435 [M – rha – hex + H]$^+$, 303 [M – rha – hex – pent + H]$^+$	741 [M – H]$^-$, 595 [M – rha – H]$^-$	–	–	0.300
9	Kaempferol + rhamnose + 2 hexoses	14.0	265, 345	757 [M + H]$^+$, 611 [M – rha + H]$^+$, 449 [M – rha – hex + H]$^+$, 287 [M – rha – 2hex + H]$^+$	755 [M – H]$^-$, 609 [M – rha – H]$^-$	–	0.277	–
10	Quercetin + hexose + pentose	14.2	255, 270, 350	597 [M + H]$^+$, 435 [M – hex + H]$^+$, 303 [M – hex – pent + H]$^+$	595 [M – H]$^-$, 433 [M – hex – H]$^-$	–	0.495	0.260
11	Kaempferol + rhamnose + 2 hexose isomer	14.7	265, 350	757 [M + H]$^+$, 611 [M – rha + H]$^+$	755 [M – H]$^-$, 593 [M – hex – H]$^-$, 447 [M – hex – rha – H]$^-$	–	–	0.277
12	Kaempferol + 2 hexoses	14.8	265, 340	611 [M + H]$^+$, 449 [M – hex + H]$^+$, 287 [M – 2hex + H]$^+$	609 [M – H]$^-$, 447 [M – hex – H]$^-$	–	–	0.635
13	Kaempferol + 3 hexoses	15.5	345	773 [M + H]$^+$, 611 [M – hex + H]$^+$	771 [M – H]$^-$	–	–	0.263
14	Chalcone glycoside	16.1	280, 310, 370	601 [M + H]$^+$	599 [M – H]$^-$	0.055	–	–
15	Quercetin + 2 rhamnose + hexose	16.4	350	757 [M + H]$^+$, 611 [M – rha + H]$^+$, 449 [M – rha – hex + H]$^+$, 303 [M – 2rha – hex + H]$^+$	755 [M – H]$^-$, 609 [M – rha – H]$^-$	–	–	0.734
16	Quercetin + hexose + rhamnose	16.6	255, 270, 355	611 [M + H]$^+$, 449 [M – hex + H]$^+$, 303 [M – hex – rha + H]$^+$	609 [M – H]$^-$, 463 [M – rha – H]$^-$, 447 [M – hex – H]$^-$	–	–	3.314
17	Quercetin + hexose + rhamnose	16.9	255, 270, 355	611 [M + H]$^+$, 449 [M – hex + H]$^+$, 303 [M – hex – rha + H]$^+$	609 [M – H]$^-$, 447 [M – hex – H]$^-$	–	–	1.487
18	Chalcone glycoside	17.7	215, 370	425 [M + H]$^+$	423 [M – H]$^-$	0.440	–	–
19	Kaempferol + hexose + rhamnose	17.8	265, 345	595 [M + H]$^+$, 433 [M – hex + H]$^+$, 287 [M – hex – rha + H]$^+$	593 [M – H]$^-$, 447 [M – rha – H]$^-$	–	–	0.278
20	Apigenin + 2 hexoses	18.4	265, 335	595 [M + H]$^+$, 433 [M – hex + H]$^+$, 271 [M – 2hex + H]$^+$	593 [M – H]$^-$, 431 [M – hex – H]$^-$	–	–	0.414
21	Quercetin + pentose + hexose	18.8	255, 270, 355	597 [M + H]$^+$, 465 [M – pent + H]$^+$, 303 [M – pent – hex + H]$^+$	595 [M – H]$^-$, 463 [M – pent – H]$^-$	–	0.352	2.613
22	Rutin (quercetin-3-O-rutinoside)	19.9	255, 270, 355	611 [M + H]$^+$, 465 [M – rha + H]$^+$, 303 [M – rut + H]$^+$	609 [M – H]$^-$, 463 [M – rha – H]$^-$	–	0.506	0.440

End of table 1

№	Flavonoid	Rt, min (±0.1)	λ_{max}, nm (±2)	m/z		Content, mg/g		
				HESI/MS$^+$	HESI/MS$^-$	1	2	3
23	Kaempferol + 2 hexoses + rhamnose	21.2	265, 350	757 [M + H]$^+$	755 [M – H]$^-$, 593 [M – hex – H]$^-$	–	–	0.180
24	Kaempferol-glucuronide	21.5	265, 350	463 [M + H]$^+$, 287 [M – gluA + H]$^+$	461 [M – H]$^-$, 285 [M – gluA – H]$^-$	–	1.765	0.150
25	Kaempferol + rhamnose + hexose	21.7	265, 350	595 [M + H]$^+$	593 [M – H]$^-$	–	–	0.086
26	Chalcone glycoside*	22.3	220, 365	439 [M + H]$^+$	437 [M – H]$^-$	0.517	–	–
27	Astragalin (Kaempferol 3-O-glucoside)	23.2	265, 350	449 [M + H]$^+$, 287 [M – glu + H]$^+$	447 [M – H]$^-$, 285 [M – glu – H]$^-$	–	–	0.357
28	Apigenin-7-glucuronide	24.2	265, 335	447 [M + H]$^+$, 271 [M – gluA + H]$^+$	445 [M – H]$^-$, 269 [M – gluA – H]$^-$	–	0.703	0.191
29	Kaempferol-*p*-coumaroylhexoside	29.3	265, 315	595 [M + H]$^+$, 287 [M – *p*-coumhex + H]$^-$	593 [M – H]$^-$, 285 [M – *p*-coumhex – H]$^-$	–	–	1.338
30	Kaempferol-*p*-coumaroylhexoside isomer	30.2	265, 315	595 [M + H]$^+$, 287 [M – *p*-coumhex + H]$^-$	593 [M – H]$^-$, 285 [M – *p*-coumhex – H]$^-$	–	–	0.343
Total flavonoid content						**1.012**	**18.771**	**16.836**

Note. * Identification and quantification of the compound with a retention time of 22.3 min is not entirely clear; another interpretation is possible (chalcone and HCA).

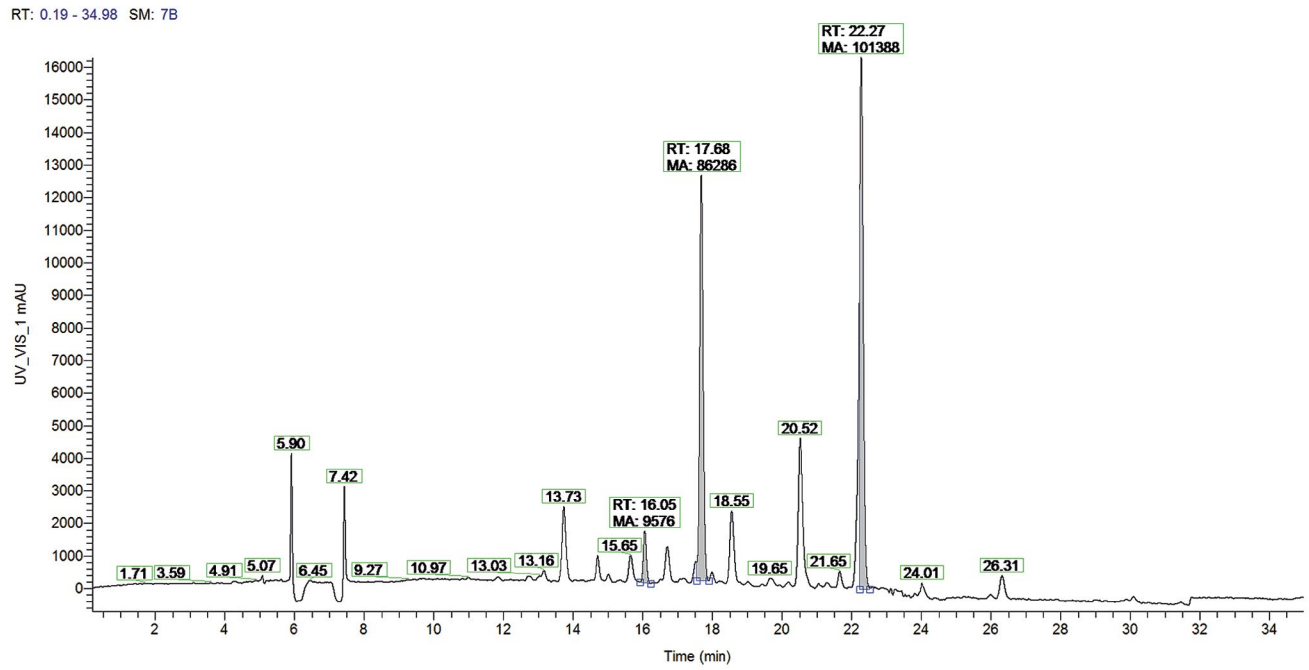


Figure 2. Chromatogram of *A. ranunculoides* rhizomes with roots extract at λ = 370 nm (chalcone glycosides)

Hydroxycinnamic acids (HCA)

The data of chromatographic detection of the main HCA of the aerial and underground parts of *A. ranunculoides* are shown in table 2 and in figures 7–8. The herb is the richest in HCAs, their content in the grass is the highest compared to other parts of the plant. 11 compounds were reliably identified (No. 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19, 24, 25, 28, 29, 15 HCA were not identified), major ones are chlorogenic and caffeoyltartaric acids. The flowers contain almost three times less HCAs, 5 compounds were identified (No. 10, 12, 16, 19, 24, 29 HCAs were not identified), chlorogenic acid is a major one. In roots, slightly more compounds were identified than in flowers – 8 compounds (No. 6, 10, 12, 16, 17, 20, 26, 27; 23 HCAs were not identified), their content is almost on the same level as in flowers; feruloyl tartaric acid is predominant.

Table 2. **HCA derivatives composition and content in the rhizomes with roots (1), leaves (2) and flowers (3) of *A. ranunculoides***

№	Hydroxycinnamic acid derivative	Rt, min (±0.1)	λ_{max}, nm (±2)	HESI-MS$^-$	Content, mg/g		
					1	2	3
1	NI*	11.0	300sh, 330	–	0.02	–	–
2	NI	11.1	290sh, 325	–	–	0.09	0.09
3	NI	11.9	300sh, 330	–	0.02	–	–
4	NI	12.8	305sh, 330	311	0.02	–	–
5	NI	13.1	305sh, 330	–	0.04	–	–
6	*trans*-Caftaric acid	13.8	300sh, 330	311 [M – H]$^-$, 179 caffeic acid [M – H]$^-$, 149 tartaric acid [M – H]$^-$	0.32	–	–
7	NI	14.3	290sh, 325	–	–	0.06	–
8	NI	14.5	290sh, 325	–	–	0.02	–
9	NI	14.6	290sh, 320	–	–	0.05	–
10	Chlorogenic acid	15.0	296sh, 325	353 [M – H]$^-$, 191 quinic acid [M – H]$^-$	0.05	8.68	2.62
11	Cryptochlorogenic acid	15.3	296sh, 325	353, 191 quinic acid [M – H]$^-$, 179 caffeic acid [M – H]$^-$	–	0.67	–
12	*cis*-Caftaric acid (possibly)	15.6	300sh, 330	311 [M – H]$^-$, 179 caffeic acid [M – H]$^-$, 149 tartaric acid [M – H]$^-$	0.14	2.69	0.25
13	*p*-coumaric acid derivative	16.6	295sh, 315	163 *p*-coumaric acid [M – H]$^-$	–	0.12	–
14	NI	16.7	300sh, 325	–	0.21	–	–
15	Caffeoylquinic acid	17.1	296sh, 320	353 [M – H]$^-$	–	0.49	–
16	Ferulic acid derivative	17.5	300sh, 330	193	0.17	–	0.15
17	Caffeoylquinic acid	18.0	305sh, 325	353 [M – H]$^-$, 191 quinic acid [M – H]$^-$	0.05	–	–
18	*p*-coumaroylquinic acid	18.0	295sh, 315	337 [M – H]$^-$, 191 quinic acid [M – H]$^-$	–	0.41	–
19	Caffeic acid	18.3	295sh, 325	179 [M – H]$^-$	–	0.25	0.06
20	Ferulic acid derivative	18.6	300sh, 330	193	0.65	–	–
21	NI	18.8	295sh, 320	–	–	0.41	–
22	NI	19.0	296sh, 325	–	–	0.40	–
23	NI	19.7	306sh, 325	–	0.05	–	–
24	Feruloyltartaric acid	19.7	296sh, 325	325 [M – H]$^-$, 193 Ferulic acid [M – H]$^-$	–	0.62	0.25
25	*p*-coumaric acid derivative	20.3	295sh, 310	162 *p*-coumaric acid [M – H]$^-$	–	0.05	–
26	Feruloyltartaric acid isomer	20.5	302sh, 330	324 [M – H]$^-$, 193 ferulic acid [M – H]$^-$	1.18	–	–
27	Chicoric acid	22.2	302sh, 330	473 [M – H]$^-$, 311 [M – dehydrocaffeic acid]$^-$, 293 [M – caffeic acid]$^-$, 179 caffeic acid [M – H]$^-$, 149 tartaric acid [M – H]$^-$	0.34	–	–
28	*p*-coumaric acid	22.5	290sh, 310	163 [M – H]$^-$	–	0.08	–
29	*p*-coumaric acid derivative	22.6	292sh, 315	163 *p*-coumaric acid [M – H]$^-$	–	0.05	–
30	NI	23.2	308sh, 330	–	–	–	0.17
31	NI	23.4	300sh, 320	–	–	0.05	–
32	NI	23.6	296sh, 325	–	–	0.32	0.29
33	NI	24.3	307sh, 325	–	–	–	0.17
34	NI	26.0	300sh, 325	–	–	0.06	–
35	NI	26.4	306sh, 335	–	0.14	–	–
36	NI	26.5	300sh, 325	–	–	0.06	–
37	NI	28.5	300sh, 325	–	–	0.05	–
38	NI	28.9	300sh, 320	–	–	0.12	–
Total hydroxycinnamic acid derivative content					**3.39**	**15.80**	**4.06**

Note. * NI – not identified hydroxycinnamic acid derivative.

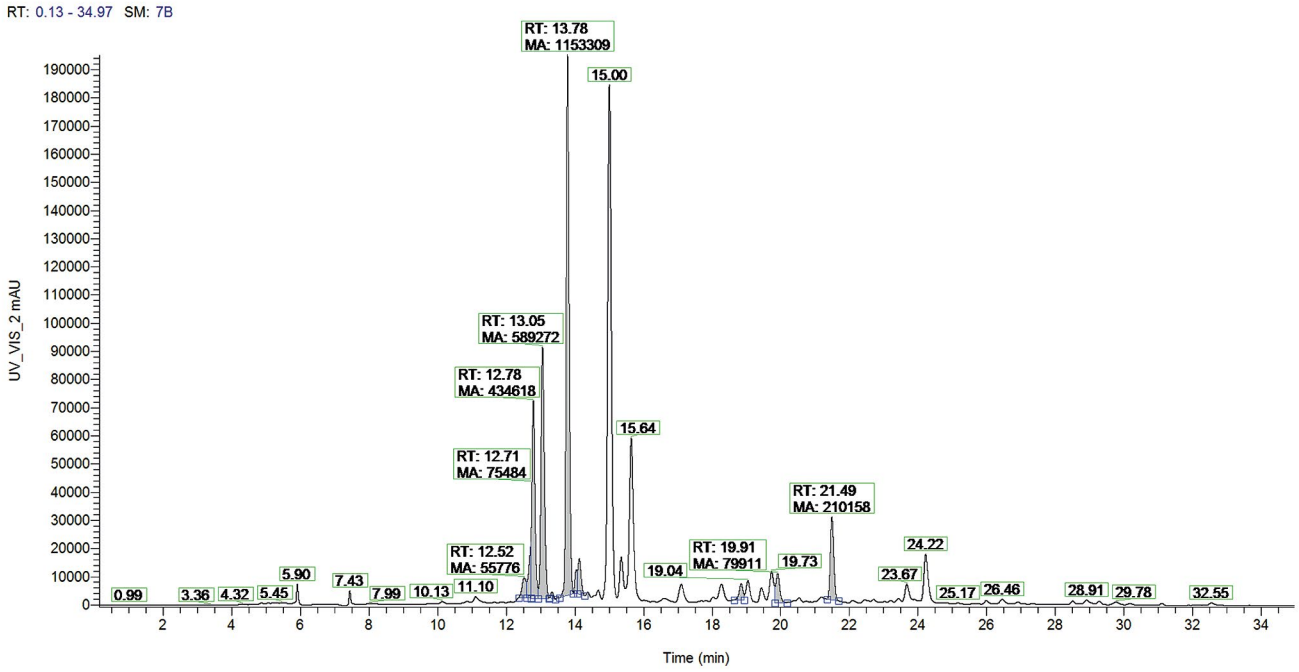


Figure 3. **Chromatogram of *A. ranunculoides* leaves extract at λ = 350 nm (flavonol glycosides).**

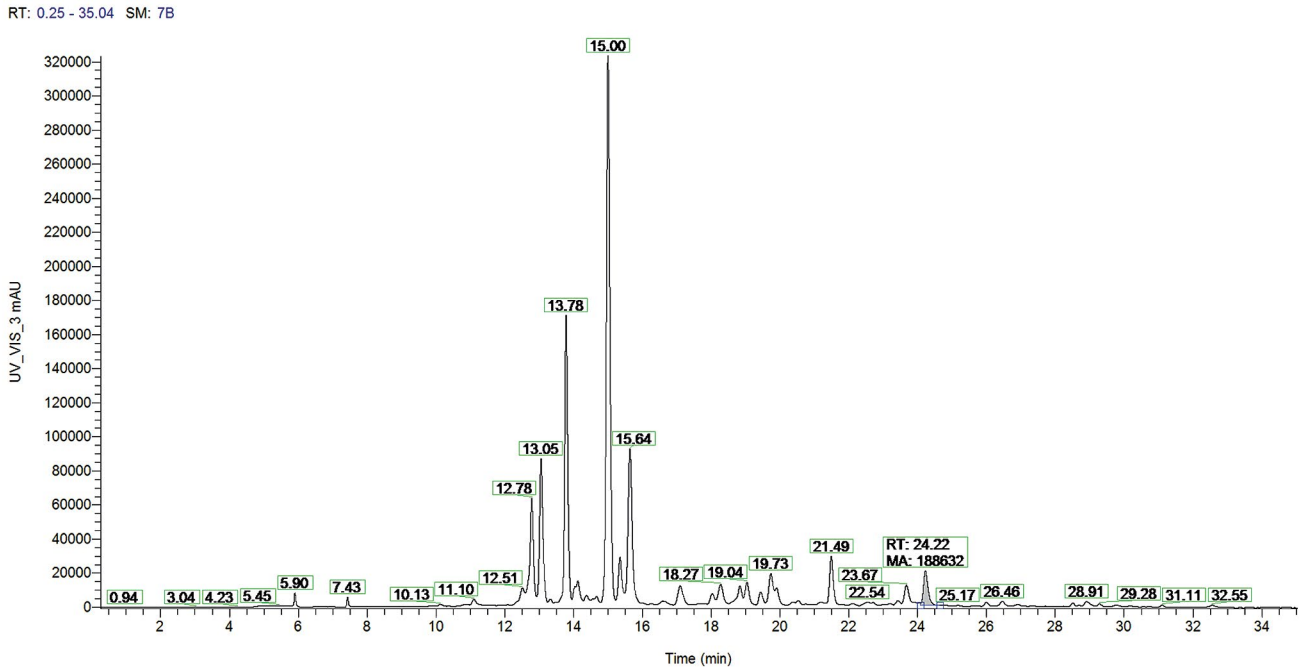


Figure 4. **Chromatogram of *A. ranunculoides* leaves extract at λ = 338 nm (apigenin-7-glucuronide).**

CONCLUSION

A methanol extracts of the aerial and underground parts of *A. ranunculoides* growing in Moscow were studied by HPLC with UV- and mass selective detection. Characteristic chromatographic profiles of flavonoids and HCAs were collected at analytical wavelengths of 215–370 and 310, 330 nm, respectively. In the group of flavonoids, major components were identified as quercetin glycosides in herb and flowers, chalcone glycosides in rhizomes with roots. In the HCA group, feruloyltartaric acid was presented in rhizomes with roots in a great amount, chlorogenic acid was predominant in the aerial part.

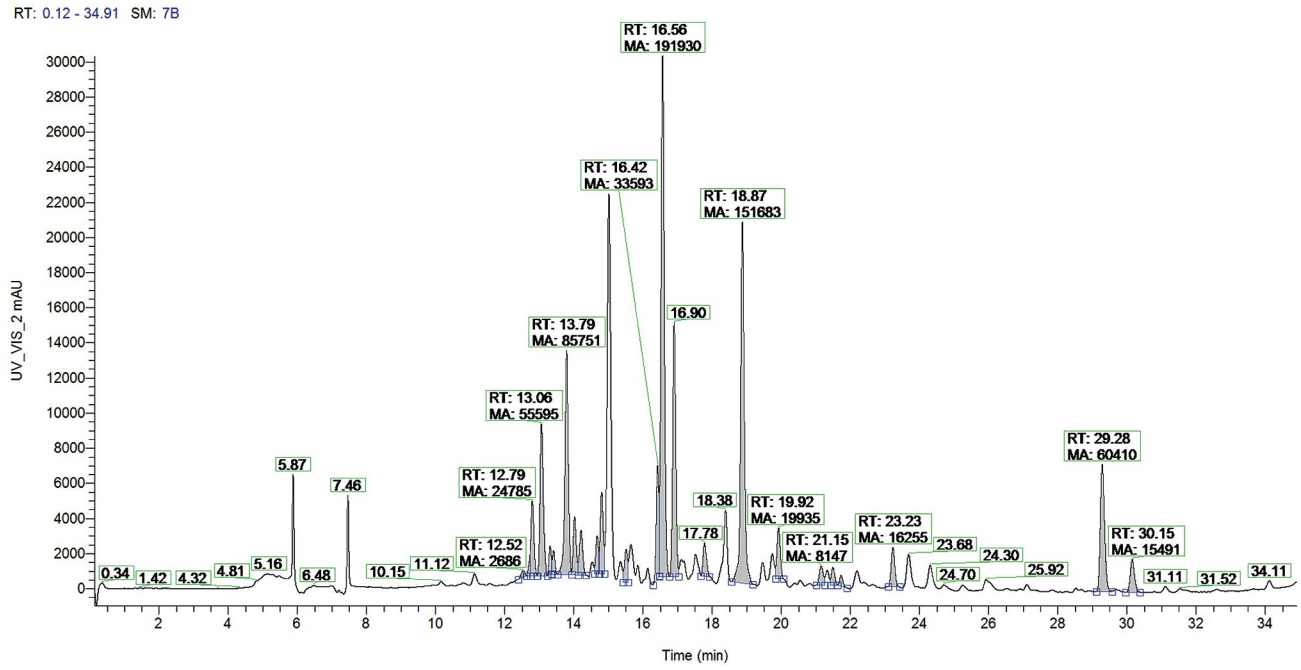


Figure 5. **Chromatogram of *A. ranunculoides* flowers extract at λ = 350 nm (flavonol glycosides).**

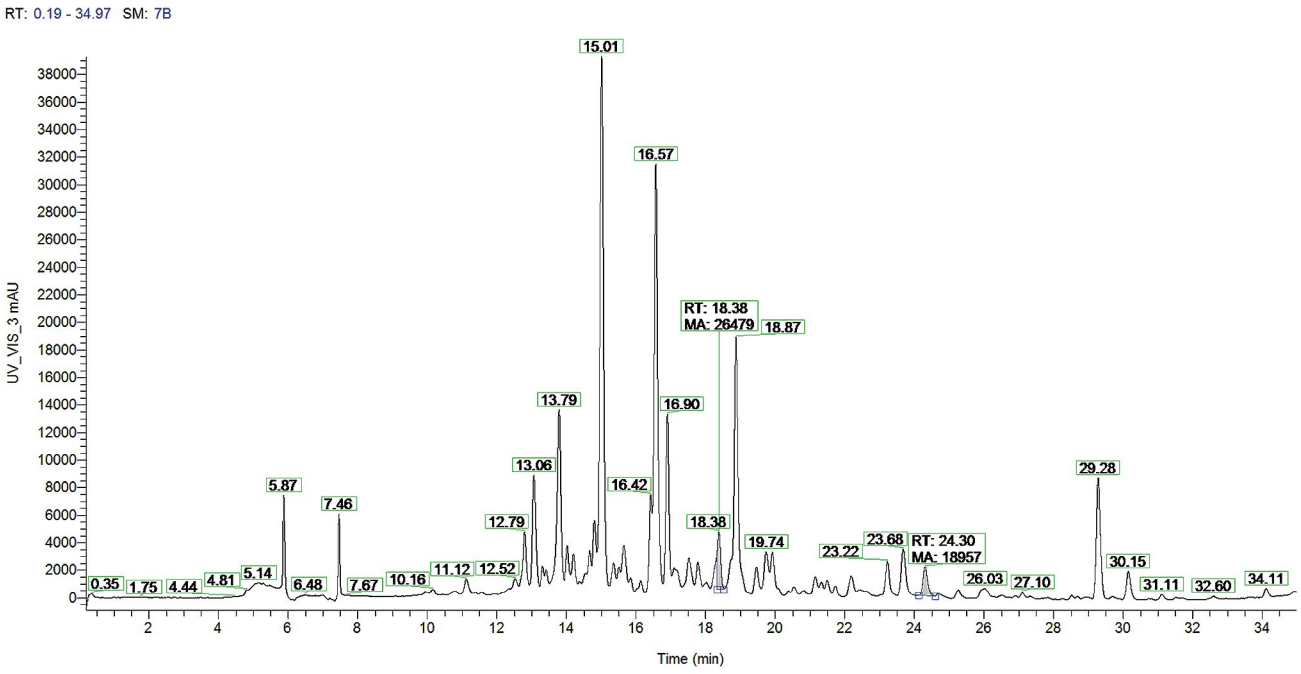
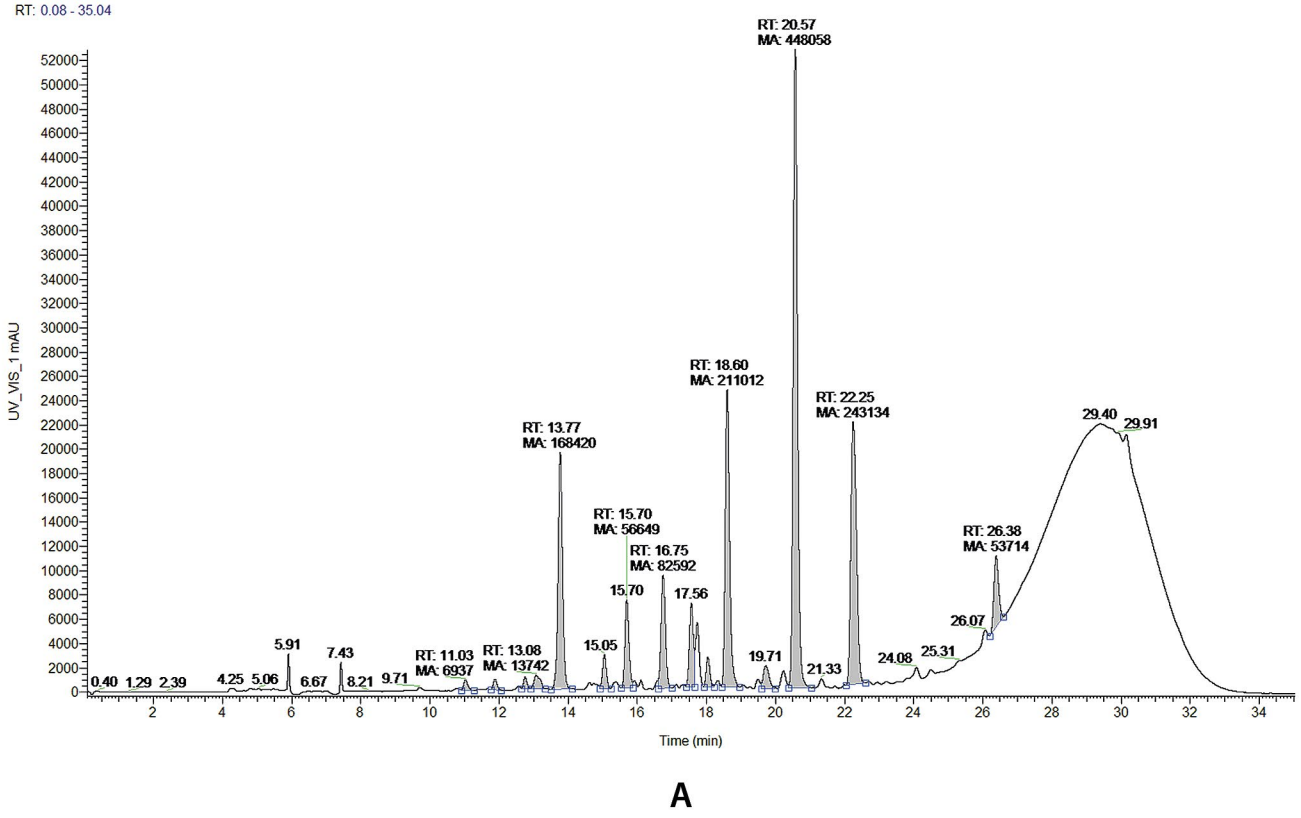


Figure 6. **Chromatogram of *A. ranunculoides* flowers extract at λ = 338 nm (apigenin derivatives).**

The identified chromatographic profiles of polyphenolic complex can be used to identify the medicinal plant . The total content of flavonoids and HCAs in the methanol extracts was approximately 60 mg/g on dry weight basis, which indicates a significant accumulation of phenolics during the flowering period of *A. ranunculoides*.

REFERENCES

1. Hao D. C., Gu X., Xiao P. *Anemone* medicinal plants: ethnopharmacology, phytochemistry and biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2017;7(2):146–158. DOI: 10.1016/j.apsb.2016.12.001.
2. Luferov A. N. Genus *Anemone* L. – windflower. In: Reshetnikova N. M., editor. Flora of the Lower Volga region. T. 2: Dicotyledonous dicotyledonous flowering plants. Part 1. Salicaceae – Droseraceae. Moscow: KMK Scientific Publishing Association. 2018. P. 318–320. (In Russ.)



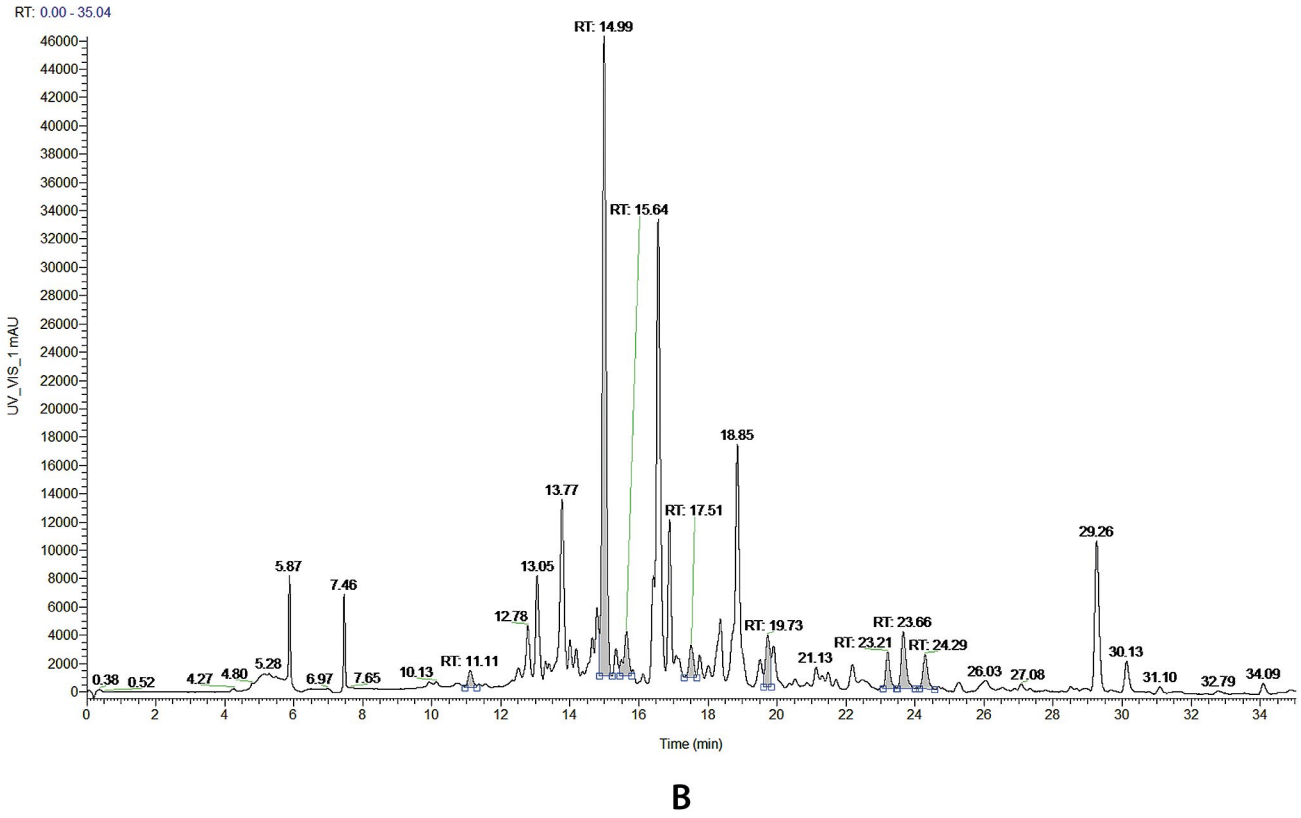


Figure 7. **Chromatogram of *A. ranunculoides* rhizomes with roots extract (A) and flowers extract (B) at λ = 330 nm (hydroxycinnamic acid derivatives)**

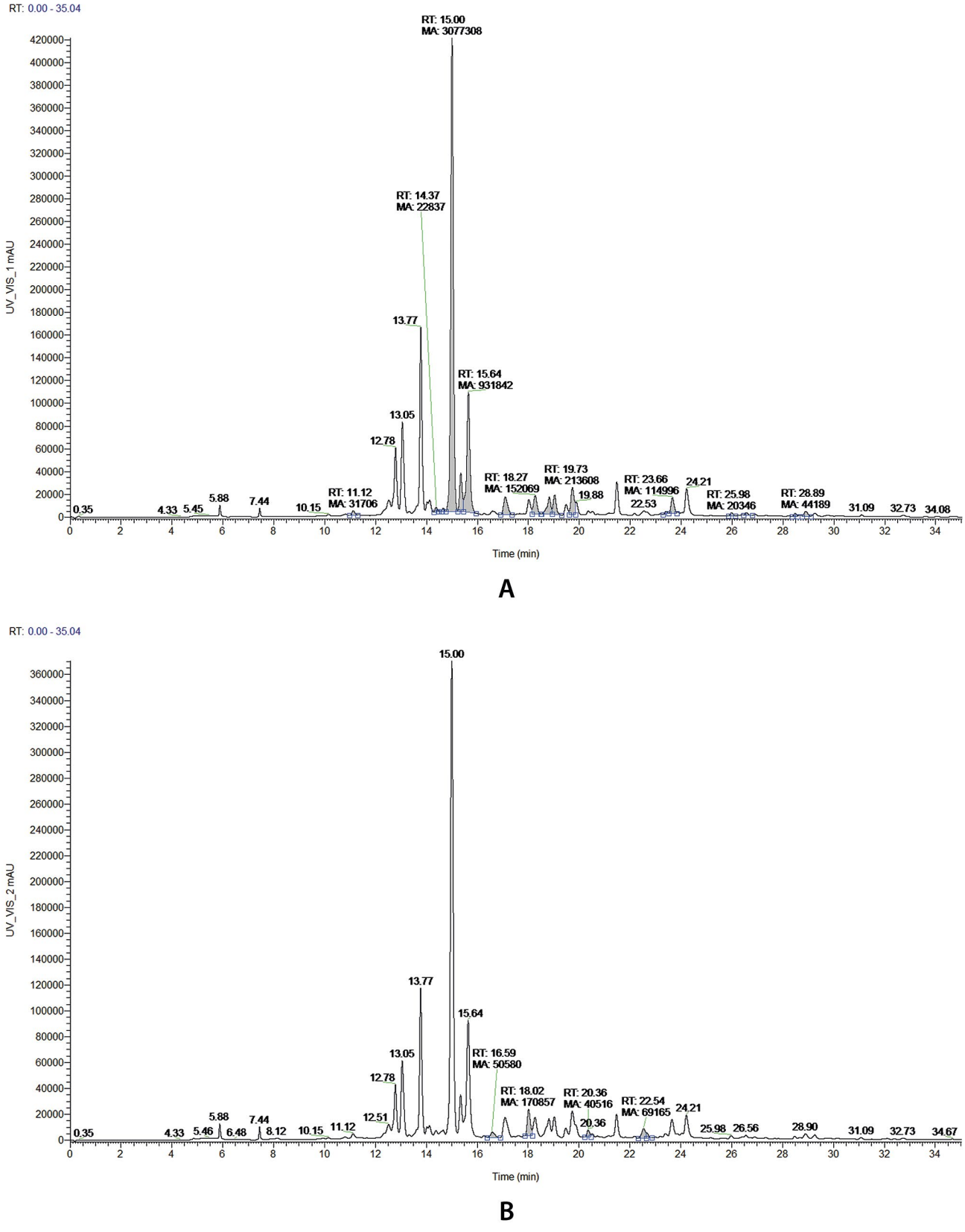


Figure 8. **Chromatogram of *A. ranunculoides* leaves extract at λ = 330 nm (A), 310 nm (B) (hydroxycinnamic acid derivatives)**

3. Hao D. C. Ranunculales medicinal plants: biodiversity, chemodiversity and pharmacotherapy. New York: Academic Press. 2018. DOI: 10.1016/c2017-0-01185-0.
4. Rajput P., Agnihotri P. An overview of the genus *Anemone* L. (Ranunculaceae) in India. *Plant Science Today*. 2020;7(2):136–141. DOI: 10.14719/pst.2020.7.2.657.
5. Kricsfalusy V. V. Taxonomy and phylogeny of *Anemone patens* L. sensu lato (Ranunculaceae): A critical review. *Thaiszia – Journal of Botany*. 2015;25(2):153–164.
6. Pupuleku B., Gjeta E., Kapidani G. Data on the palynomorphological features of four plants of *Anemone* genus, in Elbasan region. *International Journal of Ecosystems and Ecology Science* (IJEES). 2021;11:159–164. DOI: 10.31407/ijees11.122.
7. Dimitrova V., Tashev A. Medical plants on the territory of Petrohan Training and Experimental Forest Range, Bulgaria. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2019;84(1):37–46.
8. Malik J., Tauchen J., Landa P.,Kutil Z., Marsik P., Kloucek P., Havlik J., Kokoska L. In vitro antiinflammatory and antioxidant potential of root extracts from Ranunculaceae species. *South African Journal of Botany*. 2017;109:128–137. DOI: 10.1016/j.sajb.2016.12.008.
9. Swanepoel B., Venables L., Olaru O. T., Nitulescu G. M., van de Venter M. In Vitro Anti-proliferative Activity and Mechanism of Action of *Anemone nemorosa*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1217. DOI: 10.3390/ijms20051217.
10. Ivoilov A. V. Graceful daughters of the winds. *Mordovian Nature Reserve*. 2016;11(11):7–9. (In Russ.)
11. Bradford T. L. Index to Homoeopathic Provings. B. Jain Publishers. 2000.
12. Wink M. Mode of action and toxicology of plant toxins and poisonous plants. *Julius-Kühn-Archiv*. 2010;(421):93.
13. Jeon J. Y., Han Y., Kim Y.-W., Lee Y.-W., Hong S., Hwang I. T. Feasibility of unsaturated fatty acid feedstocks as green alternatives in bio-oil refinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2019;13:690–722. DOI: 10.1002/bbb.1979.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.322

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1714

Check for updates

CC BY 4.0

Растровая электронная микроскопия в анализе растительного сырья девичьего винограда (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.)

Ф. Д. Евсиков, А. А. Гудкова✉, А. И. Сливкин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»). 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Гудкова Алевтина Алексеевна. **E-mail:** al.f84@mail.ru

ORCID: Ф. Д. Евсиков – https://orcid.org/0000-0003-3280-804X; А. А. Гудкова – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953; А. И. Сливкин – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354.

Статья поступила: 04.01.2024 **Статья принята в печать:** 19.03.2024 **Статья опубликована:** 22.03.2024

Резюме

Введение. Виноград девичий пятилисточковый (виноград девичий, виноград виргийский, партеноциссус пятилисточковый, virgin grape, *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.) на настоящий момент используется преимущественно для декоративных целей, но также начинает привлекать ученых разных стран в качестве перспективного источника таких важных соединений, как антоцианы, флавоноиды, органические кислоты, макро- и микроэлементы. Для внедрения растения в медицинскую практику одним из первых шагов является необходимость разработки нормативной документации, позволяющей проводить оценку качества и стандартизацию растительного сырья, и первым этапом данного процесса становится оценка характеристик подлинности объекта.

Цель. Установление морфологических особенностей листа и черешка винограда девичьего пятилисточкового (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.).

Материалы и методы. Объектом исследования были выбраны развитые листья винограда девичьего, заготовленные в Воронежской области летом 2022 года и высушенные в тени. Для проведения эксперимента использовали электронный микроскоп JSM-6510LV, анализ проводили после напыления на образец тонкой пленки золота.

Результаты и обсуждение. Впервые были выявлены главные морфологические особенности листовой пластинки винограда девичьего, установлены различия в морфологической картине верхней и нижней стороны листа, выявлены особенности строения поверхности черешка. С помощью микрорентгеноструктурного анализа выявлено, что в листьях и черешке винограда девичьего в большом количестве присутствуют кальций и калий. В наименьшем количестве из изученных элементов в объекте исследования содержится магний. Показано, что в листьях присутствует незначительное количество хлора, а в состав клеточного содержимого черешка входит небольшое количество натрия.

Заключение. Впервые проведено исследование морфологии поверхности листовой пластинки и черешка винограда девичьего пятилисточкового методом растровой электронной микроскопии. Выявлены и визуализированы основные диагностические особенности растительного сырья. Микрорентгеноструктурный анализ позволил установить состав элементов листовой пластинки и черешка винограда девичьего и выявить способность концентрирования кальция, калия, фосфора.

Ключевые слова: девичий виноград пятилисточковый, *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch., растровая электронная микроскопия, морфологические признаки, рентгеноструктурный анализ

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

Вклад авторов. Ф. Д. Евсиковым проводилась заготовка растительного сырья и выполнялась экспериментальная часть, касающаяся оценки идентификационных особенностей винограда девичьего методом растровой электронной микроскопии. А. А. Гудкова и А. И. Сливкин разработали план исследования и участвовали в обработке полученных данных. А. А. Гудкова участвовала в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Евсиков Ф. Д., Гудкова А. А., Сливкин А. И. Растровая электронная микроскопия в анализе растительного сырья девичьего винограда (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):118–124. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1714

Raster electron microscopy in the analysis of plant raw materials of virgin grapes (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.)

Fedor D. Evsikov, Alevtina A. Gudkova✉, Alexey I. Slivkin

Voronezh State University. 1, Universitetskaya Square, Voronezh, 394018, Russia

✉ **Corresponding author:** Alevtina A. Gudkova. **E-mail:** al.f84@mail.ru

ORCID: Fedor D. Evsikov – https://orcid.org/0000-0003-3280-804X; Alevtina A. Gudkova – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953; Alexey I. Slivkin – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354.

Received: 04.01.2024 **Accepted:** 19.03.2024 **Published:** 22.03.2024

© Евсиков Ф. Д., Гудкова А. А., Сливкин А. И., 2024
© Evsikov F. D., Gudkova A. A., Slivkin A. I., 2024

Abstract
Introduction. Virgin grape (maiden grape, Virginia grape, virgin grape, *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.) is currently used primarily for decorative purposes, but is also beginning to attract scientists from different countries as a promising source of important compounds such as anthocyanins, flavonoids, organic acids, macro- and microelements. To introduce a plant into medical practice, one of the first steps is the need to develop regulatory documentation that allows for quality assessment and standardization of plant materials, and the first stage of this process is the assessment of the characteristics of the authenticity of the object.
Aim. Establish the morphological characteristics of the leaf and petiole of the virgin grape (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.).
Materials and methods. The object of the study was developed leaves of the virgin grape, harvested in the Voronezh region in the summer of 2022 and dried in the shade. To carry out the experiment, a JSM-6510LV electron microscope was used; the analysis was carried out after sputtering a thin film of gold onto the sample.
Results and discussion. For the first time, the main structural features of various morphological features of the leaf blade of the virgin grape were identified, differences in the morphological picture of the upper and lower sides of the leaf were established, and structural features of the surface of the petiole were identified. Using micro-X-ray analysis, it was revealed that calcium and potassium are present in large quantities in the leaves and petiole of virgin grapes. The least amount of the studied elements in the study object contains magnesium. It has been shown that the leaves contain a small amount of chlorine, and the cellular contents of the petiole include a small amount of sodium.
Conclusion. For the first time, a study of the morphology of the surface of the leaf blade and petiole of the virgin grape was carried out using scanning electron microscopy. The main diagnostic features of plant raw materials have been identified and visualized. Micro-X-ray structural analysis made it possible to establish the composition of the elements of the leaf blade and petiole of virgin grapes and revealed the ability to concentrate calcium, potassium, and phosphorus.

Keywords: virgin grape, *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch., scanning electron microscopy, morphological characteristics, X-ray analysis

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

Contribution of the authors. Fedor D. Evsikov the preparation of plant raw materials was carried out and the experimental part was carried out concerning the assessment of the identification characteristics of virgin grapes using scanning electron microscopy. Alevtina A. Gudkova and Alexey I. Slivkin developed the study plan and participated in processing the obtained data. Alevtina A. Gudkova participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Evsikov F. D., Gudkova A. A., Slivkin A. I. Raster electron microscopy in the analysis of plant raw materials of virgin grapes (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.). *Drug development & registration*. 2024;13(2):118–124. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1714

ВВЕДЕНИЕ

Семейство виноградовых (*Vitaceae*) насчитывает 13 родов, произрастающих преимущественно в тропиках и используемых в качестве цветковых и декоративных растений [1, 2]. На территории Российской Федерации наиболее известны представители родов *Vitis* L. (виноград культурный) и *Parthenocissus* Planch. (виноград девичий). Виноград культурный нашел применение в пищевой и медицинской практике, и, помимо плодов, большой интерес у ученых вызывают листья винограда культурного, являющиеся источником таких важных соединений, как ресвератрол, виниферин и др., а также соединений кальция, калия и магния [3, 4]. Виноград девичий (виноград девичий, виноград виргийский, партеноциссус пятилисточковый, virgin grape, *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.) на настоящий момент используется преимущественно для декоративных целей [5, 6], но также начинает привлекать ученых разных стран в качестве перспективного источника аналогичных фенольных соединений и внедрения в медицинскую практику [7–12]. Для этого необходима нормативная документация, позволяющая проводить оценку качества и стандартизацию растительного сырья, и первым этапом данного процесса выступает оценка характеристик подлинности объекта.

Одним из перспективных методов изучения диагностических признаков растительного сырья является растровая электронная микроскопия (РЭМ), позволяющая провести изучение структуры поверхности образца. Преимуществами данного метода являются быстрота проведения анализа, отсутствие специфической пробоподготовки, получение изображений с высоким (до 0,4 нанометра) пространственным разрешением в широком диапазоне увеличений [13–17].

Целью исследования являлось установление морфологических особенностей листа и черешка винограда девичьего пятилисточкового (*Parthenocíssus quinquefolia* (L.) Planch.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве изучаемого объекта выступали винограда девичьего листья высушенные, заготовленные с черешком в летний период от дикорастущего растения на территории Воронежской области в 2022 году.

Предварительно перед проведением исследования образцы листа винограда девичьего как с верхней, так и с нижней стороны, а также черешки подвергались предварительному напылению тонкой металлической пленки золота на установке магнетронного типа для обеспечения проводимости. Далее в работе использовали электронный микроскоп JSM-6510LV[1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе проведения анализа были получены высококачественные снимки поверхности высушенной листовой пластины дикого винограда с нижней и верхней стороны вместе с частью черешка, позволяющие достоверно установить морфологические особенности объекта исследования.

Клетки эпидермиса нижней стороны листа винограда девичьего сильно извилистые. Главная жилка и жилки первого и второго порядка выделяются на нижней стороне листа, клетки эпидермиса на жилках – с сильно утолщенными стенками (рисунок 1 А). Устьица аномоцитного типа многочисленные, расположены преимущественно на нижней стороне листа, продолговато-эллиптической формы, залегают в одной плоскости с эпидермисом или слегка приподняты над ним (рисунок 1 Б). Многочисленные простые трихомы встречаются по крупным жилкам листа (наибольшее количество по центральной жилке) как сверху, так и снизу листа, а также по краю листа, где они располагаются в несколько рядов (2–3 ряда). Трихомы нескольких типов строения: многоклеточные волоски (2–7 клеток) имеют выраженные утолщения клеточных стенок, которые наиболее отчетливо заметны в местах сочленения клеток, и вытянутые одноклеточные волоски. Трихомы, расположенные по краю листа, одно- или двуклеточные, конусовидной формы, с тупозаостренной верхушкой. Поверхность всех трихом имеет грубобородавчатую структуру (рисунок 1 А, Е). Установлено различие в строении трихом в зависимости от их топографии. Волоски снизу листа более длинные и имеют меньшую частоту встречаемости, чем волоски верхней стороны, которые, в свою очередь, более многочисленны и образуют скопления на главной жилке и жилках первого порядка, особенно в нижней части листа (рисунок 1 А–Е).

Клетки эпидермиса на верхней стороне листа крупные. Общая морфологическая картина верхнего эпидермиса имеет ямчатую структуру. Клеточные стенки плотные, с отчетливо заметной складчатостью (рисунок 1 В–Д).

На поверхности черешка визуализируются продольные борозды, представленные вытянутыми клетками эпидермиса, встречаются редкие устьица аномоцитного типа. Трихомы редкие, простые, как одноклеточные, так и многоклеточные. Клеточные стенки трихом уплотненные, иногда загнутые, поверхность грубобородавчатая (рисунок 2 А, Б).

Кроме возможности оценки морфологических особенностей, РЭМ дает возможность первичного скрининга качественного состава и количественного содержания некоторых элементов в конкретной точке объекта [14, 18, 19]. Результаты приведены в таблице 1 и на рисунке 3.

Таблица 1. Состав элементов листа и черешка винограда девичьего

Table 1. Composition of leaf and petiole elements of *Parthenocíssus quinquefolia*

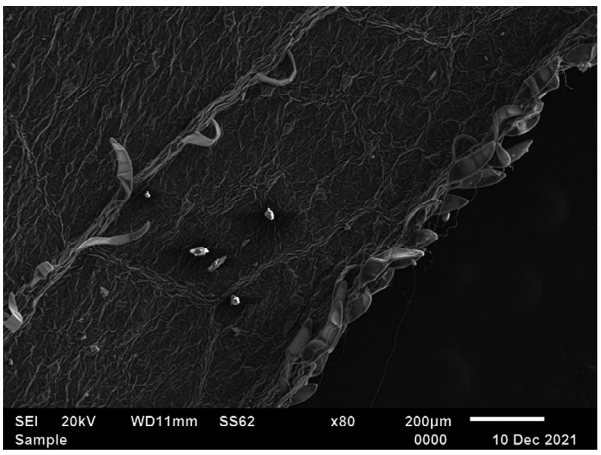
Элемент Element	Содержание элементов, % quantitative content of elements, %			
	Листовая пластинка Leaf blade		Черешок листа Leaf petiole	
	Вес Weight	Атом Atom	Вес Weight	Атом Atom
P	17,4	20,2	6,8	8,1
S	7,1	7,9	4,9	5,2
Mg	4,2	6,3	3,9	5,2
K	26,8	24,7	72,7	69,4
Ca	38,7	34,8	11,3	10,6
Cl	5,8	5,9	–	–
Na	–	–	0,9	1,4

Анализируя данные таблицы 1, необходимо отметить, что из всех исследуемых элементов в наибольшем количестве присутствуют калий и кальций. При сравнении элементного состава листовой пластинки и черешка установлено, что калий в черешке обнаружен в количестве, в три раза превышающем его содержание в листовой пластинке. Кальций и фосфор содержатся в листовой пластинке в несколько раз большем количестве, чем в черешке. Кроме того, показано отличие в элементном составе двух морфологических частей растения: для листовой пластинки характерно наличие хлора, а для черешка – натрия.

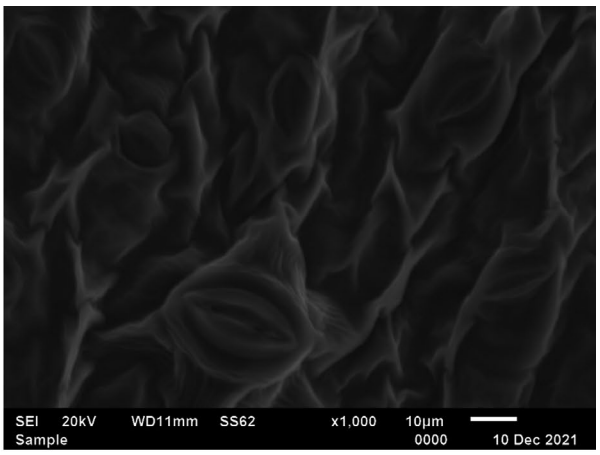
Высокое содержание кальциевых соединений в листовой пластинке и черешке растения можно объяснить наличием многочисленных рафид оксалата кальция, расположенных в идиобластах мезофилла листовой пластинки, а также цепочек из друз оксалата кальция, идущих вдоль проводящих пучков, как в листовой пластинке, так и черешке [20].

Полученные результаты свидетельствуют о ценности винограда девичьего в качестве потенциального и дополнительного источника легко усваиваемых элементов и дают основание для прогнозирования возможности использования данного вида растительного сырья для восполнения дефицита калия, кальция и фосфора.

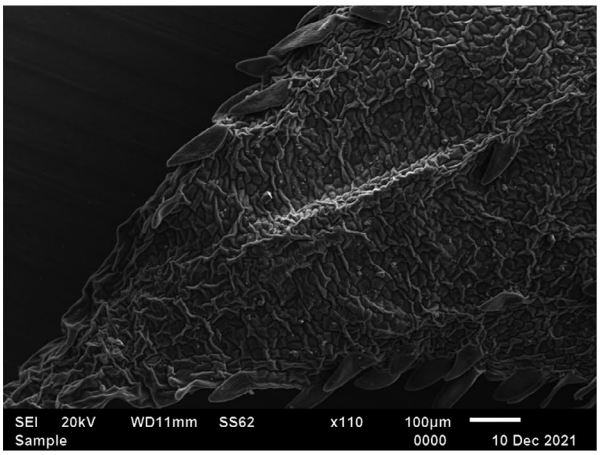
[1] Центр коллективного пользования научным оборудованием. ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет». Доступно по: http://ckp.vsu.ru. Ссылка активна на 04.01.2024.



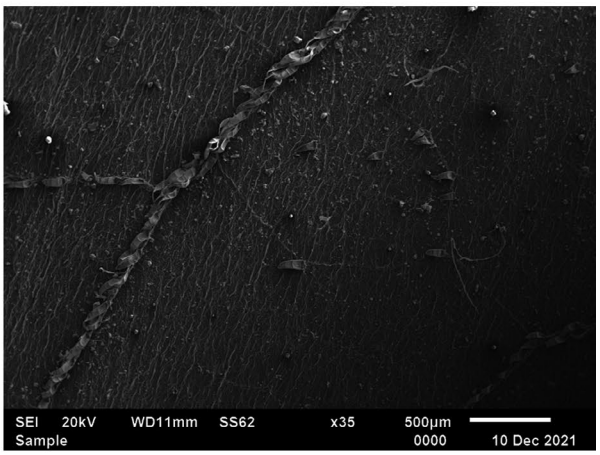
А
A



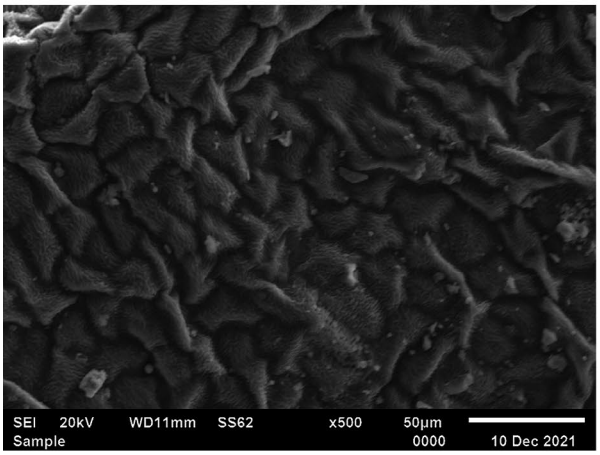
Б
B



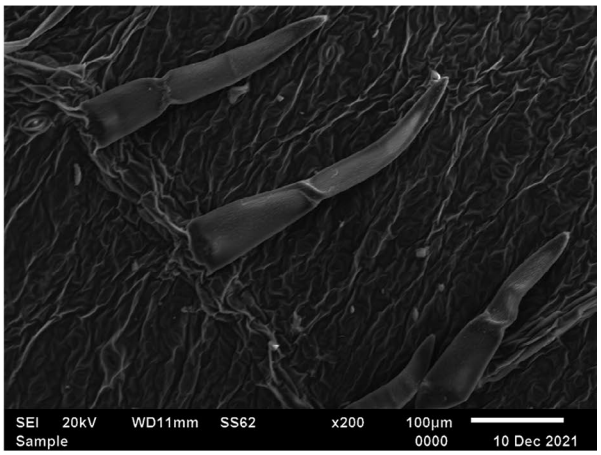
В
C



Г
D



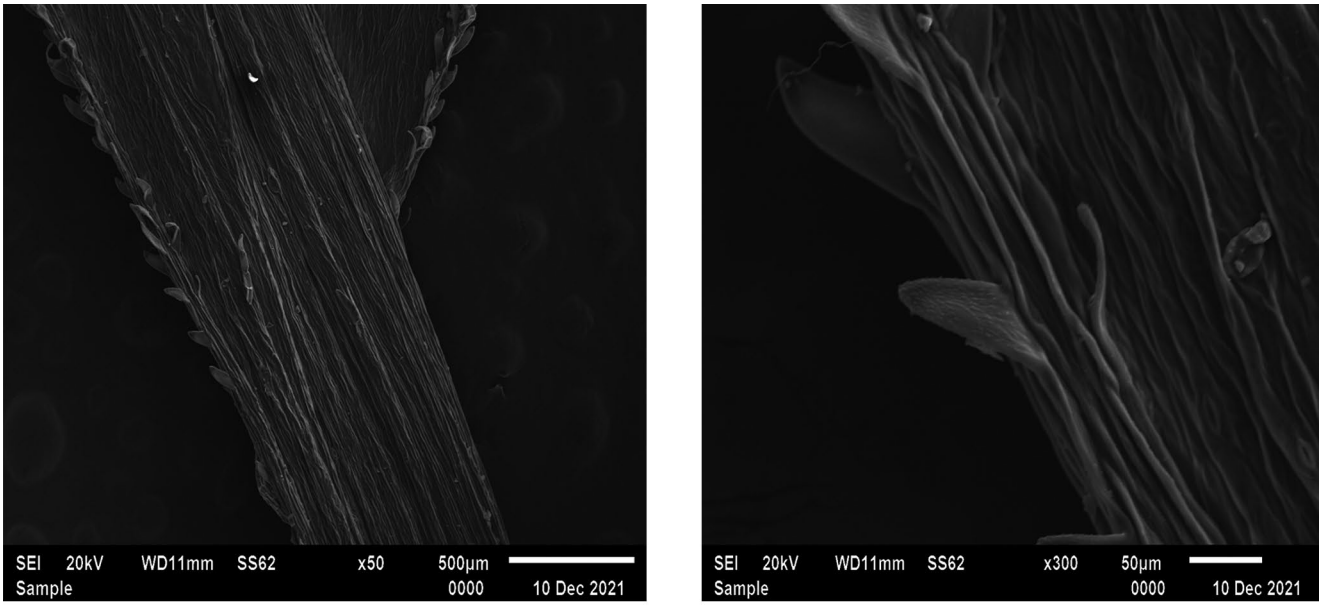
Д
E



Е
F

Рисунок 1. Внешний вид листа винограда девичьего:
А, Б – нижней стороны; В–Д – верхней стороны; Е – трихомы нижней стороны листа

Figure 1. Appearance of a *Parthenocíssus quinquefolia* leaf:
A, B – lower side; C–E – upper side; F – trichomes of the lower side of the leaf

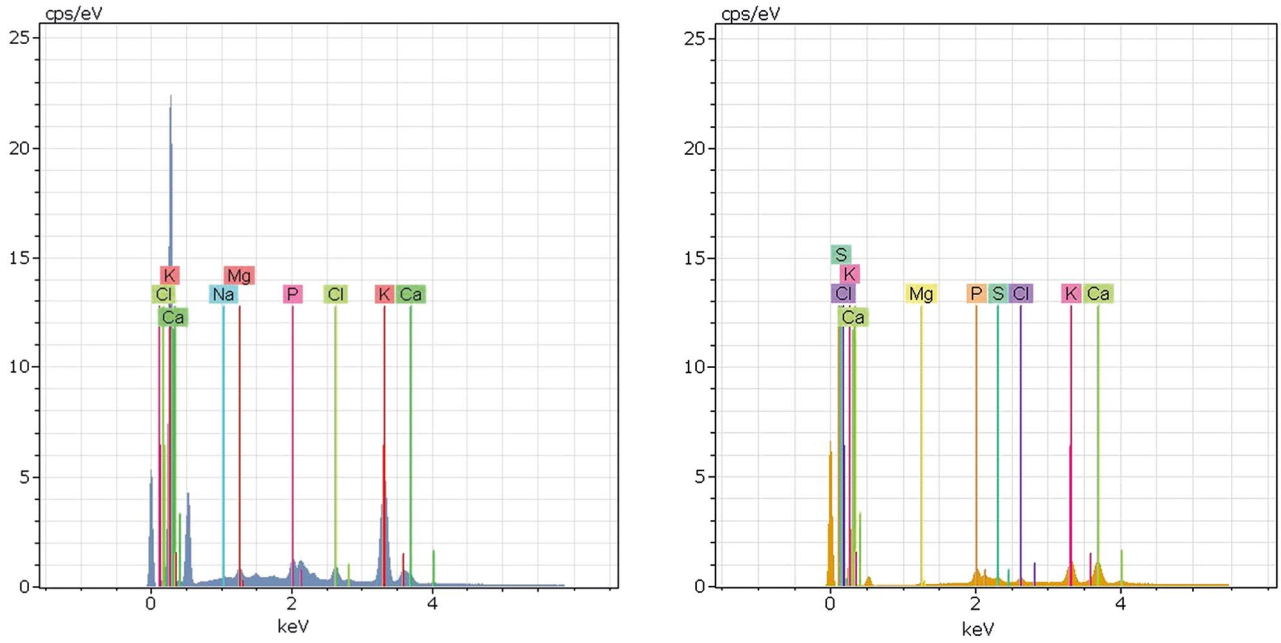


А
A

Б
B

Рисунок 2. **Вид черешка листа винограда девичьего (А), одноклеточный волосок на поверхности черешка (Б)**

Figure 2. **View of the petiole of a *Parthenocíssus quinquefolia* leaf (A), single-celled hair on the surface of the petiole (B)**



А
A

Б
B

Рисунок 3. **Вид линий рентгеновского спектра элементов в заданной точке черешка (А) и листа (Б) винограда девичьего**

Figure 3. **View of the lines of the X-ray spectrum of elements at a given point of the petiole (A) and leaf (B) of *Parthenocíssus quinquefolia***

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено исследование морфологии поверхности листовой пластинки и черешка винограда девичьего пятилисточкового методом растровой электронной микроскопии. Выявлены и визуализированы основные диагностические особенности растительного сырья. Микрорентгеноструктурный анализ позволил установить состав элементов листовой пластинки и черешка винограда девичьего и выявить способность концентрирования кальция, калия, фосфора. Показано, что в клетках листовой пластинки присутствует хлор, а в клетках черешка – натрий. Данные микрорентгеноструктурного анализа дают предпосылки для дальнейших исследований растительного сырья винограда девичьего пятилисточкового в качестве перспективного источника жизненно необходимых элементов.

Полученные результаты в дальнейшем можно использовать при диагностике растительного сырья «Винограда девичьего пятилисточкового листья» и разработке проекта нормативной документации на него.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маевский П. Ф. Флора Средней полосы европейской части. 10-е изд. М.: Товарищество научных изданий «КМК»; 2006. 600 с.
2. Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). М.: Товарищество научных изданий «КМК»; 2003. 547 с.
3. Дул В. Н., Чупарина Е. В., Даргаева Т. Д., Копытько Я. Ф., Сокольская Т. А. Виноград культурный – *Vitis vinifera* L. – новый источник макро- и микроэлементов. *Вестник ВГУ, серия: география. Геоэкология*. 2010;2:76–78.
4. Сокуренко М. С., Соловьева Н. Л., Бессонов В. В., Мазо В. К. Полифенольные соединения класса стильбеноидов: классификация, представители, содержание в растительном сырье, особенности структуры, использование в пищевой промышленности и фармации. *Вопросы питания*. 2019;88(1):17–25. DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10002.
5. Довганюк А. И., Панова М. Б., Творогов А. В. Аллелопатические свойства представителей рода *Vitis* L. и *Partenocissus* Planch. в связи с использованием в озеленении. *АгроЭкоИнфо*. 2020;1(39):1–8.
6. Творогов А. В. Использование девичьего винограда пятилисточкового (*Parthenocissus quinquefolia*) в вертикальном озеленении в условиях города. *Вестник ландшафтной архитектуры*. 2018;16:65–68.
7. Zaheer-un-din K., Summiya F., Anjum P. Phytochemical properties and antioxidant activities of leaves and fruits extract of *Parthenocissus quinquefolia* (L.) planch. *Bangladesh Journal of Botany*. 2018;47(1):33–38.
8. Faisal S., Perveen A., Khan Z., Sardar A. Phytochemical screening and antioxidant potential of *Parthenocissus quinquefolia* (L.) planch extracts of bark and stem. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;31(5):1813–1816.
9. Ismail N. R., Kadhim E. J. Phytochemical Screening and Isolation of New Compounds. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2021;11(3):1033–1039. DOI: 10.25258/ijddt.11.3.66.
10. Deshmukh O. S. Preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch. *International Journal of Life Sciences*. 2017;A8:67–71.
11. Рустамов С. А., Муслимова И. М. Определение количества флавоноидов в плодах партеноциссуса пятилисточкового *Parthenocissus quinquefolia*. В сб.: Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: Научно-практический журнал. Научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 50-летию кафедры токсикологической химии. Пермь. 14–15 декабря 2022 года. Пермь: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 2022. С. 238–241.
12. Рустамов С. А., Муслимова И. М. Определение содержания макро-и микроэлементов в плодах партеноциссуса пятилисточкового *Parthenocissus quinquefolia*. В сб.: Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: Научно-практический журнал. Научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 50-летию кафедры токсикологической химии. Пермь. 14–15 декабря 2022 года. Пермь: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 2022. С. 235–238.
13. Ensikat H. J., Ditsche-Kuru P., Barthlott W. Scanning electron microscopy of plant surfaces: simple but sophisticated methods for preparation and examination. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010;248–255.
14. Магкоев Т. Т., Силаев И. В., Тваури И. В., Радченко Т. И., Сапунова Н. В., Созаев З. Т. Физические основы растровой электронной микроскопии. Владикавказ: Северо-Осетинский государственный университет имени К. Л. Хетагурова; 2022. 187 с.
15. Новиков Ю. А. Современная растровая электронная микроскопия. 2. Тест-объекты для растровой электронной микроскопии. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. 2023;12:129–146. DOI: 10.31857/S102809602312018X.
16. Алексеев Р. З., Платонова В. А., Гольдерова А. С., Гоголева Т. Е., Трифонова Л. А. Оценка изменений эритроцитов с помощью атомно-силовой и растровой электронной микроскопии (смерть от переохлаждения). *Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М. К. Аммосова. Серия: Медицинские науки*. 2019;2(15):8–17. DOI: 10.25587/SVFU.2019.2(15).31306.
17. Hofer C., Skakalova V., Haas J., Wang X., Braun K., Pennington R. S., Meyer J. C. Atom-by-atom chemical identification from scanning transmission electron microscopy images in presence of noise and residual aberrations. *Ultramicroscopy*. 2021;227(6199):113292. DOI: 10.1016/j.ultramic.2021.113292.
18. Ковалёва Н. А., Тринеева О. В. Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):79–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86.
19. Гудкова А. А., Чистякова А. С., Синецкая Д. А., Сливкин А. И., Болгов А. С., Болгова М. А. Растровая электронная микроскопия в анализе видов рода *Persicaria* Mill. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):99–105. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105.
20. Кутейникова Е. С., Гудкова А. А. Анатомическое изучение листа лианы девичьего винограда (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.). В сб.: Современные тенденции развития технологий здоровье сбережения: Сборник материалов IX Международная научная конференция молодых ученых. Москва. 16–17 декабря 2021 года. Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»; 2021. 296–300 с. DOI: 10.52101/9785870191027_2021_296.

REFERENCES

1. Maevskiy P. F. Flora of the Central zone of the European part. 10th edition. Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy "KMK"; 2006. 600 p. (In Russ.)
2. Gubanov I. A., Kiseleva K. V., Novikov V. S., Tikhomirov V. N. Illustrated guide to plants of Central Russia. Volume 2. Angiosperms (dicots: dioecytes). Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy "KMK"; 2003. 547 p. (In Russ.)
3. Dul V. N., Chuparina E. V., Dargaeva T. D., Kopyt'ko Ya. F., Sokol'skaya T. A. Cultivated grape – *Vitis vinifera* L. – a new source of macro- and microelements. *Vestnik VGU, seriya: geografiya. Geoekologiya*. 2010;2:76–78. (In Russ.)
4. Sokurenko M. S., Solov'eva N. L., Bessonov V. V., Mazo V. K. Polyphenolic compounds of the stilbenoid class: classification, representatives, content in plant materials, structural features, use in the food industry and pharmacy. *Voprosy pitaniya.* 2019;88(1):17–25. (In Russ.) DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10002.

5. Dovganyuk A. I., Panova M. B., Tvorogov A. V. Allelopathic properties of representatives of the genus *Vitis* L. and *Partenocissus* Planch. in connection with its use in landscaping. *AgroEkoInfo*. 2020;1(39):1–8. (In Russ.)
6. Tvorogov A. V. The use of five-leaf grape (*Parthenocissus quinquefolia*) in vertical gardening in urban conditions. *Vestnik landshaftnoy arkhitektury*. 2018;16:65–68. (In Russ.)
7. Zaheer-un-din K., Summiya F., Anjum P. Phytochemical properties and antioxidant activities of leaves and fruits extract of *Parthenocíssus quinquefolia* (L.) planch. *Bangladesh Journal of Botany*. 2018;47(1):33–38.
8. Faisal S., Perveen A., Khan Z., Sardar A. Phytochemical screening and antioxidant potential of *Parthenocissus quinquefolia* (L.) planch extracts of bark and stem. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;31(5):1813–1816.
9. Ismail N. R., Kadhim E. J. Phytochemical Screening and Isolation of New Compounds. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2021;11(3):1033–1039. DOI: 10.25258/ijddt.11.3.66.
10. Deshmukh O. S. Preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch. *International Journal of Life Sciences*. 2017;A8:67–71.
11. Rustamov S. A., Muslimova I. M. Determination of the amount of flavonoids in the fruits of Parthenocissus quinquefolia. In: Bulletin of the Perm State National Pharmaceutical Academy: Scientific and practical journal. Scientific and practical conference with international participation, dedicated to the 50th anniversary of the Department of Toxicological Chemistry. Permian. December 14–15, 2022. Perm: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2022. P. 238–241. (In Russ.)
12. Rustamov S. A., Muslimova I. M. Determination of the content of macro- and microelements in the fruits of *Parthenocissus quinquefolia*. In: Bulletin of the Perm State Pharmaceutical Academy: Scientific and practical journal. Scientific and practical conference with international participation, dedicated to the 50th anniversary of the Department of Toxicological Chemistry. Permian. December 14–15, 2022. Perm: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2022. P. 235–238. (In Russ.)
13. Ensikat H. J., Ditsche-Kuru P., Barthlott W. Scanning electron microscopy of plant surfaces: simple but sophisticated methods for preparation and examination. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010;248–255.
14. Magkoev T. T., Silaev I. V., Tvauri I. V., Radchenko T. I., Sapunova N. V., Sozaev Z. T. Physical foundations of scanning electron microscopy. Vladikavkaz: North Ossetian State University named after K. L. Khetagurov; 2022. 187 p. (In Russ.)
15. Novikov Yu. A. Modern raster electronic microscopy. 2. Test objects for scanning electron microscopy. *Poverhnost'. Rentgenovskie, sinkhrotronnye i neytronnye issledovaniya*. 2023;12:129–146. (In Russ.) DOI: 10.31857/S102809602312018X.
16. Alekseev R. Z., Platonova V. A., Golderova A. S., Gogoleva T. E., Trifonova L. A. Assessment of changes in red blood cells using atomic force and scanning electron microscopy (death from hypothermia). *Vestnik of North-Eastern Federal University M. K. Ammosova. Seriya: Medical Sciences*. 2019;2(15):8–17. (In Russ.) DOI: 10.25587/SVFU.2019.2(15).31306.
17. Hofer C., Skakalova V., Haas J., Wang X., Braun K., Pennington R. S., Meyer J. C. Atom-by-atom chemical identification from scanning transmission electron microscopy images in presence of noise and residual aberrations. *Ultramicroscopy*. 2021;227(6199):113292. DOI: 10.1016/j.ultramic.2021.113292.
18. Kovaleva N. A., Trineeva O. V. Application of scanning electron microscopy to study the morphological and anatomical characteristics of sea buckthorn leaves. *Drug development & registration*. 2023;12(2):79–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-79-86.
19. Gudkova A. A., Chistyakova A. S., Sinetskaya D. A., Slivkin A. I., Bolgov A. S., Bolgova M. A. Scanning electron microscopy in the analysis of species of the genus *Persicaria* Mill. *Drug development & registration*. 2022;11(1):99-105. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-99-105.
20. Kuteynikova E. S., Gudkova A. A. Anatomical study of the leaf of the vine vine (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.). In: Modern trends in the development of health saving technologies: Collection of materials IX International national scientific conference of young scientists. Moscow. December 16–17, 2021. Moscow: Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants"; 2021. 296–300 p. (In Russ.) DOI: 10.52101/9785870191027_2021_296.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.076

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1611

Check for updates

CC BY 4.0

Изучение органических кислот и аминокислотного состава каштана конского цветков

А. С. Чистякова✉, А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, А. С. Болгов, А. А. Гудкова, А. И. Сливкин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»). 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Чистякова Анна Сергеевна. **E-mail:** anna081189@yandex.ru

ORCID: А. С. Чистякова – https://orcid.org/0000-0002-8291-9904; А. Д. Дунилин – https://orcid.org/0000-0001-6792-6877;
О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067; А. С. Болгов – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953;
А. А. Гудкова – https://orcid.org/0000-0002-1275-5000; А. И. Сливкин – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354.

Статья поступила: 16.10.2023 **Статья принята в печать:** 29.03.2024 **Статья опубликована:** 29.03.2024

Резюме

Введение. В настоящее время все чаще прослеживается тенденция к оценке полного спектра химических соединений в растительном сырье. Одними из первых ступеней в формировании вторичных метаболитов сложного строения, участвующих в биохимических процессах в растительном организме, оказывающих собственное влияние на организм человека и животных, являются органические кислоты (ОК) и аминокислоты (АК). Однако данным соединениям не всегда уделяется должное внимание при изучении компонентного состава растительного сырья.

Цель. Целью работы являлось изучение профиля и количественная оценка содержания органических кислот и аминокислот каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) цветков.

Материалы и методы. Объектом исследования выступали каштана конского цветки, заготовленные во время цветения в Воронежской области в 2021 году и высушенные воздушно-теневым способом. Количественную оценку суммы ОК в пересчете на яблочную кислоту и аскорбиновой кислоты проводили титриметрически согласно методикам, представленным в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. Состав профиля ОК и АК каштана конского цветков устанавливали с использованием метода капиллярного электрофореза («КАПЕЛЬ®-105/105М», ГК «Люмэкс», Россия)

Результаты и обсуждение. Методом капиллярного электрофореза выявлено наличие 12 соединений группы ОК в общем количестве 4,7 % (в пересчете на абсолютно сухое сырье). Показана рациональность пересчета содержания суммы ОК на мажорный компонент – лимонную кислоту, что составило 1,65 ± 0,04 %. Содержание аскорбиновой кислоты было невысоким (0,033 ± 0,007) %. Методом ТСХ в водном извлечении из каштана конского цветков установлено наличие 5 зон соединений, относящихся к классу АК. Количественное содержание суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую, определенное спектрофотометрическим методом, составило 2,25 ± 0,07 % ($n = 5$). Методом капиллярного электрофореза установлено присутствие 17 АК, что составило 7,13 %. В наибольшем количестве в цветках каштана конского присутствует глутаминовая кислота (1,19 %). Незаменимые АК составили 2,27 %, в превалирующем количестве присутствует лейцин (0,58 %).

Заключение. Проведено изучение качественного состава и количественного содержания органических кислот и аминокислот каштана конского цветков. Установлен состав профиля и количественное содержание органических кислот и аминокислот. Выявлено, что в сумме органических кислот превалирует лимонная кислота, в сумме аминокислот в большем количестве содержатся глутаминовая, аспарагиновая кислота, аргинин и пролин.

Ключевые слова: каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.), цветки, органические кислоты, аминокислоты, капиллярный электрофорез

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

Вклад авторов. А. А. Гудкова, О. В. Тринеева 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, А. Д. Дунилин и А. С. Болгов участвовали в заготовке объектов исследования, их идентификации, приведении в стандартное состояние и подготовке к исследованию. Все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Чистякова А. С., Дунилин А. Д. Тринеева О. В., Болгов А. С., Гудкова А. А., Сливкин А. И. Изучение органических кислот и аминокислотного состава каштана конского цветков. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):125–132. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1611

Studying the acids and amino acid composition of horse chestnut flowers

Anna S. Chistyakova✉, Alexander D. Dunilin, Olga V. Trineeva, Alexei S. Bolgov, Alevtina A. Gudkova, Alexei I. Slivkin

Voronezh State University. 1, Universitetskaya Square, Voronezh, 394018, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna S. Chistjakova. **E-mail:** anna081189@yandex.ru

© Чистякова А. С., Дунилин А. Д. Тринеева О. В., Болгов А. С., Гудкова А. А., Сливкин А. И., 2024
© Chistyakova A. S., Dunilin A. D., Trineeva O. V., Bolgov A. S., Gudkova A. A., Slivkin A. I., 2024

ORCID: Anna S. Chistyakova – https://orcid.org/0000-0002-8291-9904; Alexander D. Dunilin – https://orcid.org/0000-0001-6792-6877;
Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067; Alexei S. Bolgov – https://orcid.org/0000-0001-5827-5953;
Alevtina A. Gudkova – https://orcid.org/0000-0002-1275-5000; Alexei I. Slivkin – https://orcid.org/0000-0002-7811-8354.

Received: 16.10.2023 **Accepted:** 29.03.2024 **Published:** 29.03.2024

Abstract

Introduction. Currently, there is an increasing trend towards assessing the full spectrum of chemical compounds in plant materials. One of the first steps in the formation of secondary metabolites of complex structure, participating in biochemical processes in the plant body, which have their own effect on the human and animal body, are organic acids (OA) and amino acids (AA). However, due attention is not always given to these compounds when studying the component composition of plant raw materials.

Aim. The purpose of the work was to study the profile and quantitative assessment of the content of organic acids and amino acids of *Aesculus hippocastanum* L. flowers.

Materials and methods. The object of the study were horse chestnut flowers, collected during flowering in the Voronezh region in 2021 and dried by air-shade method. Quantitative assessment of the amount of TC in terms of malic acid and ascorbic acid was carried out titrimetrically according to the methods presented in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition. The composition of the OA and AA profiles of horse chestnut flowers was determined using the capillary electrophoresis method ("KAPEL®-105/105M", Group of Companies "Lumex", Russia).

Results and discussion. The method of capillary electrophoresis revealed the presence of 12 compounds of the OA group in a total amount of 4.7 % (in terms of absolutely dry raw materials). The rationality of recalculating the content of the sum of OA to the major component – citric acid, which amounted to 1.65 ± 0.04 %, was shown. The content of ascorbic acid was low (0.033 ± 0.007) %. Using the TLC method, the presence of 5 zones of compounds belonging to the AA class was established in the aqueous extract of horse chestnut flowers. The quantitative content of the sum of free AA in terms of glutamine, determined by the spectrophotometric method, was 2.25 ± 0.07 % (n = 5). The presence of 17 AA was determined by capillary electrophoresis, which amounted to 7.13 %. Glutamic acid is present in the greatest quantity in horse chestnut flowers (1.19 %). Essential amino acids amounted to 2.27 %; leucine was present in the predominant amount (0.58 %).

Conclusion. A study was carried out of the qualitative composition and quantitative content of organic acids and amino acids of horse chestnut flowers. The composition of the profile and the quantitative content of organic acids and amino acids have been established. It was revealed that citric acid prevails in the total organic acids; glutamic, aspartic acid, arginine and proline are found in greater quantities in the total amino acids.

Keywords: horse chestnut, flowers, organic acids, amino acids, capillary electrophoresis

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, Olga V. Trineeva and Alexei I. Slivkin were responsible for the organizational part of the study, planned the experiment, set the goals and objectives of the study, and participated in the discussion of the results obtained. Anna S. Chistyakova, Alexander D. Dunilin and Alexei S. Bolgov participated in the procurement of research objects, their identification, bringing them to a standard state and preparing them for research. All authors participated in the discussion of the results obtained in the format of a scientific discussion.

For citation: Chistyakova A. S., Dunilin A. D., Trineeva O. V., Bolgov A. S., Gudkova A. A., Slivkin A. I. Studying the acids and amino acid composition of Horse chestnut flowers. *Drug development & registration*. 2024;13(2):125–132. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1611

ВВЕДЕНИЕ

Каштан конский обыкновенный относится к широко распространенным видам семейства конскокаштановых. История применения конского каштана в медицине довольно продолжительная и начинается с XI века; считается, что в Россию были завезены саженцы каштана из Византии, и в настоящее время растение активно культивируется [1]. В медицине используются все части каштана конского, но наиболее часто встречаются упоминания о применении семян, при этом они рекомендовались как жаропонижающее, противоотечное, противогеморроидальное средство [2]. В настоящее время семена каштана конского являются официнальным видом сырья и используются в качестве источника получения ангиопротекторных, венотонизирующих средств [2–5]. Главным классом химических соединений, отвечающих за проявляемые эффекты, являются сапонины (среди них были выделены и идентифицированы протоэсцигенин и баррингтогенол, а также эсцин, являющийся смесью двух соединений эсцина и просапогенина, различающихся способностью к гемолизу), кроме того, содержатся флавоноиды (производные кверцетина и кемпферола, антоциановые соединения), кумарины (эскулин, фраксин) [2, 6–8]. Как видно из доступных литературных источников, наиболее исследованными морфологическими частями каштана конского являются семена, почки, кора. Информация по изучению цветков каштана разрозненна, встречаются лишь немногочисленные исследования, которые не формируют полного представления о химическом составе и перспективах использования этого вида сырья в медицине [9–15]. В настоящее время все чаще прослеживается тенденция к оценке полного спектра химических соединений в растительном сырье, что позволяет прогнозировать с высокой точностью наличие тех или иных фармакологических эффектов, при этом внимание уделяется как соединениям, присутствующим в превалирующем большинстве, так и минорным компонентам (из

группы первичных и вторичных метаболитов). Учитывая, что одними из первых ступеней в формировании вторичных метаболитов сложного строения, участвующих в биохимических процессах в растительном организме, оказывающих собственное влияние на организм человека и животных, являются органические кислоты и аминокислоты, их изучение в цветках каштана конского обыкновенного следует считать актуальным.

Целью работы являлось изучение профиля и количественная оценка содержания органических кислот (ОК) и аминокислот (АК) каштана конского обыкновенного цветков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы цветки каштана конского, которые были заготовлены во время цветения в Воронежской области в 2021 году и высушены воздушно-теневым способом.

Количественную оценку суммы ОК в пересчете на яблочную кислоту и аскорбиновой кислоты проводили титриметрически согласно методикам ГФ РФ XIV изд., ФС.2.5.0093.18 «Рябины обыкновенной плоды» и ФС.2.5.0106.18 «Шиповника плоды» [16]. Состав профиля ОК и АК каштана конского цветков устанавливали с использованием метода капиллярного электрофореза («КАПЕЛЬ®-105/105М», ГК «Люмэкс», Россия)[1] [17]. Условия анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия анализа органических кислот и аминокислот методом капиллярного электрофореза

Table 1. Conditions for the analysis of organic acids and amino acids by capillary electrophoresis

Параметр Experimental condition	Условия анализа	
	Органические кислоты Organic acids	Аминокислоты Amino acids
Буфер Buffer	Фосфатный Phosphate	30 мМ фосфатный, 4 мМ β-циклодекстрин (pH 7,4) 30 mM phosphate, 4 mM β-cyclodextrin (pH 7.4)
Напряжение Voltage	17 кВ 17 kV	+25 кВ +25 kV
Капилляр Capillary	$L_{эфф.}/L_{общ.}$ = 40/50 см, ID = 50 мкм $L_{eff.}/L_{tot.}$ = 40/50 cm, ID = 50 µm	$L_{эфф.}/L_{общ.}$ = 65/75 см, ID = 50 мкм $L_{eff.}/L_{tot.}$ = 65/75 cm, ID = 50 µm
Ввод пробы Sample injection	300 мбар · с 300 mbar · s	150 мбар · с 150 mbar · s
Температура Temperature	+20 °C	+30 °C
Детектирование Detection	Косвенное при 190 нм Indirect at 190 nm	УФ-детектирование, 254 нм UV detection, 254 nm

[1] ГОСТ 13496.21-87. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения лизина и триптофана. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200024343. Ссылка активна на 16.10.2023.

Для получения водного извлечения суммы свободных АК цветки каштана нагревали с водой очищенной на водяной бане в течение 2 часов [соотношение сырье : экстрагент (1 : 50)]. Далее профильтровывали в мерную колбу объемом 50 мл и доводили водой очищенной до метки. Полученное извлечение наносили на хроматограмму в объеме 5 мкл. Системой для хроматографирования являлась смесь состава *н*-бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 2), проявитель – спиртовой раствор нингидрина 0,1%-й, в качестве стандартного образца выступал 0,1%-й раствор глутаминовой кислоты (степень чистоты не менее 99 %; АО «ВЕКТОН», Россия), хроматографические пластинки фирмы Sorbfil (Россия) [18]. Далее для оценки количественного содержания суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую кислоту 1 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу объемом 50 мл, добавляли 1 мл 0,25%-го натрия гидрокарбоната и 2 мл 2%-го спиртового раствора нингидрина, нагревали в течение 15 минут на водяной бане, доводили до метки водой очищенной [19–21]. Оптическую плотность измеряли в аналитическом максимуме 568 ± 2 нм (СФ-2000-01, ООО «ОКБ Спектр», Россия).

Для оценки профиля АК (свободные и связанные) методом капиллярного электрофореза навеску измельченных цветков каштана конского подвергали гидролизу раствором 6 М кислоты хлороводородной в течение 16–18 часов при температуре 110 ± 5 °C [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подробное изучение профиля ОК каштана конского цветков методом капиллярного электрофореза позволило выявить наличие 12 БАВ данной группы. На рисунке 1 показано распределение ОК в абсолютных значениях и долях по отношению к их сумме. Установлено, что лимонная кислота присутствует в превалирующем количестве (1,65 %, что составляет 35 % от суммы ОК). Также необходимо отметить довольно высокое содержание молочной (0,95 %, что составляет 20 % от суммы ОК), янтарной (0,82 %, что составляет 18 % от суммы ОК) и масляной кислот (0,71 %, что составляет 15 % от суммы ОК). Суммарное содержание ОК в цветках каштана конского составило 4,7 %. Полученные данные позволят предположить дальнейшие пути использования каштана конского цветков. Янтарная кислота направленно влияет на регуляцию энергетического обмена, повышает неспецифическую иммунорезистентность, проявляет антиоксидантное действие [22], снижает остроту проявления стрессовых реакций, является интермедиатом цикла Кребса, способствует нормализации уровня гистамина и серотонина, повышает адаптационные возможности организма при воздействии неблагоприятных факторов [23]. Масляная кислота оказывает положительное воздействие на желудочно-кишечный тракт, участвуя в регуляции пролифе-

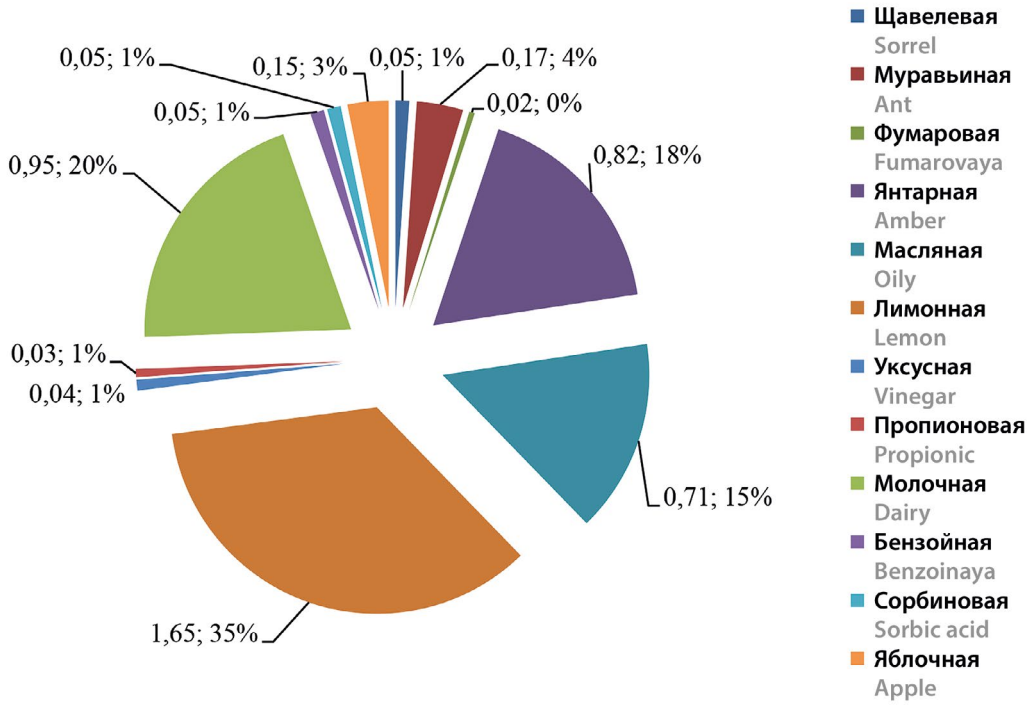


Рисунок 1. Профиль ОК каштана конского цветков

Figure 1. Profile of OA horse chestnut flowers

рации и дифференцировки эпителия слизистой [24], стимулирует специфический иммунный ответ и ингибирует патогенную микрофлору [25]. Молочная кислота подавляет патогенную микрофлору, обладает антисептическим действием, улучшает обменные процессы [26].

Современная нормативная документация на лекарственное растительное сырье рекомендует использовать для оценки содержания суммы ОК титриметрическую методику, что отражено в ФС.2.5.0093.18 «Рябины обыкновенной плоды» и ФС.2.5.0076.18 «Калины обыкновенной плоды свежие» ГФ РФ XIV изд. Пересчет суммы ОК предлагается проводить на яблочную кислоту. В результате количественной оценки содержания суммы ОК в пересчете на яблочную кислоту в каштана конского цветках, которая была проведена согласно фармакопейной методике, установлено значение данного параметра, равное 1,15 ± 0,02 % (n = 5). Учитывая, что количество яблочной кислоты в цветках каштана конского незначительно, более рационально выполнять пересчет содержания суммы ОК на мажорный компонент – лимонную кислоту, что составило 1,65 ± 0,04 %. Содержание аскорбиновой кислоты, установленное с помощью фармакопейной титриметрической методики, было невысоким (0,033 ± 0,007) % (n = 5).

Фармакопейная методика количественного определения суммы ОК имеет ряд недостатков, один из которых – это невозможность оценки содержания ОК во всех формах их существования (в форме свободных кислот и в форме солей) [27]. Полученные на данном этапе эксперимента данные позволяют оценить содержание суммы ОК исключительно в кислой форме, что объясняет расхождение результатов при использовании различных методов анализа.

Следующим этапом работы являлось изучение качественного состава и количественного содержания свободных и связанных АК в изучаемом растительном сырье.

С помощью метода ТСХ в водном извлечении из каштана конского цветков установлено наличие 5 зон соединений, относящихся к классу АК (рисунок 2). Среди них была идентифицирована глутаминовая кислота (R_f составляет 0,45 ± 0,02), а также, предположительно, лизин[1] (R_f составляет 0,10), глицин[2] (R_f составляет 0,30), метеонин[3] (R_f составляет 0,36) и неидентифицированный компонент (R_f составляет 0,46).

Количественное определение суммы свободных АК осуществляли спектрофотометрическим методом в пересчете на глутаминовую кислоту, что правомерно, учитывая наличие зоны данного компонента на хроматограмме, полученной на предыдущем этапе, и присутствие характерного максимума на УФ-спектре поглощения продуктов реакции суммы АК с раствором нингидрина (рисунок 3). В результате расчетов было установлено количественное содержание сум-

[1] Идентификация проводилась с использованием данных литературы [18].

[2] Там же.

[3] Там же.

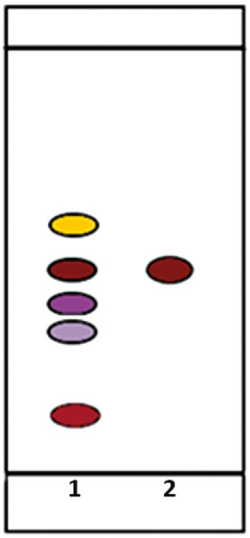


Рисунок 2. **ТСХ-картина зон разделения аминокислот водного извлечения каштана конского цветков:**

1 – извлечение каштана конского цветков; 2 – 0,1%-й раствор глутаминовой кислоты

Figure 2. **TLC picture of the amino acid separation zones of an aqueous extract of horse chestnut flowers:**

1 – extraction of horse chestnut flowers; 2 – 0.1 % glutamic acid solution

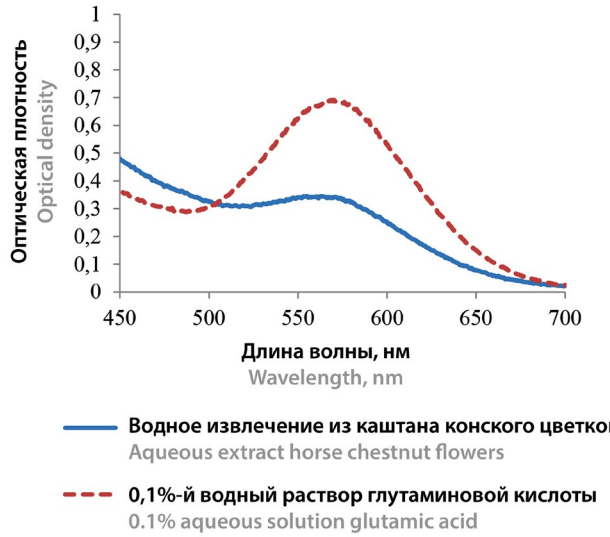


Рисунок 3. **Фрагмент спектров поглощения продуктов реакции аминокислот с раствором нингидрина**

Figure 3. **Fragment of the absorption spectra of the reaction products of amino acids with ninhydrin solution**

мы свободных АК в каштане конском цветках, которое составило 2,25 ± 0,07 % (n = 5).

В рамках подробного изучения профиля как свободных, так и связанных АК каштана конского цветков методом капиллярного электрофореза было установлено присутствие 17 АК, что в сумме составило 7,13 % (рисунок 4).

Рисунок 4. **АК каштана конского цветков**

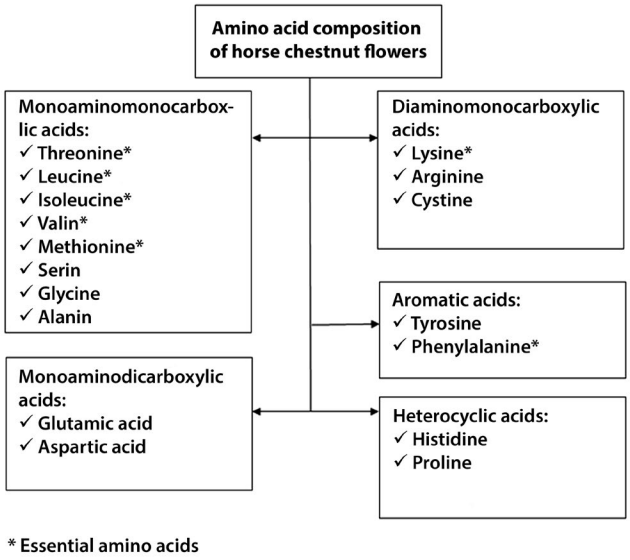


Figure 4. **AA horse chestnut flowers**

На рисунке 5 показано распределение АК в абсолютных значениях и долях по отношению к их сумме. В наибольшем количестве в цветках каштана конского присутствует глутаминовая кислота (1,19 %, что соответствует 16 % от суммы АК), аспарагиновая кислота; аргинин (по 0,72 %) и пролин (0,63 %) встречаются в меньшем количестве.

Незаменимые АК в количестве 7 наименований (лизин, лейцин, изолейцин, метеонин, валин, треонин, фенилаланин) составили 2,27 % (32 % от общего количества аминокислот). Среди незаменимых АК в превалирующем количестве присутствует лейцин (0,58 %), далее АК в ряду уменьшения их количества распределись следующим образом: треонин, фенилаланин (по 0,41 %), лизин (0,35 %), валин (0,29 %), изолейцин (0,19 %), метеонин (0,04 %).

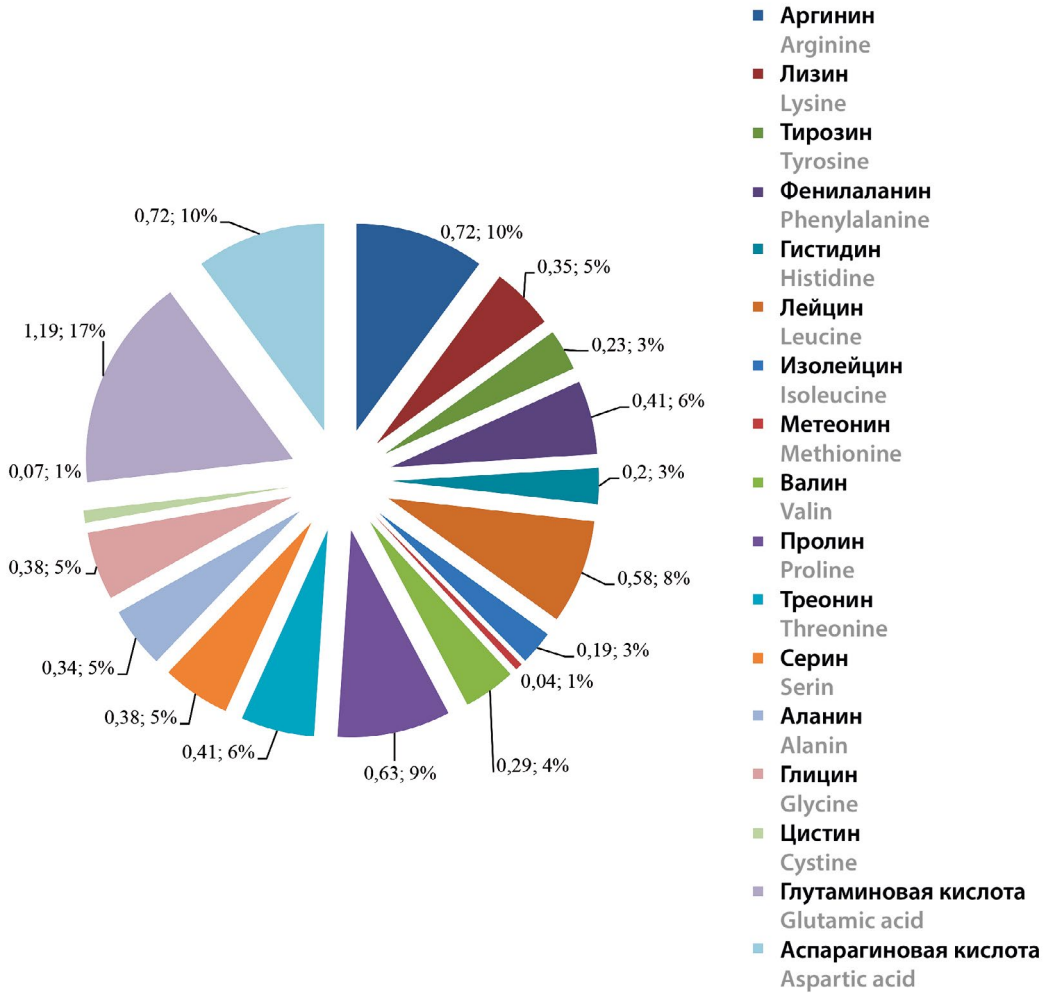


Рисунок 5. Профиль АК каштана конского цветков

Figure 5. AA profile of horse chestnut flowers

Учитывая полученные данные, можно отметить, что каштана конского цветки могут являться дополнительным источником аминокислот. Глутаминовая кислота необходима организму в качестве медиатора, осуществляющего передачу возбуждения в центральной нервной системе, она регулирует гликолиз мышц, участвует в синтезе гемоглобина, усиливает фармакологическое действие некоторых лекарственных средств[1]. Аспарагиновая кислота усиливает выработку АТФ, стимулирует цикл Кребса, увеличивает потребление кислорода миокардом, обладает антитератогенным действием [28]. Аргинин является блокатором ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), снимает спазм сосудов, в том числе коронарных, улучшает микроциркуляцию, стимулирует иммунный ответ, нормализует половую дисфункцию [29]. Лейцин снижает уровень глюкозы в крови, стимулирует иммунный ответ, проявляет адаптогенное действие, регулирует тромбообразование [30].

Наличие такой АК, как лизин, особенно в сочетании с присутствующим в сырье эсцином, позволяет использовать каштана конского цветки как средство, нормализующее проницаемость сосудов, снижающее отечность, восстанавливающее микроциркуляцию, что незаменимо в нейрохирургии и нашло отражение в получении лекарственного средства – L-лизина эсцината[2] [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведено изучение качественного состава и количественного содержания ОК и АК каштана конского цветков. Показано, что данное сырье может являться дополнительным источником исследуемых групп БАВ. Методом капиллярного электрофореза изучен профиль органических

[1] Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. Доступно по: https://www.rlsnet.ru/ Ссылка активна на 16.10.2023.

[2] Справочник лекарственных препаратов. Видаль. Доступно по: https://www.vidal.ru/ Ссылка активна на 16.10.2023.

кислот каштана конского цветков, установлено наличие 12 соединений (4,7 %), среди которых превалирует лимонная кислота (1,65 %). При использовании фармакопейной титриметрической методики показана рациональность пересчета содержания суммы органических кислот на лимонную кислоту, что составило 1,65 %. Методом ТСХ выявлено присутствие 5 веществ группы АК, среди которых идентифицированы лизин, глицин, метеонин, глутаминовая кислота. Установлено количественное содержание суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую кислоту, равное 2,25 %. Методом капиллярного электрофореза установлен компонентный состав профиля АК каштана конского цветков. Показано наличие 17 АК, содержание которых суммарно составило 7,13 %, 7 из них (2,27 %) относятся к незаменимым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заигралова Г. Н., Кабанов С. В. Изменчивость морфологических признаков *Aesculus hippocastanum* L. (конского каштана обыкновенного) в зеленых насаждениях г. Саратова. *Известия ОГАУ.* 2019;5(79):128–132.
2. Богачев В. Ю., Болдин Б. В., Туркин П. Ю. Экстракт конского каштана. *Consilium Medicum*. 2022;24(1):42–48.
3. Simon P., Lena M., Radial growth response of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) trees to climate in Ljubljana, Slovenia. *Urban Forestry & Urban Greening.* 2016;18:110–116.
4. Порембская О. Я. Топические средства для лечения хронических заболеваний вен. Состав как основа эффективности. *Флебология*. 2020;14(4):322–327. DOI: 10.17116/flebo202014041322.
5. Ozkan E. E., Mesut B., Polat A., Tan N. In vitro skin permeation of escin in the new gel formulation of *Aesculus hippocastanum* (Horse Chestnut). *J Fac Pharm Istanbul İstanbul Ecz Fak Derg.* 2016;46:79–88.
6. Белов П. В. Определение содержания суммы флавоноидов в водно-спиртовых извлечениях из почек и цветков каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.). В сб.: Аспирантские чтения – 2018: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Самара. 24 октября 2018 года. Самара: Общество с ограниченной ответственностью «Офорт»; Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ; 2018. 122 с.
7. Paterska M., Bandurska H., Wysłouch J., Molińska-Glura M., Moliński K. Chemical composition of horse-chestnut (*Aesculus*) leaves and their susceptibility to chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2017;39:105.
8. Idris S., Mishra A., Khushtar M. Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.* 2020;31(5). DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0115.
9. Яцюк В. Я., Елецкая О. А. Элементный состав некоторых видов сырья *Aesculus hippocastanum* L. *Актуальные проблемы медицины.* 2017;26(275):158–167.
10. Филатова А. В., Джурабаев Д. Т., Азимова Л. Б., Тураев А. С. Технология выделения полисахаридов из оболочек плодов каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) и изучение его химического состава. *Известия ВУЗов. Химия и химическая технология*. 2022;65(7):88–93. DOI: 10.6060/ivkkt.20226507.6605.
11. Курченко В. П., Сушинская Н. В., Майорова К. И., Тарун Е. И., Бондарук А. М., Цыганков В. Г., Фатыхова С. А., Шабуня П. С. Состав биологически активных веществ каштана конского (*Aeculus hippocastanum* L.). *Экобиотех*. 2021;4(1):33–39. DOI: 10.31163/2618-964X-2021-4-1-33-39.
12. Андреев Д. Н., Кучерявый Ю. А., Черемушкин С. В., Маев И. В. Эффективность включения масляной кислоты в схемы спазмолитической терапии синдрома раздраженного кишечника: метаанализ контролируемых исследований. *Consilium Medicum*. 2020;22(8):27–31. DOI: 10.26442/20751753.2020.8.200194.
13. Percival G. C., Holmes S. P. The influence of systemic inducing agents on horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*) severity in white flowering horse chestnut (*Aesculus hoppicastanum* L.). *Urban Forestry & Urban Greening*. 2016;20:97–102.
14. Oszmiański J., Kalisz, S., Wojdyło A., The content of phenolic compounds in leaf tissues of white (*Aesculus hippocastanum L.*) and red horse chestnut (*Aesculus carea* H.) colonized by the horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimić). *Molecules*. 2014;19(9):14625–14636. DOI: 10.3390/molecules190914625.
15. Bielarska A. M., Jasek J. W., Kazimierczak R., Hallmann E. Red Horse Chestnut and Horse Chestnut Flowers and Leaves: A Potential and Powerful Source of Polyphenols with High Antioxidant Capacity. *Molecules*. 2022;27(7):2279. DOI: 10.3390/molecules27072279.
16. Государственная фармакопея Российской Федерации. В 4 т. 14-е изд. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018.
17. Комарова Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза Капель. Санкт-Петербург: Веда; 2006. 213 с.
18. Чистякова А. С., Гудкова А. А., Сорокина А. А., Сливкин А. И. Сравнительное изучение аминокислотного состава представителей рядов *Persicariaeformes* Kom. и *Lapathiiformes* Worosch. *Химия растительного сырья*. 2019;4:157–162. DOI: 10.14258/jcprm.2019044347.
19. Олешко Г. И., Ярыгина Т. И., Зорина Е. В., Решетникова М. Д. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах. *Фармация*. 2011;3:14–17.
20. Ажикова А. К. Количественное определение аминокислот в листьях гингко двулопастного (*Ginkgo biloba* L.). В сб.: Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: Сборник трудов Седьмой научной конференции с международным участием. Москва. 19 декабря 2019 года. Том 12. Москва: ФГБНУ ВИЛАР; 2019. С. 151–155.
21. Тринеева О. В. Определение аминокислот в фармацевтических субстанциях растительного происхождения физико-химическими методами (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной). В сб.: Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине: 5-я научно-практическая конференция. 15 марта 2017 года. Москва. 2017. С. 222–225.
22. Ли О. Н., Тыртышникова А. В., Кропотов А. В., Седых Т. Н. Антиоксидантные свойства комбинированного препарата, содержащего янтарную кислоту, при тепловом воздействии на организм. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2021;1:76–79. DOI: 10.34215/1609-1175-2021-1-76-79.
23. Шахмарданова С. А., Гулевская О. Н., Хананашвили Я. А., Зеленская А. В., Нефедов Д. А., Галенко-Ярошевский П. А. Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики и терапии различных заболеваний. *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. 2016;3:16–30.
24. Ардатская М. Д., ред. Масляная кислота и инулин в клинической практике: теоретические аспекты и возможности клинического применения. М.: Форте принт; 2014. 64 с.
25. Готхалс Л., Горбакова А. Сравнительные характеристики бутиратов. *Комбикорма*. 2014;5:43–46.
26. Abd Alsaheb R. A., Aladdin A., Othma N. Z., Abd Malek R., Mei Leng O., Aziz R., El Enshasy H. A. Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2015;7(10):729–735
27. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Воропаева С. С. Определение органических кислот в листьях крапивы двудомной. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2013;2:215–219.
28. Кадырова Р. Г., Кабиров Г. Ф., Муллахметов Р. Р. Синтез солей аспарагиновой кислоты щелочных и щелочноземельных металлов. *Ученые записки КГАВМ им. Н. Э. Баумана*. 2012;1:156–161.
29. Разводовский Ю. Е., Смирнов В. Ю., Дорошенко Е. М., Перевертзев В. А., Максимович Н. Е., Семененя И. Н. Эффекты совместного использования L-аргинина и омега-3 полиненасыщен-

ных жирных кислот на спектр аминокислот и биогенных аминов коры больших полушарий при субтотальной ишемии головного мозга. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2021;20(2):5–11.
30. Лысиков Ю. А. Аминокислоты в питании человека. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2012;2:88–105.
31. Гафуров Б. Г. Эффективность противоотечного препарата L-лизина эсцината при церебральном инсульте. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2012;112(12–2):31–34.

REFERENCES

1. Zaigralova G. N., Kabanov S. V. Variability of morphological characters of *Aesculus hippocastanum* L. (common horse chestnut) in green spaces of Saratov. *Izvestia Orenburg State Agrarian University Theoretical and Scientific – Practical Journal*. 2019;5(79):128–132. (In Russ.)
2. Bogachev V. Yu., Boldin B. V., Turkin P. Yu. Horse chestnut extract. *Consilium Medicum*. 2022;24(1):42–48. (In Russ.)
3. Simon P., Lena M., Radial growth response of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) trees to climate in Ljubljana, Slovenia. *Urban Forestry & Urban Greening*. 2016;18:110–116.
4. Porembskaya O. Ya. Topical remedies for chronic venous disease management. Composition as the basis of effectiveness. *Flebologiya*. 2020;14(4):322–327. (In Russ.) DOI: 10.17116/flebo202014041322.
5. Ozkan E. E., Mesut B., Polat A., Tan N. In vitro skin permeation of escin in the new gel formulation of *Aesculus hippocastanum* (Horse Chestnut). *J Fac Pharm Istanbul İstanbul Ecz Fak Derg*. 2016;46:79–88.
6. Belov P. V. Determination of the content of total flavonoids in aqueous-alcoholic extracts from the buds and flowers of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). In: Postgraduate readings – 2018: Materials of the All-Russian scientific and practical conference with international participation. Samara. October 24, 2018. Samara: Limited Liability Company "Ofort"; Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2018. 122 p. (In Russ.)
7. Paterska M., Bandurska H., Wysłouch J., Molińska-Glura M., Moliński K. Chemical composition of horse-chestnut (*Aesculus*) leaves and their susceptibility to chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2017;39:105.
8. Idris S., Mishra A., Khushtar M. Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2020;31(5). DOI: 10.1515/jbcpp-2019-0115.
9. Jacjuk V. Ya., Eleckaja O. A. Elemental composition of some types of raw materials *Aesculus hippocastanum* L. *Challenges in modern medicine*. 2017;26(275):158–167. (In Russ.)
10. Filatova A. V., Dzhurabaev D. T., Azimova L. B., Turaev A. S. Technology of separation of polysaccharides from the shells of the fruits of chestnut horse (Aesculus hippocastanum L.) and the study of its chemical composition. *ChemChemTech*. 2022;65(7):88–93. (In Russ.) DOI: 10.6060/ivkkt.20226507.6605.
11. Kurchenko V. P., Sushinskaja N. V., Majorova K. I., Tarun E. I., Bondaruk A. M., Cygankov V. G., Fatyhova S. A., Shabunja P. S. Composition of biologically active substances of horse chestnut (*Aeculus hippocastanum* L.). *Ecobiotech*. 2021;4(1):33–39. (In Russ.) DOI: 10.31163/2618-964X-2021-4-1-33-39.
12. Andreev D. N., Kucheryavyy Yu. A., Cheremushkin S. V., Maev I. V. The effectiveness of adding butyric acid to antispasmodic therapy regimens for irritable bowel syndrome: a meta-analysis of controlled studies. *Consilium Medicum*. 2020;22(8):27–31. (In Russ.) DOI: 10.26442/20751753.2020.8.200194.
13. Percival G. C., Holmes S. P. The influence of systemic inducing agents on horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*) severity in white flowering horse chestnut (*Aesculus hoppicastanum* L.). *Urban Forestry & Urban Greening*. 2016;20:97–102.
14. Oszmiański J., Kalisz, S., Wojdyło A., The content of phenolic compounds in leaf tissues of white (*Aesculus hippocastanum L.*) and red horse chestnut (*Aesculus carea* H.) colonized by the horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimić). *Molecules*. 2014;19(9):14625–14636. DOI: 10.3390/molecules190914625.
15. Bielarska A. M., Jasek J. W., Kazimierczak R., Hallmann E. Red Horse Chestnut and Horse Chestnut Flowers and Leaves: A Potential and Powerful Source of Polyphenols with High Antioxidant Capacity. *Molecules*. 2022;27(7):2279. DOI: 10.3390/molecules27072279.
16. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. In 4 volumes. 14th ed. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation Federations; 2018. (In Russ.)
17. Komarova N. V. A practical guide to the use of Capillary electrophoresis systems. St. Petersburg: Veda; 2006. 213 p. (In Russ.)
18. Chistyakova A. S., Gudkova A. A., Sorokina A. A., Slivkin A. I. Comparative study of the amino acid composition of representatives of the series *Persicariaeformes* Kom. and *Lapathiiformes* Worosch. *Chemistry of plant raw material*. 2019;4:157–162. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2019044347.
19. Oleshko G. I., Yarygina T. I., Zorina E. V., Reshetnikova M. D. Development of a unified procedure to measure the sum of free amino acids in raw medicinal plant materials and extraction preparations. *Pharmacy*. 2011;3:14-17. (In Russ.)
20. Azhikova A. K. Quantitative determination of amino acids in leaves of *Ginkgo biloba* L. In: Modern trends in the development of health-saving technologies: Collection of proceedings of the Seventh Scientific Conference with international participation. Moscow. December 19, 2019. Volume 12. Moscow: FGBNU VILAR; 2019. P. 151–155. (In Russ.)
21. Trineeva O. V. Determination of amino acids in pharmaceutical substances of plant origin by physicochemical methods (using the example of sea buckthorn fruits and stinging nettle leaves). In: Contemporary New aspects of the use of plant raw materials and raw materials of natural origin in medicine: 5th scientific and practical conference. March 15, 2017. Moscow. 2017. P. 222–225. (In Russ.)
22. Li O. N., Tyrtyshnikova A. V., Kropotov A. V., Sedyh T. N. Antioxidant properties of a combined medicine containing amberic acid with thermal influence on the organism. *Pacific Medical Journal*. 2021;1:76–79. (In Russ.) DOI: 10.34215/1609-1175-2021-1-76-79.
23. Shahmardanova S. A., Gulevskaja O. N., Hananashvili Ya. A., Zelenskaya A. V., Nefedov D. A., Galenko-Jaroshevsky P. A. Preparations of succinic and fumaric acids as a means of prevention and treatment of various diseases. *Zhurnal fundamental'noj mediciny i biologii*. 2016;3:16–30. (In Russ.)
24. Ardatskaya M. D., editor. Butyric acid and inulin in clinical practice: theoretical aspects and possibilities of clinical application. Moscow: Forte print. 2014. 64 p. (In Russ.)
25. Gothals L., Gorbakova A. Comparative characteristics of butyrates. *Kombikorma*. 2014;5:43-46. (In Russ.)
26. Abd Alsaheb R. A., Aladdin A., Othma N. Z., Abd Malek R., Mei Leng O., Aziz R., El Enshasy H. A. Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2015;7(10):729–735
27. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Voropaeva S. S. Determination of organic acids in leaves of stinging nettle. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2013;2:215–219. (In Russ.)
28. Kadyrova R. G., Kabirov G. F., Mullahmetov R. R. Aspartic acid salts synthesis of alkali and alkaline-earth metals. *Uchenye zapiski KGAVM im. N. E. Baumana*. 2012;1:156–161.
29. Razvodovsky Yu. E., Smirnov V. Yu., Doroshenko E. M., Pereverzev V. A., Maksimovich N. E., Semenenya I. N. Effects of combined administration of L-arginine and omega-3 polyunsaturated fatty acids on the spectrum of free amino acids and biogenic amines in the cortex of large hemispheres of rats undergoing subtotal cerebral ischemia. *Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*. 2021;20(2):5–11. (In Russ.)
30. Lysikov Yu. A. Amino acids in human nutrition. *Experimental & clinical gastroenterology*. 2012;2:88–105. (In Russ.)
31. Gafurov B. G. Efficacy of the anti-edema drug L-lysine escinate in stroke. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii imeni S. S. Korsakova. Specvypuski*. 2012;112(12–2):31–34. (In Russ.)

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.074

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1638

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка и валидация методики количественного определения полипренолов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии

Н. С. Попов[1], А. А. Антипина[2]✉, С. В. Савинцев[3], В. Ю. Балабаньян[4]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России). 170100, Россия, г. Тверь, ул. Советская, д. 4
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). 119991, Россия, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1
[3] Индивидуальный предприниматель Савинцев Сергей Владимирович. Россия, г. Москва
[4] 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:** Антипина Анастасия Андреевна. **E-mail:** antipina_aa@rambler.ru

ORCID: Н. С. Попов – https://orcid.org/0000-0002-1792-7414; А. А. Антипина – https://orcid.org/0000-0002-8970-3495;
С. В. Савинцев – https://orcid.org/0009-0000-5639-5548; В. Ю. Балабаньян – https://orcid.org/0000-0002-5744-7060.

Статья поступила: 03.11.2023 **Статья принята в печать:** 19.04.2024 **Статья опубликована:** 19.04.2024

Резюме

Введение. Полипренолы представляют собой класс длинноцепочечных изопреноидных спиртов природного происхождения. Полипренолы являются природными биорегуляторами, принимающими непосредственное участие в синтезе гликопротеинов клеточных мембран, обладают выраженной гепатопротекторной активностью, а также иными видами фармакологического действия, что обуславливает интерес к данным веществам как к перспективному лекарственному средству. Определение суммы полипренолов в экстракционных препаратах является нетривиальной задачей, требующей разработки и внедрения точных и воспроизводимых аналитических методик, которые впоследствии будут использованы в стандартизации.

Цель. Разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики идентификации и количественного определения полипренолов.

Материалы и методы. Хроматографическое разделение полипренолов выполняли с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США), элюирование проводили смесью метанола, *н*-гексана, пропанола-2, водного раствора аммония ацетата в градиентном режиме. Детектором выступал масс-спектрометр типа «тройной квадруполь» AB Sciex QTrap® 3200MD (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур), регистрацию полипренолов осуществляли по определенным аддуктам.

Результаты и обсуждение. В ходе эксперимента разработаны условия хроматографического разделения и детектирования полипренолов. Разработанная методика валидирована по следующим характеристикам: специфичности, пределу обнаружения, пределу количественного определения, линейности, правильности, прецизионности, диапазону применения, устойчивости.

Заключение. Практическая значимость проделанной работы заключается в возможности применения разработанной методики в целях установления содержания полипренолов в лекарственных препаратах или фармацевтических субстанциях. С помощью разработанной методики было установлено содержание полипренолов в субстанции, полученной из гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) и ели обыкновенной (*Picea abies* L.).

Ключевые слова: полипренолы, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, ВЭЖХ-МС/МС, валидация

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

Вклад авторов. Н. С. Попов разрабатывал и валидировал методику определения полипренолов. А. А. Антипина получала субстанцию полипренолов из *Picea abies* L. и *Ginkgo biloba* L. и валидировала методику их определения. С. В. Савинцев получал субстанцию полипренолов из *Picea abies* L. и *Ginkgo biloba* L. В. Ю. Балабаньян был ответственен за организационные вопросы, касающиеся исследования. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Попов Н. С., Антипина А. А., Савинцев С. В., Балабаньян В. Ю. Разработка и валидация методики количественного определения полипренолов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):133–141. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1638

Development and validation of the chromatography-mass spectrometry technique for polyprenols quantitative assessment

Nikita S. Popov[1], Anastasiia A. Antipina[2]✉, Sergey V. Savintsev[3], Vadim Y. Balabanyan[4]

[1] Tver State Medical University. 4, Sovetskaya str., Tver, 70100, Russia
[2] Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskie Gory str., Moscow, 119991, Russia
[3] Individual entrepreneur Sergey V. Savintsev. Moscow, Russia
[4] N. I. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov RNRMU). 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

✉ **Corresponding author:** Anastasiia A. Antipina. **E-mail:** antipina_aa@rambler.ru

ORCID: Nikita S. Popov – https://orcid.org/0000-0002-1792-7414; Anastasiia A. Antipina – https://orcid.org/0000-0002-8970-3495;
Sergey V. Savintsev – https://orcid.org/0009-0000-5639-5548; Vadim Yu. Balabanyan – https://orcid.org/0000-0002-5744-7060.

Received: 03.11.2023 **Accepted:** 19.04.2024 **Published:** 19.04.2024

© Попов Н. С., Антипина А. А., Савинцев С. В., Балабаньян В. Ю., 2024
© Popov N. S., Antipina A. A., Savintsev S. V., Balabanyan V. Yu., 2024

Abstract
Introduction. Polyprenols are known as a class of natural long-chain isoprenoid alcohols, which are natural bioregulators that directly participate in the synthesis of cell membrane glycoproteins. Their hepatoprotective activity is proven, as well other types of their pharmacological effects are known, which is the reason of significant interest in these substances as a promising medicinal product. It is non-trivial task to determine the sum of polyprenols in extracts as include design and implementation of accurate reproducible analytical methods, which will subsequently be used in standardization.
Aim. Development and validation of the chromatographic-mass spectrometric technique for polyprenols identification and their quantitative assessment.
Materials and methods. Chromatographic separation of polyprenols was performed by using an HPLC Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США); with the mixture of methanol, *n*-hexane, propanol-2, and aqueous ammonium acetate solution as eluent in gradient mode. An AB Sciex QTrap® 3200MD (AB Sciex Pte. Ltd., Singapore) triple quadrupole mass spectrometer was used as a detector, with the registration of polyprenols adducts.
Results and discussion. The conditions for chromatographic separation and detection of polyprenols were identified. The developed technique was validated for the following characteristics: specificity, limit of detection, limit of quantification, linearity, accuracy, precision, range of application, and stability.
Conclusion. It was determined the content of polyprenols in the substance recieved from *Ginkgo biloba* L. and *Picea abies* L. The developed technique can be used in the future to assess the content of polyprenols in drug products or pharmaceutical substances.

Keywords: polyprenols, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, HPLC-MS/MS, validation

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

Contribution of the authors. Nikita S. Popov developed and validated the technique of polyprenols determination. Anastasiia A. Antipina obtained polyprenols substance from *Picea abies* L. and *Ginkgo biloba* L. and validated the technique of their determination. Sergey V. Savintsev obtained polyprenols substance from *Picea abies* L. and *Ginkgo biloba* L., Vadim Y. Balabanyan was responsible for the organization of the study. All authors participated in discussing the results and writing the text of the article.

For citation: Popov N. S., Antipina A. A., Savintsev S. V., Balabanyan V. Yu. Development and validation of the chromatography-mass spectrometry technique for polyprenols quantitative assessment. *Drug development & registration*. 2024;13(2):133–141. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1638

ВВЕДЕНИЕ

Полипренолы представляют собой класс природных длинноцепочечных изопреноидных спиртов с общей формулой H—$(C_5H_8)_n$—H, где *n* – число изопреновых единиц, соединенных в положении «голова – хвост», с гидроксильной группой на одном конце и атомом водорода на другом [1]. Полипренолы являются природными биорегуляторами, принимающими непосредственное участие в синтезе гликопротеинов клеточных мембран, обладают выраженной гепатопротекторной активностью, а также иными видами фармакологического действия, что обуславливает интерес к данным веществам как к перспективному лекарственному средству [2]. Так, известно, что полипренолы оказывают нейропротекторный [3, 4], гепатопротекторный [5, 6] и гиполипидемический [5, 7] эффект. Кроме того, полипренолы обладают выраженной антиоксидантной [2, 8, 9] активностью. Возможны иные виды фармакологического действия [10–12]. Мицеллы из производных полипренолов могут быть рассмотрены в качестве системы доставки лекарственных средств [13]. Основными источниками получения субстанции полипренолов являются гинкго двулопастный (*Ginkgo biloba* L.) и хвойные деревья, такие как пихта сибирская (*Abies sibirica* L.), ель обыкновенная (*Picea abies* L.), сосна сибирская (*Pinus sibirica* L.), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) [1]. Готовые извлечения из растительного сырья представляют собой сложные смеси гомологов полипренолов и сопутствующих веществ, что требует внедрения особых подходов к стандартизации полученных продуктов. В настоящее время основными методами идентификации и количественного определения полипренолов являются тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ). Применение ВЭЖХ-УФ требует осуществления сложной процедуры пробоподготовки, включающей удаление мешающих компонентов и дериватизацию, например, с антрацен-9-карбоновой кислотой или фенилхлорформиатом с целью повышения чувствительности анализа. Кроме того, в силу физико-химических свойств полипренолов одной из трудностей анализа остается полное разделение хроматографических пи-

ков гомологичных веществ [2, 14–17]. Применение масс-спектрометров в качестве детекторов при проведении хроматографического анализа в большинстве случаев решает проблему селективности. Однако масс-спектрометрическая детекция полипренолов имеет ряд особенностей: во-первых, данные вещества не образуют стабильных и характерных ионов-продуктов, что делает невозможным использование мониторинга множественных реакций по причине низкого ионного тока; во-вторых, из-за низкой способности к ионизации детектирование полипренолов возможно только по определенным аддуктам [17–19]. Существенной проблемой при разработке методик количественного определения полипренолов является отсутствие коммерческих аналитических стандартов на отдельные вещества [16]. Доступные продукты содержат комбинации полипренолов с обозначением общей концентрации гомологов из определенного диапазона без указания соотношения компонентов. Отсутствие данных о зависимости площади хроматографического пика каждого гомолога от его индивидуальной концентрации оставляет открытым вопрос правильного построения общей калибровочной зависимости. Использование с этой целью суммы площадей отдельных хроматографических пиков всех определяемых гомологов [16] требует дополнительных обоснований. Отдельной проблемой хроматографического анализа полипренолов является выбор внутреннего стандарта (IS). Таким образом, количественное определение суммы полипренолов в экстракционных препаратах является нетривиальной задачей, требующей разработки и внедрения точных и воспроизводимых аналитических методик.

Цель исследования: разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики идентификации и количественного определения полипренолов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение полипренолов выполняли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США), оснащенного четырехканальным градиентным насосом (G7111B) со встроенным блоком дегазации, автосамплером (G7129A), термостатом колонок (G1316A). В роли детектора выступал тандемный масс-спектрометр типа «тройной квадруполь» AB Sciex QTrap® 3200MD (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур). Для обработки первичных данных хроматографического анализа применяли программное обеспечение (ПО) AB Sciex Analyst 1.3.6, статистический анализ результатов осуществляли посредством использования ПО StatPlus (AnalystSoft Inc., США).

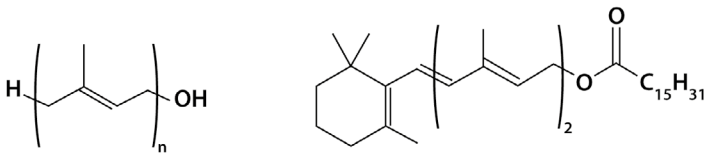
При разработке аналитической методики применяли следующее оборудование: весы аналитические ВЛ-124В (ООО «НПП «Госметр», Россия), шейкер орбитальный OS-20 (Biosan, Латвия), вортекс V-1 plus (Biosan, Латвия), автоматические пипетки переменного объема Eppendorf Researc® plus (Eppendorf AG, Германия), термостатируемый шейкер TS-100C (Biosan, Латвия). Хранение анализируемых образцов и стандартных растворов осуществляли в морозильных шкафах LGT 3725 и GGv 5010 (LIEBHERR, Австрия) соответственно. Деионизированную воду получали с помощью лабораторной системы очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция).

Для приготовления анализируемых растворов и подвижной фазы использовали стеклянные мерные колбы и цилиндры различного объема (класс точности 1). Хроматографическое разделение полипренолов выполняли на аналитической колонке InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies, США) в сочетании с предколонкой ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 12,5 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США).

Реактивы и растворы

Для разработки методики использовали стандартный раствор полипренолов С70 – С100 с суммарной концентрацией 10 мг/мл в гексане (Larodan AB, Швеция). В качестве внутреннего стандарта использовали ретинилпальмитат (АО «Ретиноиды», Россия) (рисунок 1).

Для приготовления растворов и проведения хроматографического анализа использовали метанол (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), пропанол-2 (PanReac AppliChem, Испания), *н*-гексан (PanReac AppliChem, Испания), аммония ацетат (Merck KGaA, Германия).



А
A

Б
B

Рисунок 1. Общая структурная формула полипренолов (А), где *n* = 14–20, и ретинилпальмитата (Б) (внутренний стандарт)

Figure 1. General structural formula of polyprenols (A), where *n* = 14–20, and retinyl palmitate (B) (internal standard)

Объекты исследования

Количественное содержание полипренолов определяли в субстанции, полученной методом экстракции органическими растворителями с последующей очисткой посредством колоночной хроматографии из *Picea abies* L. и *Ginkgo biloba* L. в лаборатории индивидуального предпринимателя С. В. Савинцева.

Приготовление калибровочных растворов и подвижной фазы

В качестве подвижной фазы с малой элюирующей силой (элюент А) использовали 2 мМ раствор аммония ацетата в 98%-м метаноле, приготовленный по следующей методике: в мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 20 мл водного раствора аммония ацетата с концентрацией 100 мМ, после чего доводили до метки метанолом. В роли подвижной фазы с большой элюирующей силой (элюент В) использовали комбинированный раствор, приготовленный путем смешивания в мерной колбе объемом 1000 мл 450 мл пропанола-2, 450 мл *н*-гексана, 20 мл 100 мМ водного раствора аммония ацетата и доведения объема до метки метанолом. Срок хранения элюентов составлял 30 суток.

Калибровочные растворы с суммарной концентрацией полипренолов (С70 – С100) 500, 1000, 2500, 5000, 10 000, 15 000, 20 000 и 25 000 нг/мл готовили из исходного стандартного раствора посредством растворения в элюенте А. Раствор внутреннего стандарта (ретинилпальмитат) готовили на метаноле с концентрацией 20 000 нг/мл. Полученные растворы хранили при температуре –28 °С и использовали по мере необходимости для анализа.

Пробоподготовка испытуемого образца

100 мг (точная навеска) субстанции полипренолов отвешивали на аналитических весах в пробирку Эппендорфа объемом 2 мл, добавляли 1 мл *н*-гексана, перемешивали на вортексе в течение 15 с, после чего полученный раствор переносили в мерную колбу объемом 50 мл. Затем пробирку Эппендорфа промывали *н*-гексаном, раствор также переносили в колбу. Общий объем *н*-гексана составил 5 мл. Содержимое колбы доводили до метки пропанолом-2. Полученный раствор разбавляли в 100 раз элюентом А, 100 мкл переносили в полиэтиленовые вставки в хроматографические виалы, добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта, тщательно перемешивали и использовали для последующего хроматографического анализа.

Условия проведения анализа методом ВЭЖХ-МС/МС

В таблице 2 приведены условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования полипренолов, которые были подобраны с учетом их физико-химических свойств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Подбор оптимальных условий масс-спектрометрического детектирования аналитов и внутреннего стандарта выполняли посредством прямого ввода в масс-спектрометр комбинированного раствора полипренолов 500 нг/мл в смеси пропанола-2, *н*-гексана и 2 мМ водного раствора аммония ацетата (18:1:1) и раствора ретинилпальмитата в 2 мМ растворе аммония ацетата на 98%-м метаноле со скоростью 10 мкл/мин. Анализируемые вещества подвергали положительной ионизации электрораспылением.

Так как полипренолы плохо образуют протонированные молекулярные ионы, их детекцию осуществляли по соответствующим аддуктам ($[M + NH_4]^+$; $[M + H]^+ – CH_3$) [16]. Детектирование аналитов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) не позволяет достичь необходимого уровня чувствительности из-за слабого ионного тока ионов-продуктов полипренолов. Вследствие этого полипренолы определяли по ионному току молекулярных аддуктов в режиме SIM. В таблице 1 приведены оптимальные параметры детектирования, подобранные для достижения максимального уровня чувствительности. На рисунке 2 отображен масс-спектр первого порядка аддуктов полипренолов и внутреннего стандарта.

С учетом выраженных гидрофобных свойств полипренолов в ходе проведения эксперимента были подобраны оптимальные условия хроматографического анализа, включая использование в качестве подвижной фазы с высокой элюирующей силой комбинации растворителей (гексан, изопропанол и метанол). Применение распространенных в обращенно-фазовой ВЭЖХ компонентов подвижной фазы, таких как ацетонитрил и метанол, не позволило достичь элюирования полипренолов из колонки с октадецилсиликагелевым сорбентом в течение 40 минут при скорости потока до 1 мл/мин. Таким образом, по результатам эксперимента были разработаны состав подвижной фазы и оптимальный режим градиентного элюирования, указанные в таблице 2. Пример общей хроматограммы стандартного образца полипренолов 14–20) с суммарной концентрацией 20 000 нг/мл представлен на рисунке 3.

Валидация методики

Валидацию методики количественного определения полипренолов в субстанции методом ВЭЖХ-МС/МС проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.10012 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания и Руководства по валидации аналитических методик ЕАЭС от 17.07.2018 г. по следующим характеристикам: специфичности, пределу обнаружения, пределу количественного определения (ПКО), линейности, правильности, прецизионности, диапазону применения, устойчивости.

Таблица 1. Параметры масс-спектрометрического детектирования полипренолов и ретинилпальмитата (IS)

Table 1. Parameters for polyprenols and retinyl palmitate (IS) mass spectrometric detection

Источник ионов Ion source			**Turbo Ion Spray**	
Режим ионизации Ionization mode			Положительный Positive	
Температура источника ионов, °C Ion source temperature, °C			300	
Напряжение ионизации, В Ionization voltage, V			5500	
Давление газа-завесы, psi/кПа Curtain gas pressure, psi/kPa			10/69	
Давление газа-распылителя, psi/кПа Spray gas pressure, psi/kPa			30/207	
Давление газа-нагревателя, psi / кПа Heater gas pressure, psi/kPa			40/276	
Потенциал на входе в ячейку соударений (EP), В Potential at the entrance to the impact cell (EP), V			10	
Аналит Analyte	**m/z**	**Dwell, мс** Dwell ms	**DP, V**	**CEP, eV**
Полипренол-14 (C70) Polyprenol-14 (C70)	989,0 954,3	100	68 90	54 53
Полипренол-15 (C75) Polyprenol-15 (C75)	1057,1 1022,6	100	68 95	57 56
Полипренол-16 (C80) Polyprenol-16 (C80)	1125,2 1090,5	100	77 70	61 59
Полипренол-17 (C85) Polyprenol-17 (C85)	1193,2 1159,2	100	84 70	64 62
Полипренол-18 (C90) Polyprenol-18 (C90)	1261,3 1227,3	100	88 70	66 65
Полипренол-19 (C95) Polyprenol-19 (C95)	1329,3 1295,1	100	92 70	69 67
Полипренол-20 (C100) Polyprenol-20 (C100)	1397,4 1363,6	100	94 70	72 70
Ретинилпальмитат (IS) Retinyl palmitate (IS)	525,5	100	160	30

Специфичность

Специфичность методики подтверждали путем сравнительного анализа хроматограмм растворителя, стандартного раствора полипренолов, раствора испытуемой субстанции полипренолов, в том числе с добавлением IS и без него.

По результатам анализа установлено, что на хроматограммах растворителя отсутствуют пики, по времени удерживания соответствующие полипренолам и IS (рисунок 4 А). Кроме того, выявлено отсутствие пика IS на хроматограммах стандартного раствора (рисунок 4 Б) и испытуемых образцов субстанции полипренолов (рисунок 4 Г).

Предел обнаружения

Для разрабатываемой методики установлено значение предела обнаружения 100 нг/мл. При этом соотношение «сигнал/шум» на хроматограммах для отдельных гомологов полипренолов составило не менее 4,5 : 1.

Линейность

По причине отсутствия доступных аналитических стандартов с известным содержанием каждого гомолога полипренолов требуется доказательство возможности использования суммы площадей хроматографических пиков всех анализируемых веществ для построения калибровочной зависимости. Так как с увеличением концентрации стандартных растворов прирост хроматографического сигнала для разных веществ может быть неравномерным, требуется провести сравнительный анализ калибровочной зависимости по каждому отдельному гомологу полипренолов.

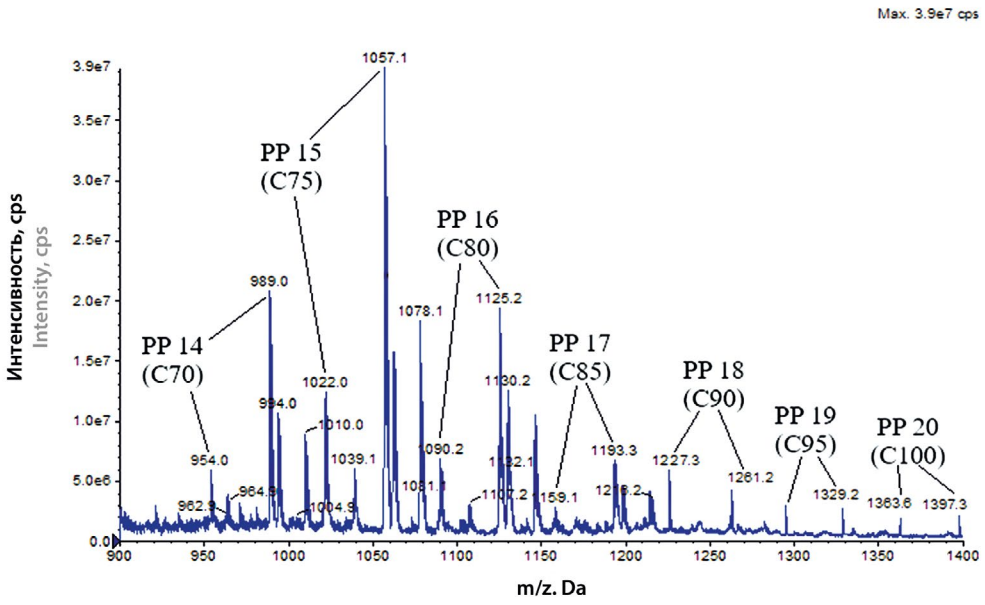


Рисунок 2. Масс-спектр первого порядка (MS) аддуктов полипренолов в режиме регистрации положительных ионов

Figure 2. First-order mass spectrum (MS) of polyprenol adducts in positive ion mode

По результатам анализа установлено, что относительное стандартное отклонение (CV) значений угловых коэффициентов наклона кривых не превышает 15 % (таблица 3), что делает возможным построение калибровочной зависимости общей площади всех пиков аналитов от суммарной концентрации пролипренолов в стандартном растворе.

Таблица 2. Хроматографические параметры определения полипренолов

Table 2. Chromatographic parameters of polyprenols determination

<table>
<tr><td>Элюент А
Eluent A</td><td colspan="4">98 % метанола + 2 % водного раствора аммония ацетата 100 мМ
98 % methanol + 2 % aqueous ammonium acetate solution 100 mM</td></tr>
<tr><td>Элюент В
Eluent B</td><td colspan="4">45 % пропанола-2 + 45 % н-гексана + 8 % метанола + 2 % водного раствора аммония ацетата 100 мМ
45 % propanol-2 + 45 % n-hexane + 8 % methanol + 2 % aqueous ammonium acetate solution 100 mM</td></tr>
<tr><td>Хроматографическая колонка
Chromatographic column</td><td colspan="4">InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 µm</td></tr>
<tr><td>Защитная колонка
Guard Cartridge</td><td colspan="4">ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 12,5 мм, 5 мкм
ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6×12.5 mm, 5 µm</td></tr>
<tr><td rowspan="6">Программа градиента
Gradient program</td><td>Время, мин
Time, min</td><td>Скорость потока, мкл/мин
Flow rate, µl/min</td><td>% А</td><td>% В</td></tr>
<tr><td>0,0</td><td rowspan="5">400</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>7,0</td><td>0</td><td>100</td></tr>
<tr><td>11,0</td><td>0</td><td>100</td></tr>
<tr><td>11,01</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>16,0</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>Промывка иглы инжектора
Injector needle flushing</td><td colspan="4">Смесь пропанола-2 и н-гексана 9 : 1, 5 с
Mixture of propanol-2 and n-hexane 9 : 1, 5 s</td></tr>
<tr><td>Температура колонки, °С
Column temperature, °С</td><td colspan="4">30</td></tr>
<tr><td>Объем ввода, мкл
Injection volume, µl</td><td colspan="4">10</td></tr>
<tr><td rowspan="9">Время удерживания, мин
Retention time, min</td><td colspan="2">Полипренол-14 (С70)
Polyprenol-14 (C70)</td><td colspan="2">10,6</td></tr>
<tr><td colspan="2">Полипренол-15 (С75)
Polyprenol-15 (C75)</td><td colspan="2">10,8</td></tr>
<tr><td colspan="2">Полипренол-16 (С80)
Polyprenol-16 (C80)</td><td colspan="2">11,0</td></tr>
<tr><td colspan="2">Полипренол-17 (С85)
Polyprenol-17 (C85)</td><td colspan="2">11,2</td></tr>
<tr><td colspan="2">Полипренол-18 (С90)
Polyprenol-18 (C90)</td><td colspan="2">11,3</td></tr>
<tr><td colspan="2">Полипренол-19 (С95)
Polyprenol-19 (C95)</td><td colspan="2">11,5</td></tr>
<tr><td colspan="2">Полипренол-20 (С100)
Polyprenol-20 (C100)</td><td colspan="2">11,6</td></tr>
<tr><td colspan="2">Ретинилацетат (IS)
Retinyl palmitate (IS)</td><td colspan="2">3,5</td></tr>
</table>

Таблица 3. Значения угловых коэффициентов уравнений регрессии зависимости площадей хроматографических пиков отдельных полипренолов от их суммарной концентрации

Table 3. Values of the angular coefficients of the regression equations of the dependence of the areas of chromatographic peaks of individual polyprenols on their total concentration

Аналит Analyte	**Угловой коэффициент уравнения регрессии** Angular coefficient of regression equation	**Коэффициент корреляции, *r*** Correlation coefficient, *r*
Полипренол-14 (С70) Polyprenol-14 (C70)	38,4	0,9996
Полипренол-15 (С75) Polyprenol-15 (C75)	43,8	0,9988
Полипренол-16 (С80) Polyprenol-16 (C80)	39,4	0,9992
Полипренол-17 (С85) Polyprenol-17 (C85)	45,2	0,9974
Полипренол-18 (С90) Polyprenol-18 (C90)	38,1	0,9968
Полипренол-19 (С95) Polyprenol-19 (C95)	34,5	0,9992
Полипренол-20 (С100) Polyprenol-20 (C100)	29,4	0,9963
Среднее значение Mean value	38.4	
Стандартное отклонение Standard deviation	5,4	
CV, %	14,0	

Линейность методики устанавливали по результатам хроматографического анализа 8 калибровочных растворов с суммарной концентрацией полипренолов 500, 1000, 2500, 5000, 10 000, 15 000, 20 000 и 25 000 нг/мл в трех повторах. Градуировку проводили по отношению суммы площадей пиков полипренолов к площади пика IS. Калибровочная зависимость нормированной на IS суммарной площади пиков аналитов от их общей концентрации представлена в виде уравнения линейной регрессии $y = 0{,}0004x + 0{,}2005$ (рисунок 5). Коэффициент корреляции (r) составил 0,9996, что соответствует установленным требованиям (не менее 0,9900).

Правильность

По причине отсутствия свободного от полипренолов плацебо опытные образцы для определения правильности методики были приготовлены на 98%-м метаноле с суммарной концентрацией 2000, 6000, 12 000, 18 000 и 24 000 нг/мл. По результатам хроматографического анализа рассчитывали содержание суммы полипренолов в опытных образцах. Правильность определяли по значениям открываемости в процентах. Каждый опытный образец был проанализирован в трех повторах.

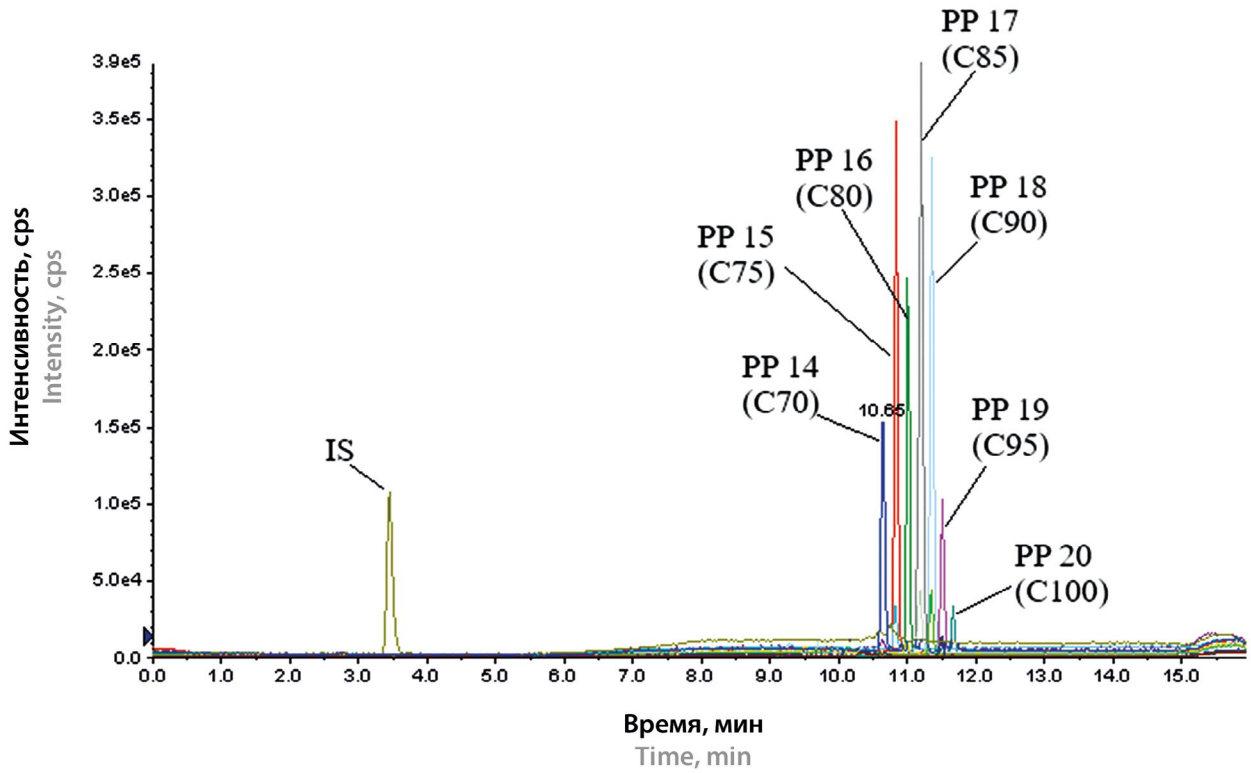


Рисунок 3. Общая хроматограмма стандартного образца полипренолов (14–20) с суммарной концентрацией 20 000 нг/мл

Figure 3. General chromatogram of a standard sample of polyprenols (14–20) with a total concentration of 20 000 ng/m

Полученные результаты отвечают критериям приемлемости. Среднее относительное значение суммарного содержания полипренолов в опытных образцах находится в пределах доверительного интервала для средних значений открываемости).

Результаты оценки правильности определения полипренолов:

- Среднее значение открытия Z, % – 99,11.
- Дисперсия (S^2) – 9,58.
- Стандартное отклонение (σ) – 3,09.
- Коэффициент вариации (CV), % – 3,12.
- Стандартная ошибка среднего (SEM) – 0,80.
- Число степеней свободы, f – 14.
- Критическое значение t-критерия Стьюдента (p = 0,05) – 2,14.
- Доверительный интервал ($\pm\Delta Z$), % – 1,57.
- Нижняя граница доверительного интервала, % – 97,55.
- Верхняя граница доверительного интервала, % – 100,68.

Прецизионность

В соответствии с требованиями ОФС.1.10012 прецизионность методики оценивали по показателю повторяемости (сходимости) (таблица 4). С этой целью проводили анализ содержания полипренолов в 6 образцах субстанции, полученной из *Ginkgo biloba* L. Пробоподготовку образцов осуществляли по вышеописанной методике, после чего каждый раствор анализировали по 3 раза, затем были рассчитаны величины средней концентрации полипренолов в образце, а также дисперсия. Для оценки однородности распределения дисперсий использовали критерий Кохрена. Было установлено, что рассчитанное значение критерия не превышало критическое (p = 0,95; f = 17) .

Диапазон применения

Исходя из полученных результатов оценки линейности, правильности и прецизионности, сделан вывод, что аналитическая область разработанной методики составляет от 0,5 (ПКО) до 25 мкг/мл, что соответствует содержанию полипренолов (С70 – С100) в субстанции в диапазоне от 2,5 до 125 %.

Устойчивость

Валидируемая методика не содержит параметров, на которые могут оказывать влияние неконтролируемые отклонения в условиях анализа или окружающей среды. При замене хроматографической колонки следует проводить верификацию методики по параметру «прецизионность».

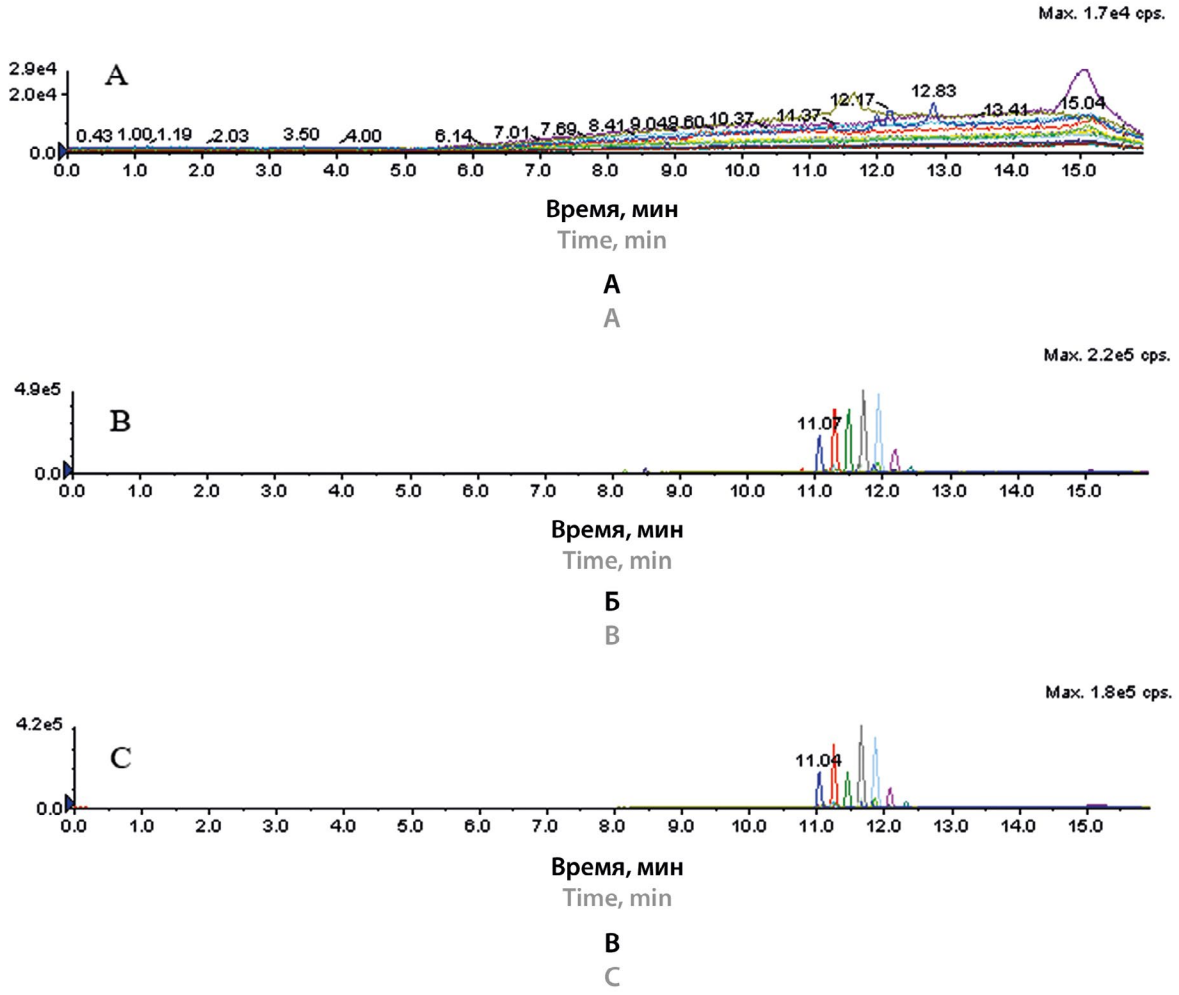


Рисунок 4. **Хроматограммы растворителя (А), образца субстанции (Б) и стандартного раствора (В) полипренолов**

Figure 4. **Chromatograms of solvent (A), sample substance (B) and standard solution (C) of polyprenols**

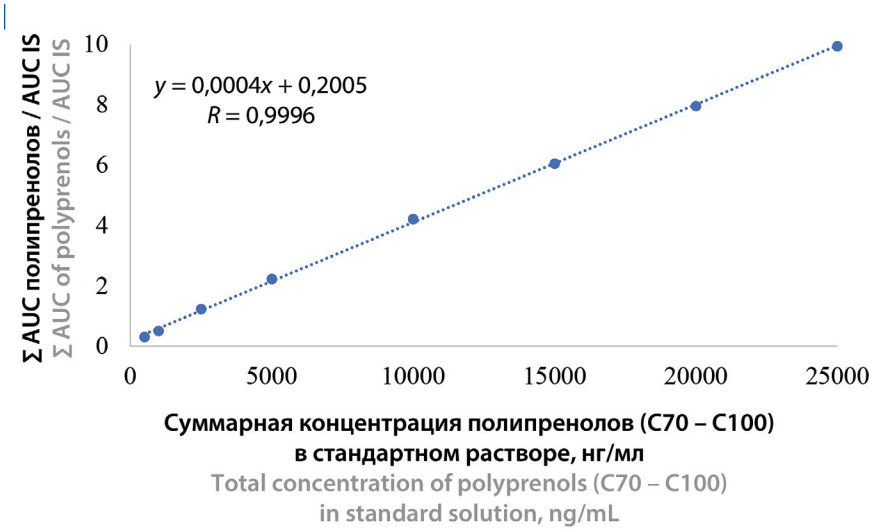


Рисунок 5. **Калибровочный график зависимости нормированной на IS суммарной площади пиков (AUC) полипренолов (С70 – С100) от их общей концентрации в стандартном растворе**

Figure 5. **Calibration plot of the IS-normalized total peak area (AUC) of polyprenols (C70 – C100) versus their total concentration in the standard solution**

Таблица 4. Результаты оценки сходимости при количественном определении полипренолов

Table 4. Results of convergence assessment in polyprenols quantification

Образец Sample	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
∑ AUC полипренолов / AUC IS ∑ AUC of polyprenols / AUC IS	6,40	6,35	6,24	5,90	6,40	6,17
	6,23	6,36	6,39	6,08	6,21	6,33
	6,43	6,36	6,37	6,22	6,48	6,24
Установленная концентрация в образце, нг/мл Determined concentration in sample, ng/ml	15493	15369	15088	14254	15497	14919
	15079	15387	15463	14691	15013	15317
	15568	15402	15430	15052	15702	15094
Содержание полипренолов (C70 – C100) в субстанции, % Content of polyprenols (C70 – C100) in the substance, %	77,47	76,85	75,44	71,27	77,49	74,60
	75,39	76,94	77,32	73,46	75,07	76,59
	77,84	77,01	77,15	75,26	78,51	75,47
Среднее значение, % Mean value, %	76,90	76,93	76,64	73,33	77,02	75,55
Дисперсия Dispersion	1,74	0,01	1,08	4,00	3,12	1,00

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения полипренолов с применением ВЭЖХ-МС/МС. Практическая значимость проделанной работы заключается в возможности применения разработанной методики в целях установления содержания отдельных гомологов полипренолов (C70 – C100) в лекарственных препаратах или фармацевтических субстанциях. Так, с помощью данной методики было выявлено, что в субстанции полипренолов, полученной из *Ginkgo biloba* L., фракция C70 – C100 составляет в среднем 76 %. По результатам анализа субстанции, полученной из *Picea abies* L., установлено, что она состоит из полипренолов C70 – C100 в среднем на 95 %. Диапазон применения разработанной методики составляет от 2,5 до 125 %.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vanaga I., Gubernator J., Nakurte I., Kletnieks U., Muceniece R., Jansone B. Identification of *Abies sibirica* L. polyprenols and characterisation of polyprenol-containing liposomes. *Molecules*. 2020;25(8):1801. DOI: 10.3390/molecules25081801.
2. Antipina A. A., Balabaniyan V. Yu., Approaches to producing, purifying, and standardizing polyprenols. *Farmaciya (Pharmacy)*. 2021;70(6):15–19. DOI: 10.29296/25419218-2021-06-03. (In Russ.)
3. Khodanovich M. Y., Pishchelko A. O., Glazacheva V. Y., Pan E. S., Krutenkova E. P., Trusov V. B., Yarnykh V. L. Plant polyprenols reduce demyelination and recover impaired oligodendrogenesis and neurogenesis in the cuprizone murine model of multiple sclerosis. *Phytotherapy Research*. 2019;33(5):1363–1373. DOI: 10.1002/ptr.6327.
4. Liu L., Wang Y., Zhang J., Wang S. Advances in the chemical constituents and chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaf, extract, and phytopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113704. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113704.
5. Vyshlov E. V., Tsoy E. I., Sultanov V. S. Trusov V. B., Ryabov V. V. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of a polyprenol-containing drug in patients with acute coronary syndrome. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;165:319–321. DOI: 10.1007/s10517-018-4159-x.
6. Yang L., Wang C.-Z., Ye J.-Z., Li H.-T. Hepatoprotective effects of polyprenols from *Ginkgo biloba* L. leaves on CCl_4-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*. 2011;82(6):834–840. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.04.009.
7. Tsoi E. I., Vyshlov E. V., Ryabov V. V. Positive effect of polyprenol-containing drug on anxiety, depression and cognitive disorders in patients with acute coronary syndrome. *European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care*. 2021;10(1):107. DOI: 10.1093/ehjacc/zuab020.107.
8. Boateng I. D. Polyprenols in *Ginkgo biloba*; a review of their chemistry (synthesis of polyprenols and their derivatives), extraction, purification, and bioactivities. *Food Chemistry*. 2023;136006. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136006.
9. Boateng I. D., Soetanto D. A., Li F., Yang X.-M., Li Y.-Y. Separation and purification of polyprenols from *Ginkgo biloba* L. leaves by bulk ionic liquid membrane and optimizing parameters. *Industrial Crops and Products*. 2021;70:113828. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.113828.
10. Mamatkulova N. M., Mukarramov N. I., Sasmakov S. A., Khidirova N. K. Polyprenols from Ficus carica Leaves and their Biological Activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 2022;58(4):726–727. DOI: 10.1007/s10600-022-03777-9.
11. Tao R., Wang C.-Z., Ye J.-Z., Zhou H., Chen H.-X., Zhang C.-W. Antibacterial, cytotoxic and genotoxic activity of nitrogenated and haloid derivatives of C_{50}–C_{60} and C_{70}–C_{120} polyprenol homologs. *Lipids in Health and Disease*. 2016;15(1):175. DOI: 10.1186/s12944-016-0345-x.
12. Zhang C.-W., Li M.-F., Tao R., Peng M.-J., Wang Z.-H., Qi Z.-W., Xue X.-Y., Wang C.-Z. Physiochemical property and antibacterial activity of formulation containing polyprenol extracted from *Ginkgo biloba* leaves. *Industrial Crops and Products*. 2020;147:112213. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112213.
13. Yuan H., Zhang C., Zhou P., Yang X., Tao R., Ye J., Wang C. Preparation of polyprenol/poly (β-amino ester)/galactose targeted micelle carrier for enhancing cancer therapy. *Arabian Journal of Chemistry*. 2023;16(5);104679. DOI: 10.1016/j.arabjc.2023.104679.
14. Zhang C.-W., Wang C.-Z., Tao R., Ye J.-Z. Separation of polyprenols from *Ginkgo biloba* leaves by a nano silica-based adsorbent containing silver ions. *Journal of Chromatography A*. 2019;1590:58–64. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.01.047.
15. Řezanka T., Votruba J. Chromatography of long chain alcohols (polyprenols) from animal and plant sources. *Journal of Chromatography A*. 2001;936(1–2):95–110. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01152-9.
16. Yu J., Wang Y., Qian H., Zhao Y., Liu B., Fu C. Polyprenols from the needles of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Fitoterapia*. 2012;83(5);831–837. DOI: 10.1016/j.fitote.2012.01.007.
17. Gharwalová L., Palyzová A., Marešová H., Kolouchová I., Kyselová L., Řezanka T. Identification of homologous polyprenols from thermophilic bacteria. *Microorganisms*. 2021;9(6):1168. DOI: 10.3390/microorganisms9061168.
18. D'Alexandri F. L., Gozzo F. C., Eberlin M. N., Katzin A. M. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of polyisoprenoid alcohols via Li^+ cationization. *Analytical biochemistry*. 2006;355(2):189–200. DOI: 10.1016/j.ab.2006.06.014.
19. Kania M., Skorupinska-Tudek K., Swiezewska E., Danikiewicz W. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry as a valuable method for the identification of polyisoprenoid alcohols. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2012;26(15):1705–1710. DOI: 10.1002/rcm.6280.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.074

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1779

Check for updates

CC BY 4.0

Анализ сортовых преимуществ листовой формы *Apium graveolens* L. по содержанию хлорогеновой кислоты

Е. С. Сурбеева✉, У. А. Ефремова, В. С. Шуракова, Е. В. Вишняков, И. И. Тернинко

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:** Сурбеева Елизавета Сергеевна. **E-mail:** bazanova.elizaveta@pharminnotech.com

ORCID: Е. С. Сурбеева – https://orcid.org/0000-0002-7005-2477; У. А. Ефремова – https://orcid.org/0000-0001-5144-3061;
В. С. Шуракова – https://orcid.org/0009-0001-9938-1549; Е. В. Вишняков – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866;
И. И. Тернинко – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015.

Статья поступила: 04.03.2024 **Статья принята в печать:** 24.04.2024 **Статья опубликована:** 26.04.2024

Резюме

Введение. Изучение сортовых преимуществ сельскохозяйственных растений – актуальное направление исследований ввиду перспективности разработки на их основе продуктов функционального и специализированного питания. Вещества фенольного профиля демонстрируют различные виды фармакологической активности, направленные на терапию метаболических и других социально значимых заболеваний, что позволяет позиционировать их как эффективные функциональные ингредиенты. Листовая ботаническая форма сельдерея пахучего – богатый источник фенольных соединений.

Цель. Разработка и валидация методики количественного анализа хлорогеновой кислоты для оценки сортовых преимуществ сырья *Apium graveolens* L. методом ВЭЖХ.

Материалы и методы. Для анализа использовали высушенную и измельченную траву сельдерея листового разных сортов, выращенную на двух площадках (пос. Лемболово и СНТ «Ручей»). Пробоподготовку сырья проводили путем экстракции на УЗ-ванне. Условия хроматографирования: колонка Luna 5 µm C18(100) Å LC Column 250 × 4.6 мм, температура термостата – 40 °С, длина волны детекции – 327 нм. ПФ А – 0,05 % ТФУ, ПФ Б – ацетонитрил. Режим элюирования: 0 мин – 12 % ПФ Б, 20 мин – 30 % ПФ Б, 23 мин – 12 % ПФ Б.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным, накопление хлорогеновой кислоты в сырье сельдерея зависит как от сорта растения, так и от условий культивирования. Тем не менее существует корреляция между количественным содержанием целевого компонента и сортами, выращенными на разных площадках. Наибольшее содержание хлорогеновой кислоты было отмечено в сорте Нежный (СНТ «Ручей»), оно составило 0,464 ± 0,012. При сравнительной оценке как наиболее перспективный для культивирования в медицинских целях можно выделить сорт Летний бум.

Заключение. Результаты исследования могут быть использованы в разработке и контроле качества функционального и специализированного питания на основе листовой ботанической формы сельдерея пахучего за счет высокого содержания веществ фенольной природы.

Ключевые слова: *Apium graveolens* L., сельдерей листовой, функциональное питание, сортовые преимущества, фенольные соединения, хлорогеновая кислота, ВЭЖХ

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

Вклад авторов. Е. С. Сурбеева – литературный поиск, планирование и выполнение экспериментальной работы, получение и обработка данных, формулирование выводов и написание статьи. В. С. Шуракова – литературный поиск, пробоподготовка образцов, участие в интерпретации данных. У. А. Ефремова – участие в валидационных исследованиях. Е. В. Вишняков – статистическая обработка данных эксперимента. И. И. Тернинко – идея и планирование дизайна эксперимента, редактирование рукописи.

Финансирование. Анализ выполнен на базе Центра коллективного пользования (ЦКП) «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России».

Для цитирования: Сурбеева Е. С., Ефремова У. А., Шуракова В. С., Вишняков Е. В., Тернинко И. И. Анализ сортовых преимуществ листовой формы *Apium graveolens* L. по содержанию хлорогеновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):142–153. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1779

Analysis of varietal advantages of leaf form *Apium graveolens* L. according to chlorogenic acid content

Elizaveta S. Surbeeva✉, Ulyana A. Efremova, Valeria S. Shurakova, Evgeniy V. Vishnyakov, Inna I. Terninko

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

✉ **Corresponding author:** Elizaveta S. Surbeeva. **E-mail:** bazanova.elizaveta@pharminnotech.com

ORCID: Elizaveta S. Surbeeva – https://orcid.org/0000-0002-7005-2477; Ulyana A. Efremova – https://orcid.org/0000-0001-5144-3061;
Valeria S. Shurakova – https://orcid.org/0009-0001-9938-1549; Evgeniy V. Vishnyakov – https://orcid.org/0000-0002-4716-7866;
Inna I. Terninko – https://orcid.org/0000-0002-2942-1015.

Received: 04.03.2024 **Accepted:** 24.04.2024 **Published:** 26.04.2024

© Сурбеева Е. С., Ефремова У. А., Шуракова В. С., Вишняков Е. В., Тернинко И. И., 2024
© Surbeeva E. S., Efremova U. A., Shurakova V. S., Vishnyakov E. V., Terninko I. I., 2024

Abstract
Introduction. Special studies on the benefits of agricultural crops – current research regarding the prospects for the development of their products based on functional and specialized nutrition. Substances with a phenolic profile carry out various types of pharmacological activity aimed at treating metabolic and other socially significant phenomena, which allows them to be positioned as generally accepted main ingredients. The leafy botanical form of celery is a rich source of phenolic compounds.
Aim. Development and validation of a method for the quantitative analysis of chlorogenic acid to assess the varietal advantages of *Apium graveolens* L. raw materials using HPLC.
Materials and methods. For the analysis, we used leaf celery grass of different varieties grown at two sites (the village of Lembolovo and SNT "Ruchey"). Sample preparation of raw materials was carried out by extraction in an ultrasonic bath. Chromatography conditions: column Luna 5 µm C 18(100) Å LC Column 250 × 4.6 mm, thermostat temperature 40 °C, detection wavelength 327 nm. PF A 0.05 % TFA, PF B acetonitrile. Elution mode: 0 min 12 % B, 20 min 30 % PF B, 23 min 12 % PF B.
Results and discussion. According to the data obtained, the accumulation of chlorogenic acid in celery raw materials depends on both the plant variety and the cultivation conditions. However, the difference in the quantitative content of the target component correlates between varieties grown on different sites. The highest content of chlorogenic acid was noted in the variety Nezhny (SNT "Ruchey") and amounted to 0.464 ± 0.012. The variety Summer Boom can be distinguished as the best variety.
Conclusion. The results of the study can be used in the development and quality control of functional and specialized nutrition based on the leafy botanical form of odorous celery due to the high content of phenolic substances.

Keywords: *Apium graveolens* L., leaf celery, functional nutrition, varietal advantages, phenolic compounds, chlorogenic acid, HPLC

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. Elizaveta S. Surbeeva – literature search, planning and execution of experimental work, obtaining and processing data, drawing conclusions and writing the article. Valeria S. Shurakova – literature search, sample preparation, participation in the interpretation of data. Ulyana A. Efremova – participation in validation studies. Evgeniy V. Vishnyakov – statistical processing of experimental data. Inna I. Terninko – idea and planning of the experimental design, editing the manuscript.

Funding. The analysis was carried out on the basis of the Collective Use Center (CCU) "Analytical Center" of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education (SPKhFU) of the Ministry of Health of Russia.

For citation: Surbeeva E. S., Efremova U. A., Shurakova V. S., Vishnyakov E. V., Terninko I. I. Analysis of varietal advantages of leaf form *Apium graveolens* L. according to chlorogenic acid content. *Drug development & registration*. 2024;13(2):142–153. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1779

ВВЕДЕНИЕ

Разработка функциональных продуктов питания является одним из приоритетов научно-технического развития Российской Федерации[1]. Данные продукты содержат функциональные ингредиенты (полисахариды, полифенолы, каротиноиды и др.), оказывающие при систематическом употреблении целевое воздействие на одну или несколько физиологических функций, процессы обмена веществ[2]. В связи с этим актуален поиск потенциальных сырьевых источников функциональных продуктов питания, в качестве которых могут выступать сельскохозяйственные культуры, накапливающие различные биологически активные вещества (БАВ).

Согласно данным литературы [1–4], фенольные соединения уменьшают гипергликемию и инсулинорезистентность, воспаление и оксидативный стресс, обладают гепатопротекторными свойствами и регулируют профиль липидов, что говорит об актуальности их использования в качестве функциональных ингредиентов для профилактики метаболических нарушений. Известно, что пищевые культуры отличаются высоким содержанием и разнообразным качественным составом данной группы соединений и могут выступать их источником [5–6].

Отличительной особенностью сельскохозяйственных пищевых культур является их сортовое разнообразие. Так, согласно Государственному реестру селекционных достижений, допущенных к использованию, сельскохозяйственные растения представлены большим разнообразием сортов, которые различаются между собой урожайностью и морозостойкостью[3]. Однако только на примере культуры *Petroselinum crispum* L. показано, что накопление БАВ также раз-

[1] Указ Президента РФ от 1 декабря 2016 г. № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации». Доступно по: https://base.garant.ru/71551998/ Ссылка активна на 04.03.2024.

[2] ГОСТ Р 52349-2005. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением № 1). Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200039951. Ссылка активна на 04.03.2024.

[3] Государственный реестр селекционных достижений допущенных к использованию. Доступно по: https://gossortrf.ru/registry/ Ссылка активна на 04.03.2024.

лично в зависимости от сорта растения [7]. В остальных случаях мажоритарное накопление отдельных компонентов не является признаком/характеристикой сорта пищевых культур.

Сельдерей пахучий (*Apium graveolens* L.) – сельскохозяйственная культура с высоким содержанием различных групп БАВ, включая соединения фенольной природы [8], – используется в составе продуктов диетического питания[1] и широко применяется в народной медицине. Сельдерей представлен тремя ботаническими формами: корневой, черешковой и листовой, среди которых наибольшим накоплением фенолов отличается листовая. На данный момент зарегистрировано более 10 сортов сельдерея листового, однако данных касательно сравнительного накопления в них функциональных ингредиентов крайне мало. Таким образом, актуальна оценка сортовых преимуществ сельдерея и выбор оптимального сорта для последующей разработки функциональных продуктов питания и БАД.

Мажоритарными соединениями из ряда фенолов в составе листовой формы сельдерея пахучего являются гликозиды апигенина, лютеолина, а также хлорогеновая кислота [8]. Поскольку вариабильность гликозидных форм флавоноидов может отличаться в зависимости от факторов окружающей среды и самих сортов, а анализ агликонов сопряжен с продолжительной пробоподготовкой, оценку сортовых преимуществ сельдерея пахучего целесообразно проводить по хлорогеновой кислоте.

Для оценки матрицы растительного сырья целесообразно использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволяющий разделять сложные смеси веществ. Классическим вариантом пробоподготовки растительных объектов является многократная экстракция на установке с обратным холодильником [9]. Тем не менее ультразвуковой способ экстракции позволяет увеличить экспрессность и эффективность выделения растительных БАВ [10].

В литературе представлено значительное число методик ВЭЖХ-анализа хлорогеновой кислоты в обращенно-фазовом варианте [11–14]. Однако время записи хроматограмм составляет 30–60 минут, а используемые в качестве подвижной фазы (ПФ) растворы кислот весьма концентрированные (от 0,1 до 2 %) и могут неблагоприятно влиять на узлы прибора и приводить к быстрому износу оборудования. Кроме того, большинство предложенных методик не учитывают поликомпонентность химического состава растительного сырья и не дают возможности селективно оценить содержание конкретного компонента в общем профиле схожих соединений.

[1] Единый реестр свидетельств о государственной регистрации. Евразийский экономический союз. Доступно по: https://nsi.eaeunion.org/portal/1995?date=2024-02-29. Ссылка активна на 04.03.2024.

Учитывая вышесказанное, **целью данной работы** является разработка экспрессной и селективной методики определения функционального ингредиента – хлорогеновой кислоты и сравнительная оценка приоритетности разных сортов сельдерея пахучего для последующей разработки функциональных и специализированных продуктов питания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали надземную вегетативную часть листовой ботанической формы сельдерея пахучего (*Apium graveolens* L.) различных сортов. Сорта Нежный, Летний бум, Ванюша, Юта, Бодрость, Пучковый культивировали в питомнике лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (п. Лемболово, Ленинградская область, 60.389368, 30.275313). Кроме того, для проведения сравнения сорта Нежный, Ванюша и Бодрость были культивированы в СНТ «Ручей» (Кировское городское поселение, Ленинградская область, 59.831756, 31.031655).

Сбор сырья проводили в августе – сентябре 2023 г. в сухую погоду. Свежесобранную траву сельдерея измельчали ножницами на кусочки 2 × 3 см и сушили при температуре 40 °С до остаточной влажности сырья около 5 %. Ботаническую идентификацию растений проводили на базе кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ.

Количественное определение хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ

Испытания проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LicArt 62 (ООО «Лабконцепт», Россия), оснащенном диодно-матричным детектором. Внутрилабораторную сходимость оценивали на высокоэффективном жидкостном хроматографе ВЭЖХ LC 20 (Shimadzu Corporation, Япония).

Подвижная фаза (ПФ) А. 0,05%-й раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ).

ПФ Б. Ацетонитрил (HPLC grade, Fisher Chemical™).

Испытуемый раствор. Около 250 мг (точная навеска) измельченного до размера частиц 1,0 мм сырья сельдерея помещали в плоскодонную колбу с притертой пробкой, добавляли 10 мл 70%-го этанола и закрывали крышкой. Сырье экстрагировали на ультразвуковой ванне «Сапфир» (Россия) в течение 30 мин при температуре 40 °С, периодически перемешивая. Полученный раствор фильтровали в мерную колбу объемом 10 мл через мембранный фильтр диаметром 0,45 мкм и доводили до метки 70%-м этанолом. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 10 мл и доводили до метки водой деионизированной.

Раствор стандартного образца хлорогеновой кислоты. Около 10 мг (точная навеска) стандартного образца хлорогеновой кислоты (Sigma-Aldrich, США) помещали в мерную колбу объемом 10 мл и раство-

ряли в 96%-м этаноле. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 10 мл, доводили до метки 70%-м этанолом (получали раствор с концентрацией 0,1 мг/мл). 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу объемом 10 мл и доводили до метки водой деионизированной (получали раствор с концентрацией 0,01 мг/мл).

Условия хроматографирования: колонка Luna 5 µm C 18(100) Å LC Column 250 × 4.6 мм, температура термостата – 40 °C, длина волны детекции – 327 нм. Режим элюирования: 0 мин – 12 % ПФ Б, 20 мин – 30 % ПФ Б, 23 мин – 12 % ПФ Б.

Проверка пригодности хроматографической системы:

- эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца, должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика (As) хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца должен быть не менее 0,8 и не более 1,5;
- относительное стандартное отклонение (RSD) значений времен удерживания (t_R) и площадей (S) пика хлорогеновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца – не более 2,0 % ($n \geq 5$).

Содержание хлорогеновой кислоты (%) в пересчете на абсолютно сухое сырье в сельдерее пахучем расчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_{CO} \cdot 1 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_{CO} \cdot a \cdot 10 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 1 (100 - W)},$$

где S_x – площадь пика хлорогеновой кислоты в испытуемом растворе; S_{CO} – площадь пика хлорогеновой кислоты в растворе стандартного образца; a – масса навески ЛРС сельдерея, мг; a_{CO} – масса навески стандартного образца хлорогеновой кислоты, мг; P – содержание хлорогеновой кислоты в СО, %; W – влажность сырья, %.

Испытания проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XV, ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография»[1].

Для подтверждения достоверности предложенной методики проводили ее валидацию по следующим параметрам: проверке пригодности хроматографической системы, специфичности**,** линейности**,** правильности**,** сходимости (доверительный интервал правильности отдельного определения), прецизионности (сходимость, внутрилабораторная прецизионность), аналитической области. Критерии приемлемости, а также формулы для расчета основных статистических характеристик были взяты из ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» (ГФ РФ XV)[2]. В качестве объекта валидации использовали сорт Нежный (произрастание – СНТ «Ручей») ввиду высокой урожайности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка пригодности хроматографической системы: результаты оценки пригодности системы представлены в таблице 1. Хроматограмма раствора СО хлорогеновой кислоты представлена на рисунке 1.

Таблица 1. Результаты хроматографирования раствора СО хлорогеновой кислоты

Table 1. Results of chromatography chlorogenic acid's reference solution

№	t_R	S	N	As
1	7,856	535,57	25561,34	0,948
2	7,79	530,014	24774,66	0,943
3	7,762	529,823	25103,49	0,967
4	7,72	532,155	24541,18	0,96
5	7,779	531,853	25943,45	0,975
$\bar{X}$	7,7814	531,883		
SD	0,049475	2,31331		
RSD, %	0,635814	0,434928		

Как видно из данных таблицы, RSD, рассчитанное по временам удерживания и площадям пика СО хлорогеновой кислоты, меньшее 2,0 %. Эффективность колонки составляет более 5000 теоретических тарелок, а значение фактора асимметрии пика находится в диапазоне от 0,8 до 1,5. Следовательно, хроматографическая система пригодна.

Специфичность: оценка специфичности методики представлена в таблице 2 и на рисунках 2–3.

Таблица 2. Оценка специфичности по времени удерживания испытуемого и стандартного образцов

Table 2. Specificity assessment based on retention time of test and reference samples

№	t_R стандартного образца t_R reference sample	t_R испытуемого образца t_R test sample
1	7,856	7,879
2	7,790	7,753
3	7,762	7,737
4	7,720	7,864
5	7,779	7,745
$\bar{X}$	7,7814	7,7748
SD	0,0495	0,0600
RSD, %	0,64	0,77

[1] ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/vysokoeffektivnaya-zhidkostnaya-khromatografiya/ Ссылка активна на 04.03.2024.

[2] ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Доступно по: https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/11/OFS.1.1.0013.15-Statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta.pdf. Ссылка активна на 04.03.2024.

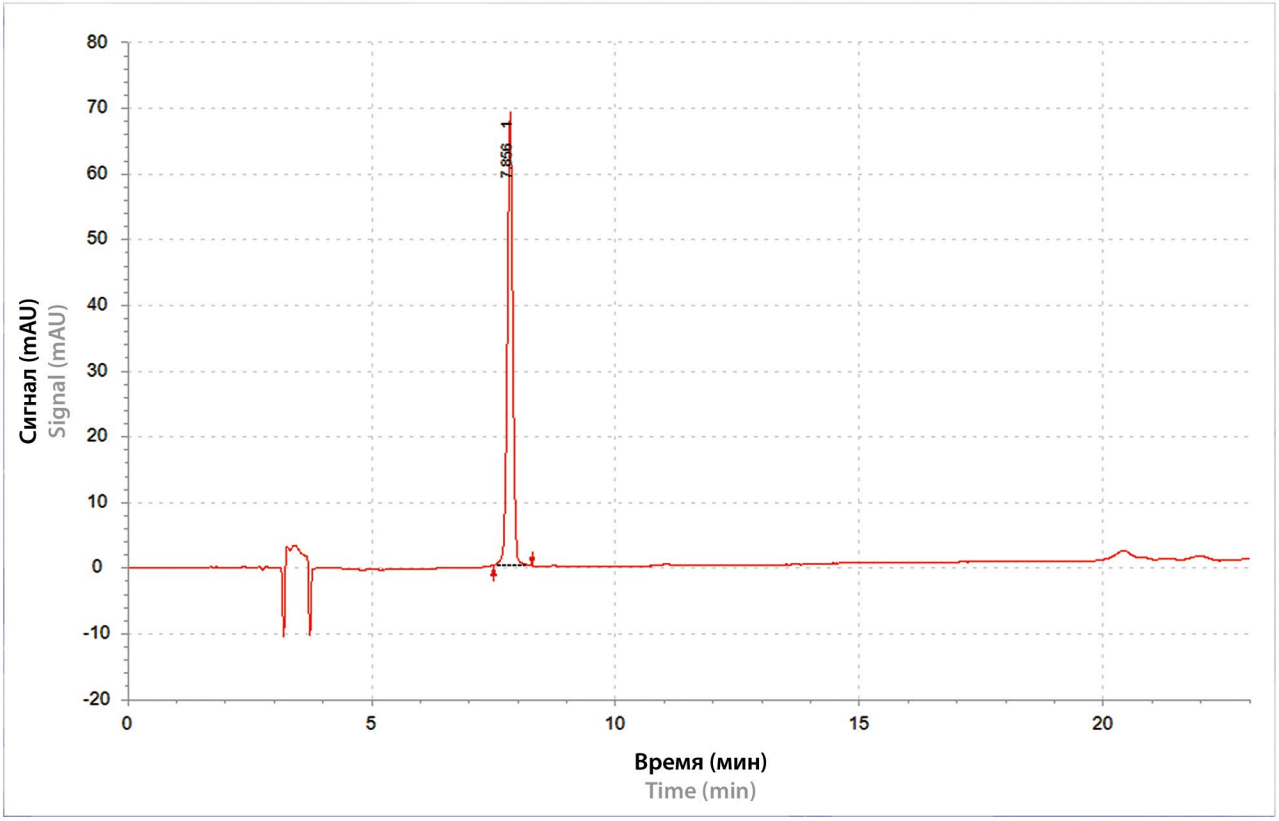


Рисунок 1. **Хроматограмма СО хлорогеновой кислоты**

Figure 1. **Chromatogram of a reference solution of chlorogenic acid**

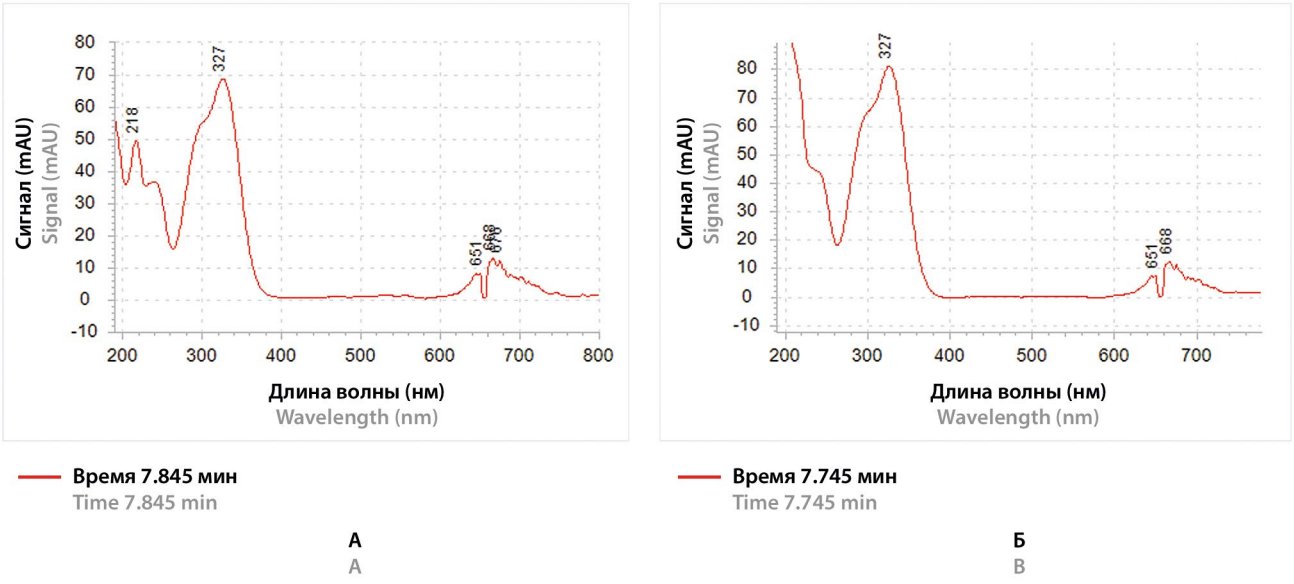


Рисунок 2. **УФ-спектр пиков хлорогеновой кислоты в растворе СО (А) и в испытуемом растворе (Б)**

Figure 2. **UV spectrum of chlorogenic acid peaks in reference solution (A) and in the test solution (B)**

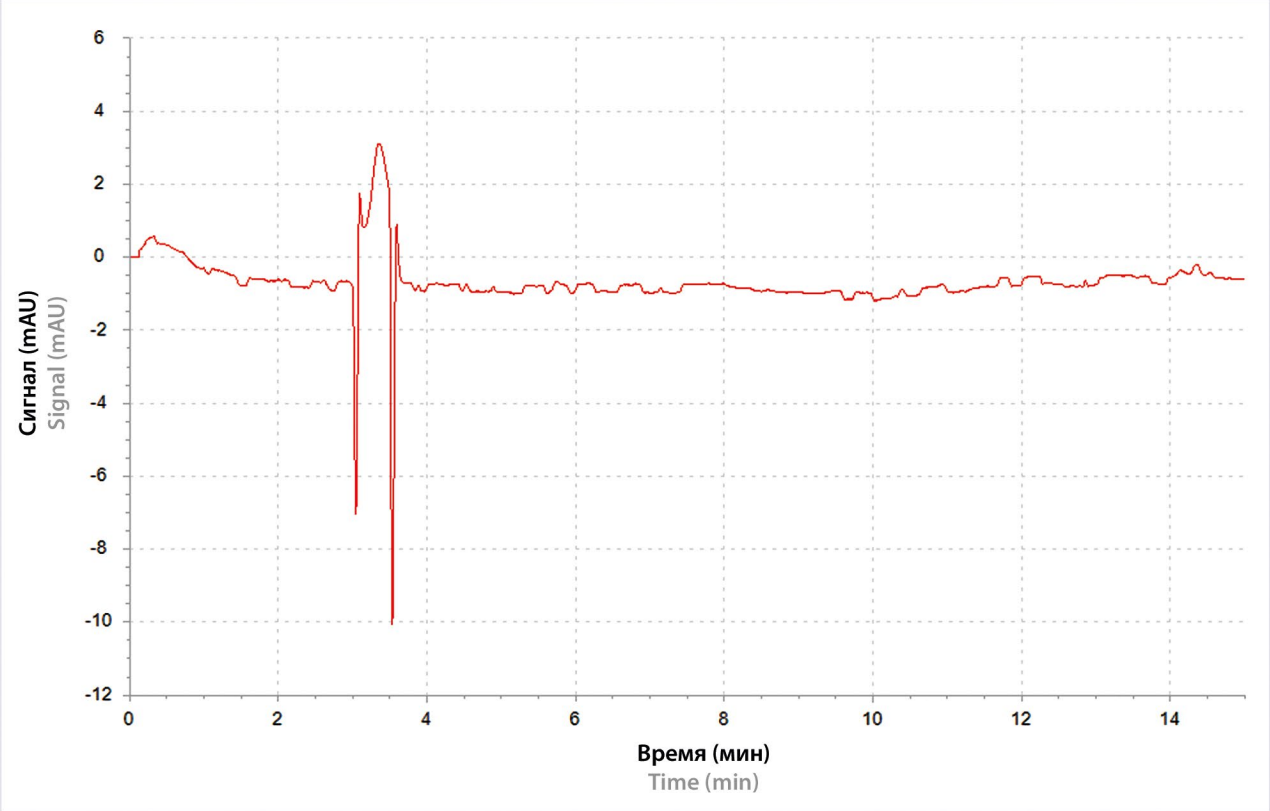


Рисунок 3. **Хроматограмма раствора 70%-го этанола (растворителя)**

Figure 3. **Chromatogram of a solution of 70 % ethanol (solvent)**

Как видно из таблицы и рисунков, времена удерживания пика хлорогеновой кислоты на испытуемом и стандартном образцах статистически достоверно совпадают. УФ-спектры пиков хлорогеновой кислоты на хроматограммах стандартного и испытуемого растворов имеют характерный максимум поглощения при длине волны 327 (±2) нм. На хроматограмме раствора 70%-го этилового спирта отсутствует пик со временем удерживания хлорогеновой кислоты. Следовательно, методика специфична.

Линейность: для исследования линейности готовили следующие растворы СО хлорогеновой кислоты с концентрацией 0,0096 мг/мл, 0,0108 мг/мл, 0,0120 мг/мл, 0,0132 мг/мл, 0,0144 мг/мл. Результаты оценки линейности представлены на рисунке 4 и в таблице 3.

Как видно из данных таблицы и рисунка, график линейной функции имеет вид $y = bx + a$, коэффициент корреляции (r) больше 0,99; свободный член линейной зависимости (a) меньше, чем его стандартное отклонение (Δa). Следовательно, линейность методики доказана.

Правильность: для исследования правильности готовили испытуемые растворы 10, 100 и 200 % от концентрации хлорогеновой кислоты, установленной в анализируемом сорте в качестве номинальной (0,01182 мг/мл). Диапазон правильности был расширен после анализа разных сортов (таблица 6), содержание действующего вещества в которых различается более чем в 5 раз. Для приготовления 10 и 200 % растворов брали аликвоты 0,1 и 2,0 исходного раствора испытуемого образца соответственно. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 3. **Результаты оценки линейности**

Table 3. **Results of linearity assessment**

f	*a*	*b*	*Sa*	*Sb*	*t*(*P*, *f*)	Δ*a*	Δ*b*	*r*
3	6,05	45948,02	34,015	1034,56	3,18	108,17	3289,89	0,9992

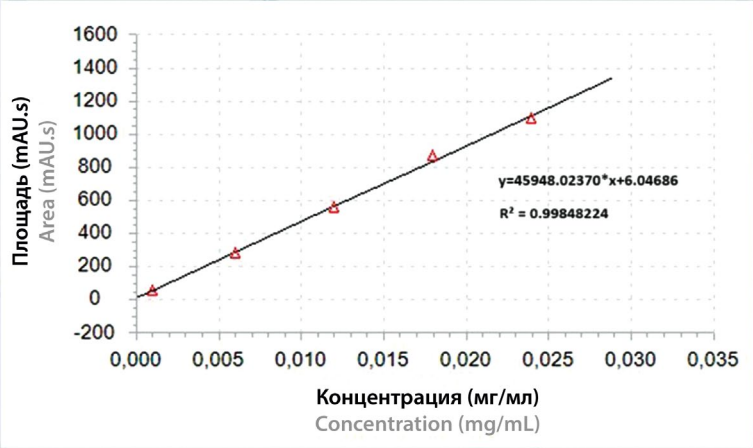


Рисунок 4. **График зависимости величины площади пика от концентрации хлорогеновой кислоты в нормализованных координатах**

Figure 4. **Graph of the dependence of the peak area on the concentration of chlorogenic acid in normalized coordinates**

Таблица 4. **Результаты оценки правильности**

Table 4. **Correctness assessment results**

Введенное значение, ×10⁻³ мг/мл Entered value, ×10⁻³ mg/ml	**Измеренное значение, ×10⁻³ мг/мл** Measured value, ×10⁻³ mg/ml	**Z (открываемость)** Z (openability)	$\lvert Z - Z_{ср.} \rvert$ $\lvert Z - Z_{avg.} \rvert$
1,18	1,20	101,56	1,57
1,18	1,18	99,39	0,60
1,18	1,16	98,20	1,79
11,82	11,77	99,56	0,43
11,82	11,63	98,43	1,56
11,82	12,00	101,55	1,56
23,64	23,64	100,00	0,01
23,64	23,71	100,28	0,29
23,64	23,86	100,95	0,96
$Z_{ср.}$ $Z_{avg.}$		99,99	
Доверительный интервал Confidence interval		0,95	
RSD, %		1,2	
$\lvert 100 - Z_{ср.} \rvert$ $\lvert 100 - Z_{avg.} \rvert$		0,0098	

Как видно из данных таблицы, значения открываемости находятся в диапазоне от 98 до 102 %, полученные значения находятся внутри доверительного интервала, что говорит об отсутствии систематической ошибки методики.

Прецизионность: оценивали сходимость и внутрилабораторную презиционность. Результаты представлены в таблице 5.

Как видно из данных таблицы, RSD измерений химиков составило 2,5 и 1,9 %. Исходя из того, что в ходе проверки пригодности хроматографической системы значение RSD площади пика СО хлорогеновой кислоты составило менее 1 %, повышенный RSD измерений может быть обусловлен природой объекта: для исследования использовали траву сельдерея листового, которая включала стебель и листья, накопление действующих веществ в ботанических органах может различаться, что, вероятно, приводит к увеличению погрешности измерений. В связи с этим порог RSD измерений методики был увеличен до 3,0 %. Значение критерия Фишера по результатам измерений двух химиков составило менее 5,05, а критерия Стьюдента – менее 2,23 (табличные значения). Следовательно, выборки сходимы и их средние значения статистически достоверно не отличаются друг от друга.

Таблица 5. **Результаты оценки сходимости**

Table 5. **Results of convergence assessment**

Измерение Measurement	**Значения химика 1, %** Chemist 1 values, %	**Значения химика 2, %** Chemist 2 values, %
1	0,468	0,469
2	0,464	0,456
3	0,441	0,447
4	0,471	0,471
5	0,470	0,467
6	0,471	0,470
$\bar{X}$	0,464	0,463
SD	0,012	0,009
RSD, %	2,5	1,9
Критерий Фишера F-test	1,74	
Критерий Стьюдента t-test	1,32	

Аналитическая область: диапазон концентраций хлорогеновой кислоты в извлечениях из сырья сельдерея листового, в пределах которого методика обеспечивает требуемую линейность, правильность и прецизионность, составляет от 0,001 до

0,025 мг/мл. Это следует из соответствия показателей «линейность», «правильность» и «прецизионность» предписанным требованиям в пределах данных концентраций.

Преимуществами разработанной методики относительно литературных вариантов является сокращенное время пробоподготовки образца (однократная экстракция на УЗ-ванне), использование менее концентрированного раствора кислоты (0,05 % ТФУ), время записи хроматограммы – 23 мин. Это позволяет существенно минимизировать затраты на проведение анализа и продлить срок эксплуатации основных узлов прибора. Кроме того, подобранные условия хроматографирования позволяют за короткое время разделить смесь из более чем 6 веществ (рисунки 5–6).

Оценка сортовых преимуществ листовой ботанической формы сельдерея пахучего: результаты оценки сортовых преимуществ листовой формы сельдерея пахучего по содержанию хлорогеновой кислоты представлены в таблице 6. Хроматограммы исследуемых растворов приведены на примере сорта Нежный различного произрастания (рисунки 5–6). На рисунке 7 приведены сравнительные диаграммы содержания хлорогеновой кислоты в сортах сельдерея пахучего.

Таблица 6. Количественное содержание хлорогеновой кислоты в сортах сельдерея пахучего

Table 6. Quantitative content of chlorogenic acid in varieties of fragrant celery

Название сорта Variety name	Содержание хлорогеновой кислоты, % (n = 5) Content of chlorogenic acid, % (n = 5)	
	СНТ «Ручей» SNT "Ruchey"	Пос. Лемболово Village Lembolovo
Нежный Nezhny	0,464 ± 0,012	0,111 ± 0,008
Бодрость Bodrost	0,382 ± 0,012	0,074 ± 0,006
Ванюша Vanyusha	0,190 ± 0,030	0,040 ± 0,010
Летний бум Summer Boom		0,179 ± 0,030
Юта Utah		0,175 ± 0,014
Пучковый Puchkovy		0,129 ± 0,030

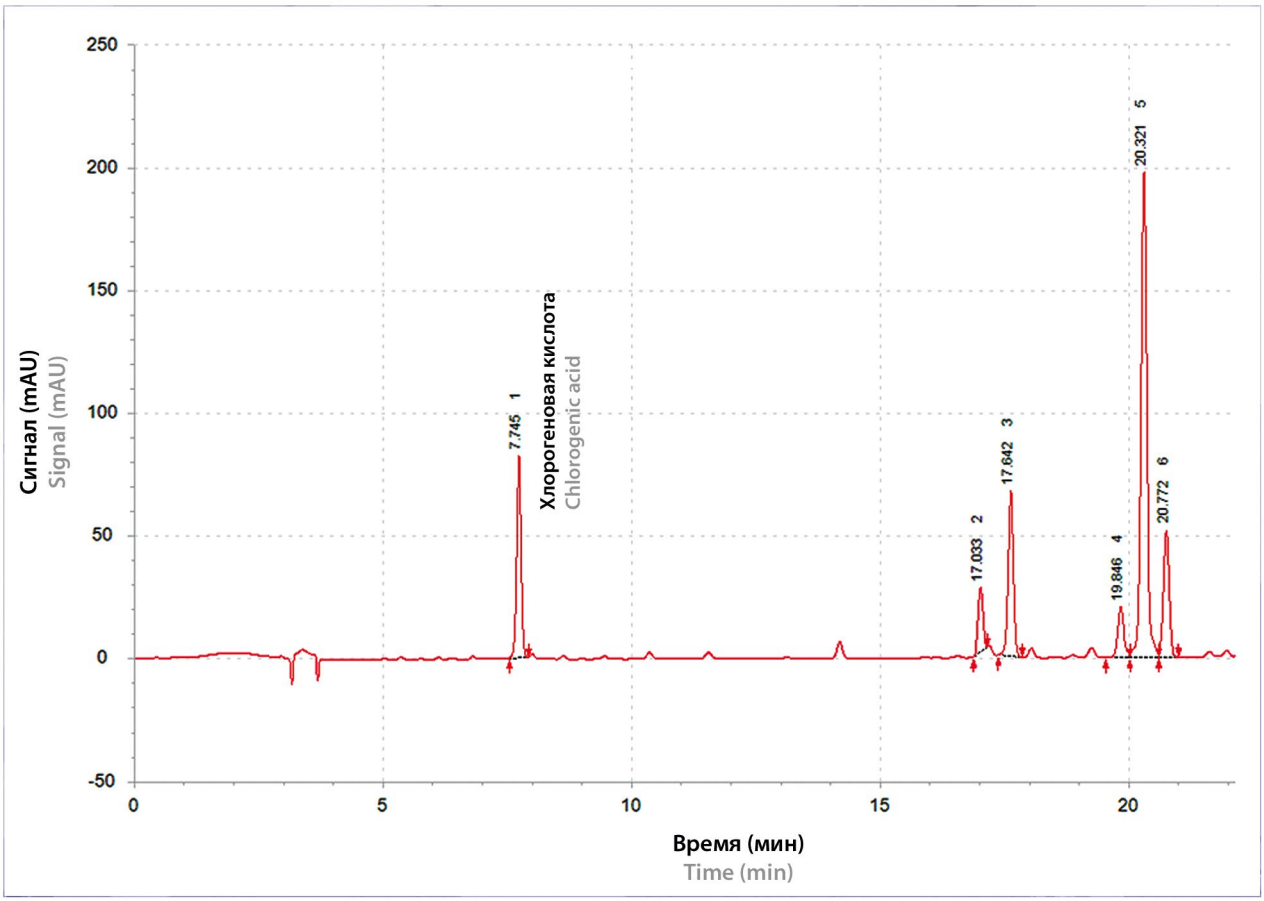


Рисунок 5. Хроматограмма испытуемого раствора сельдерея сорта Нежный (СНТ «Ручей»)

Figure 5. Chromatogram of the test solution of celery variety Nezhn (SNT "Ruchey")

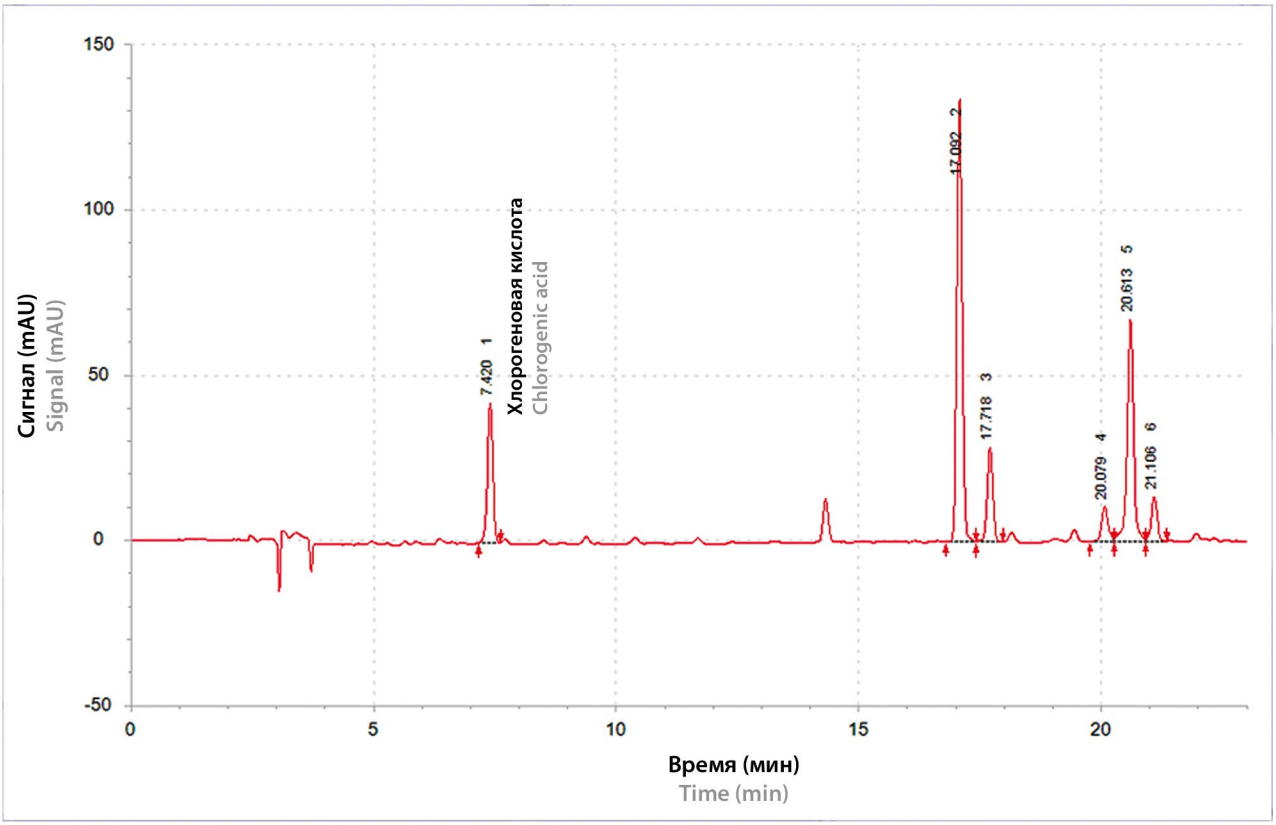


Рисунок 6. **Хроматограмма испытуемого раствора сельдерея сорта Нежный (пос. Лемболово)**

Figure 6. **Chromatogram of the test solution of celery variety Nezhny (Lembolovo village)**

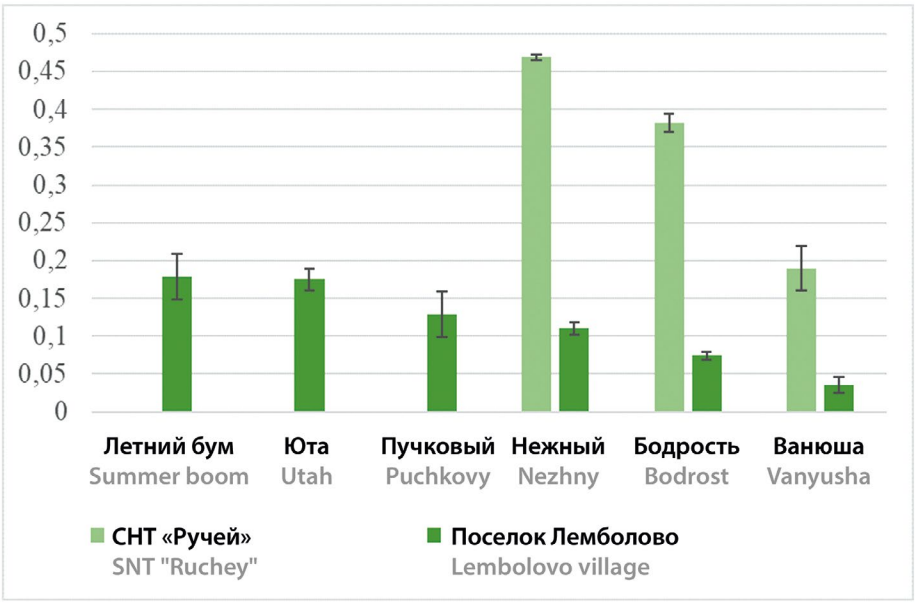


Рисунок 7. **Содержание хлорогеновой кислоты в разных сортах сельдерея листового (произрастание – СНТ «Ручей» и поселок Лемболово)**

Figure 7. **The content of chlorogenic acid in different varieties of leaf celery (growing in SNT "Ruchey" and the village of Lembolovo)**

Как видно из представленных данных, разные сорта сельдерея листового накапливают различное количество хлорогеновой кислоты, произрастая в одинаковых условиях. Причем зависимость на примере сортов Нежный, Ванюша и Бодрость сохраняется (см. таблица 6) несмотря на разные места возделывания. При этом важно отметить значительное расхождение в накоплении целевого БАВ для сырья, выращенного в СНТ «Ручей» и поселке Лемболово. Эту разницу можно объяснить условиями культивирования: в СНТ «Ручей» растения подвергались необильному поливу, землю удобряли перегноем, золой, мелом не реже 1 раза в 2 недели, тогда как в поселке Лемболово растения не удобряли и подвергали обильному поливу. Таким образом, можно сделать вывод о том, что на накопление БАВ в сельдерее листовом влияют как агротехнические условия, так и конкретный сорт сырья.

Помимо пика хлорогеновой кислоты, на хроматограммах испытуемых образцов наблюдаются пики еще 5 соединений, которые, исходя из идентификации по УФ-спектрам (рисунок 8), относятся к гликозидам флавоноидов – предположительно, производным апигенина (рисунок 8 А, Г) [15], лютеолина (рисунок 8 Б, Д) [16] и кемпферола (рисунок 8 В) [17].

Как видно из представленных выше данных, качественный состав соединений не зависит от сорта и места произрастания. Так, наибольшие площади пиков наблюдаются у веществ № 2 и № 5 (предположительно, гликозидов апигенина) для всех испытуемых образцов. Пики № 2, 4 и 6 также наблюдались на хроматограммах всех исследуемых растворов в разных соотношениях. Количественный состав основных веществ достаточно сильно отличался в зависимости от места произрастания, а также от сорта (в 2–5 раз).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана и валидирована методика определения хлорогеновой кислоты – функционального ингредиента с рядом фармакологических свойств – в сырье пищевой культуры *Apium graveolens* L. и проведена оценка сортовых преимуществ растений, выращенных на двух локациях с различными агротехническими условиями.

Результаты валидационных испытаний показали, что методика проходит проверку пригодности хроматографической системы, является специфичной, линейной, правильной и прецизионной. Оценка аналитической области методики показала, что диапазон концентраций хлорогеновой кислоты в сырье сельдерея листового, в пределах которого методика обеспечивает требуемую линейность, правильность и прецизионность, составляет от 0,001 до 0,025 мг/мл. Преимуществами методики является ее экспрессность и ресурсосберегаемость.

Результаты оценки сортовых преимуществ сельдерея показали, что количественное содержание хлорогеновой кислоты и других БАВ фенольного происхождения (гликозидов флавоноидов) отличается в зависимости от места произрастания сырья, а также от конкретного сорта растения. Наибольшее накопление БАВ продемонстрировал сорт Нежный, выращенный в СНТ «Ручей» (0,464 ± 0,012) %, а наименьшее – сорт Ванюша, выращенный в питомнике поселка Лемболово (0,040 ± 0,010) %. При этом наибольшее накопление хлорогеновой кислоты в растениях, культивируемых на площадке Лемболово, наблюдается в сортах Летний бум и Юта (0,179 ± 0,030 и 0,175 ± 0,014 соответственно).

Следовательно, наиболее перспективным среди рассмотренных сортов является сорт Летний бум. Однако результаты исследования показали, что накопление действующих веществ также сильно зависит и от условий культивирования. Таким образом, актуальна коллаборация с учеными агропромышленного комплекса, подбор условий культивирования и дальнейший анализ сортовых преимуществ сельдерея пахучего и других сельскохозяйственных культур. Трансфер аналитических методик из фармацевтической индустрии в пищевую позволит обеспечить надлежащий контроль качества продуктов функционального и специализированного питания.

Предложенный аналитический подход к оценке сортовых преимуществ по содержанию целевых компонентов даст возможность выбрать оптимальные сорта для последующей разработки качественных продуктов, способствующих улучшению здоровья населения. Разработка экспрессных и селективных аналитических методик позволит проводить направленную оценку качества исходного сырья и разработанных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Golovinskaia O., Wang C.-K. The hypoglycemic potential of phenolics from functional foods and their mechanisms. *Food Science and Human Wellness*. 2023;12(4):986–1007. DOI: 10.1016/j.fshw.2022.10.020.
2. Fraga C. G., Oteiza P. I., Hid E. J, Galleano M. (Poly)phenols and the regulation of NADPH oxidases. *Redox Biology*. 2023;67:102927. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102927.
3. Cheng C., Li Z., Zhao X., Liao C., Quan J., Bode A. M., Cao Y., Luo X. Natural alkaloid and polyphenol compounds targeting lipid metabolism: Treatment implications in metabolic diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2020;870:172922. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.172922.
4. Петрухина Д. А., Плетнева И. В., Сысуев Б. Б. Современные лекарственные средства (ассортимент) и тенденции в совершенствовании лекарственных форм гепатопротекторных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(3):38–46. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-38-46.
5. Kumar B. R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017;7(6):349–364. DOI: 10.1016/j.jpha.2017.06.005.

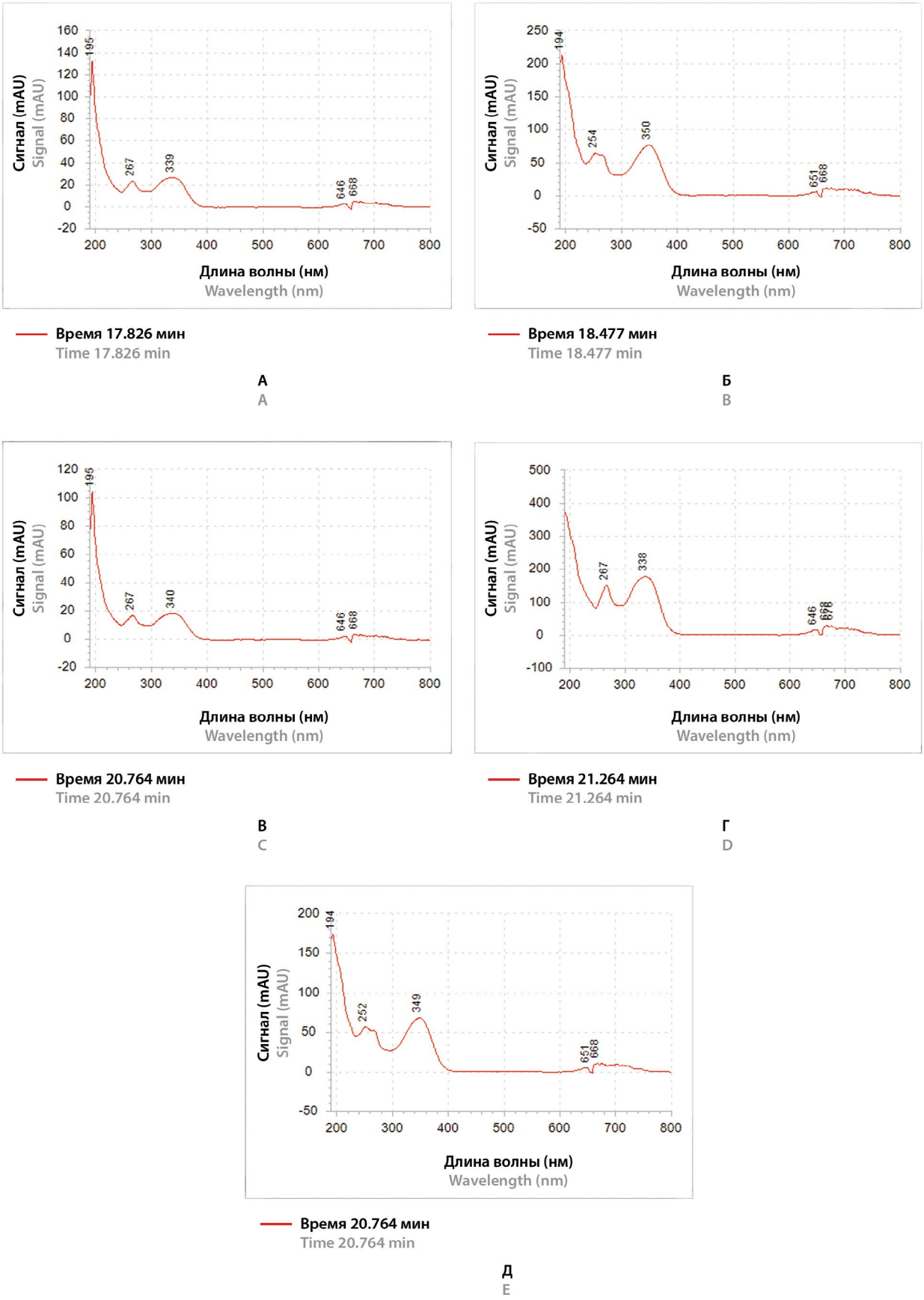


Рисунок 8. **УФ-спектры пиков соединений № 2 (А), № 3 (Б), № 4 (В), № 5 (Г), № 6 (Д)**

Figure 8. **UV spectra of the peaks of majority compounds No. 2 (A), No. 3 (B), No. 4 (C), No. 5 (D), No. 6 (E)**

6. Rashmi H. B., Negi P. S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*. 2020;136:109298. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109298.
7. Молчанова А. В., Голубкина Н. А., Кошеваров А. А., Харченко В. А., Шевченко Ю. П. Биохимическая характеристика сортов петрушки различных разновидностей (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill.). *Овощи России*. 2019;(3):74–79. DOI: 10.18619/2072-9146-2019-3-74-79.
8. Lin L.-Z., Lu S., Harnly J. M. Detection and quantification of glycosylated flavonoid malonates in celery, Chinese celery, and celery seed by LC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(4):1321–1326. DOI: 10.1021/jf0624796.
9. Скибина А. А., Боков Д. О., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):98–102. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
10. Altemimi A., Watson D. G., Choudhary R., Dasari M. R., Lightfoot D. A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0148758. DOI: 10.1371/journal.pone.0148758.
11. Vinson J. A., Chen X., Garver D. D. Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts. *Journal of Medicinal Food*. 2019;22(3):314–320. DOI: 10.1089/jmf.2018.0039.
12. Wen J., Kang L., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Chen Yu. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in Lepidogrammitis drymoglossoides (Baker) Ching, Polypodiaceae. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):148–153. DOI: 10.4103/0974-8490.99076.
13. Craig A. P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*. 2016;154:481–485. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.03.101.
14. Wen J., Kang L., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Chen Yu. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in Lepidogrammitis drymoglossoides (Baker) Ching, *Polypodiaceae*. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):148–153. DOI: 10.4103/0974-8490.99076.
15. Li B., Robinson D. H., Birt D. F. Evaluation of properties of apigenin and [G-3H]apigenin and analytic method development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(6):721–725. DOI: 10.1021/js960383s.
16. Kumar V. Structural Characterization of Luteolin Glycosides Flavonoids from Indian Plantation White Sugar. *Oriental Journal of Chemistry*. 2020;36(4):773–779. DOI: 10.13005/ojc/360425.
17. Luan G., Wang H., Lv H., Hu N., Suo Y., Wang X. Separation and Purification of Five Flavone Glucosides and One Lignan from *Caragana korshinskii* Kom. by the Combination of HSCCC and Semi-preparative RPLC. *Chromatographia*. 2016;79:823–831 DOI: 10.1007/s10337-016-3090-4.

REFERENCES

1. Golovinskaia O., Wang C.-K. The hypoglycemic potential of phenolics from functional foods and their mechanisms. *Food Science and Human Wellness*. 2023;12(4):986–1007. DOI: 10.1016/j.fshw.2022.10.020.
2. Fraga C. G., Oteiza P. I., Hid E. J, Galleano M. (Poly)phenols and the regulation of NADPH oxidases. *Redox Biology*. 2023;67:102927. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102927.
3. Cheng C., Li Z., Zhao X., Liao C., Quan J., Bode A. M., Cao Y., Luo X. Natural alkaloid and polyphenol compounds targeting lipid metabolism: Treatment implications in metabolic diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2020;870:172922. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.172922.
4. Petrukhina D. A., Pletneva I. V., Sysuev B. B. Modern Medicines (Assortment) and Trends in the Improvement of Dosage Forms of Hepatoprotective Agents (Review). *Drug development & registration*. 2021;10(3):38–46. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-3-38-46.
5. Kumar B. R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017;7(6):349–364. DOI: 10.1016/j.jpha.2017.06.005.
6. Rashmi H. B., Negi P. S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*. 2020;136:109298. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109298.
7. Molchanova A. V., Golubkina N. A., Koshevarov A. A., Kharchenko V. A., Shevchenko J. P. Biochemical characteristics of parsley varieties (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill.). *Vegetable crops of Russia*. 2019;(3):74–79. (In Russ.) DOI: 10.18619/2072-9146-2019-3-74-79.
8. Lin L.-Z., Lu S., Harnly J. M. Detection and quantification of glycosylated flavonoid malonates in celery, Chinese celery, and celery seed by LC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(4):1321–1326. DOI: 10.1021/jf0624796.
9. Skibina A. A., Bokov D. O., Gravel I. V., Ermakova V. A., Samylina I. A. HPLC-Analysis of Phenolic Complex in Pectoral Species № 4 and it's Dry Extract. *Drug development & registration*. 2019;8(2):98–102. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
10. Altemimi A., Watson D. G., Choudhary R., Dasari M. R., Lightfoot D. A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0148758. DOI: 10.1371/journal.pone.0148758.
11. Vinson J. A., Chen X., Garver D. D. Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts. *Journal of Medicinal Food*. 2019;22(3):314–320. DOI: 10.1089/jmf.2018.0039.
12. Wen J., Kang L., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Chen Yu. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in Lepidogrammitis drymoglossoides (Baker) Ching, Polypodiaceae. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):148–153. DOI: 10.4103/0974-8490.99076.
13. Craig A. P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*. 2016;154:481–485. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.03.101.
14. Wen J., Kang L., Liu H., Xiao Y., Zhang X., Chen Yu. A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in Lepidogrammitis drymoglossoides (Baker) Ching, *Polypodiaceae*. *Pharmacognosy Research*. 2012;4(3):148–153. DOI: 10.4103/0974-8490.99076.
15. Li B., Robinson D. H., Birt D. F. Evaluation of properties of apigenin and [G-3H]apigenin and analytic method development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(6):721–725. DOI: 10.1021/js960383s.
16. Kumar V. Structural Characterization of Luteolin Glycosides Flavonoids from Indian Plantation White Sugar. *Oriental Journal of Chemistry*. 2020;36(4):773–779. DOI: 10.13005/ojc/360425.
17. Luan G., Wang H., Lv H., Hu N., Suo Y., Wang X. Separation and Purification of Five Flavone Glucosides and One Lignan from *Caragana korshinskii* Kom. by the Combination of HSCCC and Semi-preparative RPLC. *Chromatographia*. 2016;79:823–831 DOI: 10.1007/s10337-016-3090-4.

РЕКЛАМА

7–8 ОКТЯБРЯ 2024 I «ГЕЛЕНДЖИК АРЕНА»

БИОТЕХМЕД

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ
ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ФАРМАЦЕВТИКЕ И МЕДИЦИНЕ

ОТРАСЛЕВОЙ ФОКУС

- Медицинские изделия и оборудование
- Фармацевтическая промышленность
- Реабилитация
- IT в медицине
- Биологически активные добавки

ТЕМАТИКИ ФОРУМА

- Регуляторная политика
- Нацпроекты и стратегии развития
- Кадровый потенциал
- Взаимодействие науки и бизнеса
- Сырье и материалы
- Пациентские сообщества

Приглашаем принять участие!
Подробнее на сайте проекта

BIOTECHMEDCONF.RU

16+

ОРГАНИЗАТОР
business event
ГРУППА КОМПАНИЙ FORMIKA

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ
Минпромторг России

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЙ ПАРТНЁР
S·GROUP
ЦЕНТР КОРПОРАТИВНЫХ КОММУНИКАЦИЙ

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.072

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1796

Check for updates

CC BY 4.0

Выделение, идентификация и количественное определение флавоноидов из цветков клекачки перистой

А. Ю. Соколова[1, 2]✉, А. М. Полуянов[1, 2, 4], А. И. Бардаков[2], С. С. Сологова[2], Н. В. Бобкова[2, 3]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Сайнтифик Комплайнс». 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8., помещ. 1/2
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
[3] Федеральное государственное бюджетное 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
[4] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

✉ **Контактное лицо:** Соколова Анна Юрьевна. **E-mail:** a.sokolova@scientific-compliance.ru

ORCID: А. Ю. Соколова – https://orcid.org/0000-0002-7500-5880; А. М. Полуянов – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699;
А. И. Бардаков – https://orcid.org/0000-0002-4749-3231; С. С. Сологова – https://orcid.org/0000-0002-8526-7147;
Н. В. Бобкова – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019.

Статья поступила: 05.04.2024 **Статья принята в печать:** 03.05.2024 **Статья опубликована:** 08.05.2024

Резюме

Введение. Поиск новых видов растений, содержащих биологически активные вещества (далее – БАВ), является одной из ведущих задач фармакогнозии как науки. Особенно актуален поиск в растительном сырье гликозидов флавоноидов, так как они обладают противовоспалительным, антиоксидантным, иммуностимулирующим, а также слабым фунгицидным и бактериостатическим действием. Клекачка перистая (лат. *Staphylea pinnata* L.) – эндемичное растение Кавказа, культивируемое не только в Грузии, но и Российской Федерации на Северном и Северо-Западном Кавказе. В зарубежной литературе существуют исследования антиоксидантной, антипролиферативной и цитотоксической активности экстрактов листьев нескольких видов клекачки, а также ингибирующей активности образования ЦОГ-1, ЦОГ-2 и LTB4. Между тем серьезных русскоязычных научных исследований генеративных органов *S. pinnata* ни по химическому составу, ни по фармакологическому действию в литературе обнаружено не было. Данная работа является частью комплексного фитохимического исследования *S. pinnata*. Цель работы – изучение качественного и количественное состава флавоноидов в изучаемом объекте.

Цель. Выделение, идентификация и количественное определение флавоноидов в цветках и бутонах клекачки перистой (*Staphylea pinnata* L.).

Материалы и методы. В качестве анализируемых растворов использовали спиртоводные извлечения из высушенных генеративных органов изучаемого растения. Растворы анализировали на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия) после пробоподготовки с алюминия хлоридом и на ВЭЖХ Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, дегазатором и автосамплером, по индивидуально подобранному градиенту элюирования подвижной фазы (0,1%-й раствор ортофосфорной кислоты / ацетонитрил). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения LabSolutions Single LC (Shimadzu Corporation, Япония). Соединения из группы флавоноидов идентифицировали по временам удерживания. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора с длиной волны поглощения 365 ± 2 нм.

Результаты и обсуждение. Были получены спиртоводные извлечения из цветков и бутонов клекачки перистой (лат. *Staphylea pinnata* L.). Проведена количественная оценка методом спектрофотометрии на содержание флавоноидов. Подобран градиентный режим элюирования для ВЭЖХ с целью одновременного определения 7 гликозидов флавоноидов. Данные хроматографические условия позволили идентифицировать и оценить количественное содержание астрагалина, цинарозида, космосиина, нарциссина и рутина в цветках и бутонах клекачки перистой (лат. *Staphylea pinnata* L.). Гликозиды флавоноидов рапонтицин и кемпферол обнаружены не были.

Заключение. Из генеративных органов клекачки перистой (*Staphylea pinnata* L.). были выделены гликозиды флавоноидов, разработана методика количественного определения гликозидов флавоноидов в спиртоводных извлечениях, обнаружены и количественно определены астрагалин, цинарозид, космосиин, нарциссин и рутин.

Ключевые слова: флавоноиды, ВЭЖХ-УФ, спектрофотометрия, цветки, бутоны, *Staphylea pinnata* L., клекачка перистая

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

Вклад авторов. А. Ю. Соколова, А. М. Полуянов, Н. В. Бобкова придумали и разработали эксперимент. А. М. Полуянов, А. Ю. Соколова провели исследования методами спектрофотометрии и высокоэффективной хроматографии. А. М. Полуянов, А. И. Бардаков и А. Ю. Соколова участвовали в обработке данных. А. Ю. Соколова, С. С. Сологова и А. М. Полуянов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Соколова А. Ю., Полуянов А. М., Бардаков А. И., Сологова С. С., Бобкова Н. В. Выделение, идентификация и количественное определение флавоноидов из цветков клекачки перистой. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):155–163. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1796

© Соколова А. Ю., Полуянов А. М., Бардаков А. И., Сологова С. С., Бобкова Н. В., 2024
© Sokolova A. Y., Poluyanov A. M., Bardakov A. I., Sologova S. S., Bobkova N. V., 2024

Isolation, identification and quantification of flavonoids from the flowers of *Staphylea pinnata* L.

Anna Y. Sokolova[1, 2]✉, Andrey M. Poluyanov[1, 2, 4], Alexandr I. Bardakov[2], Susanna S. Sologova[2], Natalia V. Bobkova[2, 3]

[1] LLC "Scientific Compliance". 1/2, 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia
[2] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
[3] Lomonosov Moscow State University. Faculty of Fundamental Medicine. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia
[4] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna Y. Sokolova. **E-mail:** a.sokolova@scientific-compliance.ru

ORCID: Anna Y. Sokolova – https://orcid.org/0000-0002-7500-5880; Andrey M. Poluyanov – https://orcid.org/0000-0002-9960-6699; Alexandr I. Bardakov – https://orcid.org/0000-0002-4749-3231; Susanna S. Sologova – https://orcid.org/0000-0002-8526-7147; Natalia V. Bobkova – https://orcid.org/0000-0003-1591-4019.

Received: 05.04.2024 **Accepted:** 03.05.2024 **Published:** 08.05.2024

Abstract

Introduction. Search for new plant species containing biologically active substances (hereinafter – BAS) is one of the leading tasks of pharmacognosy as a science. The search for flavonoid glycosides in plant raw materials is especially relevant, since they have anti-inflammatory, antioxidant, immunostimulating, as well as weak fungicidal and bacteriostatic action. *Staphylea pinnata* L. is an endemic plant of the Caucasus, cultivated not only in Georgia, but also in the Russian Federation in the Northern and Northwestern Caucasus. In foreign literature there are studies of antioxidant, antiproliferative and cytotoxic activity of leaf extracts of several species of *S. pinnata* L., as well as inhibitory activity of COX-1, COX-2 and LTB4 formation. Meanwhile, no serious Russian-language scientific studies on either the chemical composition or pharmacological action of generative organs of *S. pinnata* were found in the literature. This work is part of a comprehensive phytochemical study of *S. pinnata*. The aim of the work is to study the qualitative and quantitative composition of flavonoids in the studied object.

Aim. To isolate, identify and quantify flavonoids in flowers and buds of *Staphylea pinnata* L.

Materials and methods. Alcohol-water extracts from dried generative organs of the studied plant were used as analyzed solutions. Solutions were analyzed on a spectrophotometer SF-2000 (LLC "OKB Spectr", Russia) after sample preparation with aluminum chloride and on an HPLC Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Japan) equipped with a column and sample thermostat, degasser and autosampler using an individually selected elution gradient of the mobile phase (0.1 % orthophosphoric acid/acetonitrile solution). The primary data were processed using LabSolutions Single LC software (Shimadzu Corporation, Japan). Compounds from the flavonoid group were identified by retention times. Detection was carried out using a UV detector with an absorption wavelength of 365 ± 2 nm.

Result and discussion. Alcohol-water extracts from flowers and buds of *S. pinnata* L. were obtained. Quantitative evaluation by spectrophotometry for flavonoid content was carried out. A gradient elution mode for HPLC was selected for simultaneous determination of 7 flavonoid glycosides. These chromatographic conditions allowed the identification and quantification of astragaline, cynaroside, cosmosiin, narcissin and rutin in flowers and buds of *Staphylea pinnata* L. Flavonoid glycosides: raponticin and kaempferol were not detected.

Conclusion. Flavonoid glycosides were isolated from the generative organs of *S. pinnata* L., a technique for quantitative determination of flavonoid glycosides in alcohol-water extracts was developed, astragalin, cynaroside, cosmosiin, narcissin and rutin were detected and quantified.

Keywords: flavonoids, HPLC-UV, spectrophotometry, flowers, buds, *Staphylea pinnata* L.

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

Contribution of the authors. Anna Yu. Sokolova, Andrey M. Poluyanov, and Natalia V. Bobkova conceived and designed the experiment. Andrey M. Poluyanov, Anna Y. Sokolova carried out the studies by spectrophotometry and high-performance chromatography. Andrey M. Poluyanov, Alexandr I. Bardakov, and Anna Yu. Sokolova participated in data processing. Anna Yu. Sokolova, Susanna S. Sologova, and Andrey M. Poluyanov participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Sokolova A. Y., Poluyanov A. M., Bardakov A. I., Sologova S. S., Bobkova N. V. Isolation, identification and quantification of flavonoids from the flowers of *Staphylea pinnata* L. *Drug development & registration*. 2024;13(2):155–163. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1796

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых видов растений, содержащих биологически активные вещества (далее – БАВ), является одной из ведущих задач фармакогнозии как науки. Он необходим для расширения сырьевой базы, которая, в свою очередь, позволит создать высокоэффективные лекарственные препараты российского производства. Нахождение потенциальных объектов, которые могут быть использованы в качестве источника (сырья) для производства лекарственных препаратов, в культуре различных народностей и этнических групп – это один из способов реализации данной задачи. Отдельного внимания заслуживают малоизученные виды, такие как клекачка перистая (лат. *Staphylea pinnata* L.) – растение семейства клекачковых (*Staphyleaceae*), эндемик Кавказа, широко

культивируемое и обитающее в диком виде не только в Грузии, но и в Российской Федерации на Северном и Северо-Западном Кавказе [1–3].

В зарубежной литературе приведены данные по различному фармакологическому действию листьев клекачки перистой (*Staphylea pinnata* L.), в том числе по антиоксидантной, антипролиферативной, цитотоксической активности, а также ингибирующей активности образования циклооксигиназы-1, циклооксигиназы-2 и LTB4 (лейкотриена B4). В отношении количественного и качественного состава проводились исследования на содержание урсоловой кислоты, жирных кислот в листьях клекачк перистой (*Staphylea pinnata* L.), а также изучение состава эфирного цветочного масла и его сравнение с маслами трех родственных видов (*S. colhica* Stev., *S. elegans* Zab., *S. holocarpa* Hemsl.) [4–7]. Особенно актуален поиск в растительном сырье гликозидов флавоноидов, так как они обладают противовоспалительным, антиоксидантным, иммуностимулирующим, а также слабым фунгицидным и бактериостатическим действием [8–11].

Среди наиболее часто встречающихся веществ из группы гликозидов флавоноидов в генеративных и вегетативных органах растений можно отметить соединения, представленные в таблице 1, которые обладают сходным фармакологическим действием.

Данная работа является частью комплексного фитохимического исследования *S. pinnata*. **Цель данной работы** – изучение качественного и количественного состава флавоноидов в изучаемом объекте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и растворы

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (класс «for UHPLC», PanReac, Испания); муравьиная кислота (класс «for analysis», PanReac, Испания); этанол 95%-й (класс «х.ч.», ООО ТД «Химмед», Россия); вода деминерализованная (класс чистоты I); хлорида алюминия гексагидрат [класс «х.ч.», ITW Reagents (PanReac AppliChem, Германия)].

Оборудование

Спектрофотометр СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия); водяная баня WB-4 (STEGLER, Китай), дозаторы переменного объема от 100–1000 мкл, 1000–5000 мкл (Sartorius, Германия), весы аналитические R200D (Sartorius, Германия).

Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera-i LC-2040 (Shimadzu Corporation, Япония), оборудованном колоночным термостатом, хроматографической колонкой HPLC Column Platinum C18-EPS, 250 × 4.6 мм, 5 мм (Grace, США) и предколонкой Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges Widepore C18, 4 × 3,0 мм, дегазатором, автосамплером (объем инъекции: 10 мкл) и ультрафиолетовым детектором. Обнаружение осуществлялось при длине волны λ = 365 ± 2 нм.

Таблица 1. Соединения, обладающие сходным фармакологическим действием

Table 1. Compounds with similar pharmacological effects

Название Name	Объекты Objects	Литература References
Кемпферол Kaempferol	Листья и ветки различных видов *Betula*. Трава *Geranium sibiricum* L. Leaves and branches of various *Betula* species. Herb *Geranium sibiricum* L.	[12, 13]
Рутин Rutin	Цветки *Chamomilla recutita* L. Трава *Cichorium intybus* L. Плоды *Rosa canina* L. Плоды *Crataegus pentagyna* Waldst. et Kit. и *C. monogyna* Variegata. Цветки *Fagopyrum tataricum* L. Flowers of *Chamomilla recutita* L. Herb *Cichorium intybus* L. Fruits of *Rosa canina* L. Fruits of *Crataegus pentagyna* Waldst. et Kit. and *C. monogyna* Variegata. Flowers of *Fagopyrum tataricum* L.	[14–16]
Нарциссин Narcissin	Цветки *Calendula officinalis* L. Цветки *Primula veris* L. Flowers of *Calendula officinalis* L. Flowers of *Primula veris* L.	[17, 18]
Гиперозид Hyperoside	Листья и ветки различных видов *Betula*. Трава *Hypericum perforatum* L. Листья и цветки *Chrysanthemum morifolium* L. Leaves and branches of various *Betula* species. Herb Hypericum perforatum L. Leaves and flowers of *Chrysanthemum morifolium* L.	[19, 20]
Цинарозид Cinaroside	Цветки *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. Трава *Matricaria aurea* (L.) Sch. Bip. Flowers of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. Herb *Matricaria aurea* (L.) Sch. Bip.	[21, 22]
Астрагалин Astragalin	Цветки *Alcea flavovirens* (Boiss. & Buhse) Iljin. Трава *Cichorium intybus* L. Flowers of *Alcea flavovirens* (Boiss. & Buhse) Iljin. Herb *Cichorium intybus* L.	[14, 23]
Космосиин Cosmosiin	Трава *Achillea millefolium* L. Трава *Artemisia frigida* Willd. Herb *Achillea millefolium* L. Herb *Artemisia frigida* Wild.	[24, 25]

Подвижная фаза содержала 0,1 % фосфорной кислоты в воде (по объему) (элюент A); ацетонитрил (элюент B) со скоростью потока 0,9 мл/мин. Исполь-

зованный градиент подвижной фазы показан на рисунке 1. Первичные данные были обработаны с помощью LabSolutions. Программное обеспечение Single LC (Shimadzu Corporation, Япония).

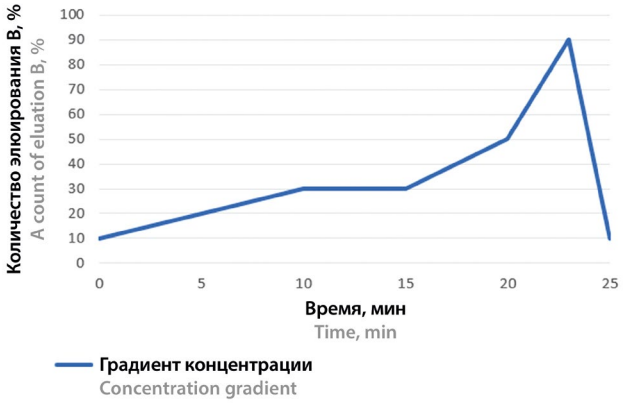


Рисунок1. Градиент концентраций для ВЭЖХ

Figure 1. Gradient elution scheme

Объекты исследования

В качестве объекта исследования использовались высушенные бутоны и раскрывшиеся цветки клекачки перистой (*Staphylea pinnata L.*) (рисунок 2), собранные в марте – апреле 2021 года в ущелье реки Куры (координаты: 41.843148, 43.384047, город Боржоми, юго-восточная Грузия), показанном на рисунке 3.

Рисунок 2. Цветок (А) и бутоны (Б) клекачки перистой. Увеличение 18х и 9х соответственно

Figure 2. Flower (A) and buds (B) *S. pinnate*. Magnification 18x and 9x respectively

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрофотометрия

Спиртовые извлечения из сырья были получены по методике, изложенной в нормативном документе на «Бессмертника песчаного цветки» (раздел «Количественное определение»), так как максимум поглощения комплекса флавоноидов извлечений из высушенных цветков и бутонов клекачки перистой (*Staphylea pinnata* L.) с $AlCl_3$ соответствует максимуму

Рисунок 3. Карта местности с указанием координат.

Координаты: 41.843148, 43.384047, город Боржоми, юго-восточная Грузия

Figure 3. Map of the area indicating coordinates

Coordinates: 41.843148, 43.384047, Borjomi city, southeastern Georgia

поглощения комплекса флавоноидов извлечения из бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) с $AlCl_3$ и составляет 418 нм (рисунок 4).

Точную навеску 1,0 г измельченного сырья помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта 70%-го и взвешивали, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Затем снимали с водяной бани, остужали и вновь взвешивали, при необходимости доводили растворителем до первоначальной массы. Фильтровали через бумажный фильтр.

1,0 мл извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2%-го и 1 каплю уксусной кислоты разведенной, доводили объем раствора спиртом 96%-м и перемешивали.

В качестве раствора сравнения использовали смесь 1,0 мл извлечения исследуемого объекта с 1 каплей уксусной кислоты в мерной колбе объемом 50 мл. Доводили до метки. Все приготовленные растворы выдерживали 30 мин при комнатной температуре.

С целью оценки общего количества содержания флавоноидов в исследуемом сырье был использован метод спектрофотометрии. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид измеряли при длине волны 418 нм (рисунок 4) и рассчитывали с использованием удельного показателя поглощения комплекса изосалипурпозида с алюминия хлоридом по формуле:

$$\frac{A \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса изосалипурпурозида с алюминия хлоридом при дли-

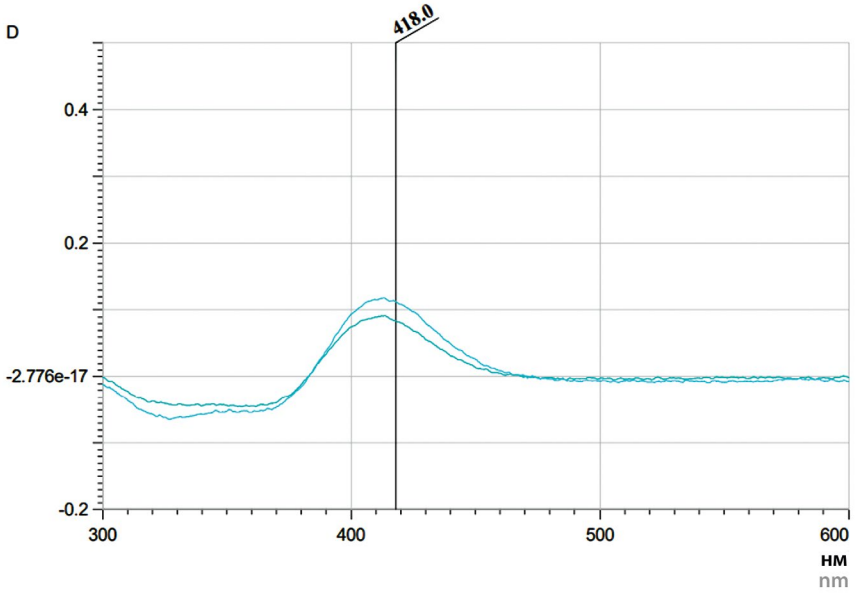


Рисунок 4. Спектр поглощения комплекса флавоноидов с $AlCl_3$ при 418 нм

Figure 4. Spectrum of complexes of flavonoids with $AlCl_3$ at 418 nm

не волны 418 нм, равный 500; *a* – навеска сырья, г; *W* – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Установлено, что бутоны *S. pinnata* содержат большее количество флавоноидов, чем раскрывшиеся цветки. Полученные результаты количественного содержания флавоноидов отображены в таблице 2.

Таблица 2. Количественное содержание флавоноидов в цветках и бутонах *S. pinnata*, полученное методом спектрофотометрии

Table 2. Quantitative content of flavonoids in flowers and buds of *S. pinnata* by spectrophotometry

Виды сырья Types of raw materials	**Содержание флавоноидов в спиртовых экстрактах, %** Content of flavonoids in alcohol extracts,in %
Цветки клекачки Staphylea flowers	0,474 ± 0,055
Бутоны клекачки Staphylea buds	0,638 ± 0,035

Таким образом, исследование показало, что при распускании бутонов содержание флавоноидов в цветках *S. pinnata* снижается.

Разработка методики ВЭЖХ

Аналитическую пробу сырья измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 50 мл спирта 70%-го. Колбу закрывали пробкой и взвешивали с точностью до ±0,01 г, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем охлаждали в течение 30 мин, закрывали той же пробкой, снова взвешивали и восполняли недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр.

Для идентификации и определения количественного содержания БАВ был выбран метод ВЭЖХ-УФ. Данный метод является более селективным и чувствительным, чем СФМ, а также позволяет обнаружить и количественно определить отдельные соединения из рассматриваемой группы БАВ.

Условия хроматографического разделения были взяты из научных публикаций и доработаны экспериментально под изучаемые объекты из-за ряда особенностей [25, 26]. Для детектирования исследуемых веществ использовался ультрафиолетовый детектор, который регистрировал вещества за счет наличия хромофорных групп в их строении (таблица 3).

Присутствие астрагалина, цинарозида, космосиина, нарциссина и рутина в цветках и бутонах клекачки перистой (*Staphylea pinnata* L.) во всех проанализированных пробах было подтверждено (рисунок 5).

В проанализированных объектах не обнаруживались пики вещества с соответствующим стандартному образцу временем удерживания для рапонтицина и кемпферола, что позволяет говорить об отсутствии в испытуемых объектах данных соединений.

Для выбранной методики была проведена проверка пригодности хроматографической системы. Для всех изучаемых объектов рассчитаны значения количественного содержания астрагалина, цинарозида, космосиина, нарциссина и рутина в пересчете на абсолютно сухое сырье в %, полученные данные представлены в таблице 3.

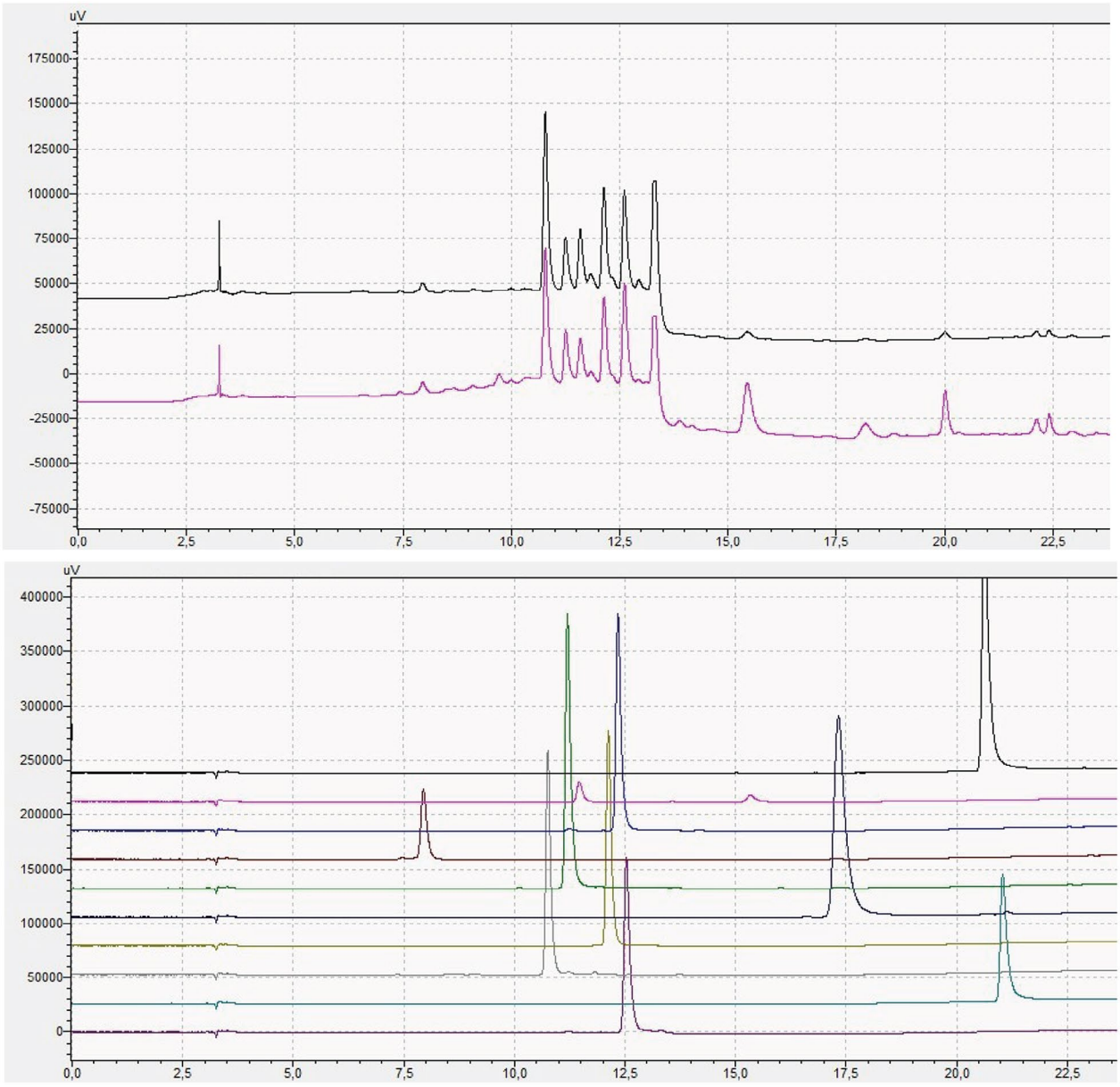


Рисунок 5. **Хроматограммы испытуемых растворов и растворов стандартных образцов флавоноидов**

Figure. 5. **Chromatograms of test solutions and solutions of standard samples of flavonoids**

Таблица 3. Количественное содержание найденных флавоноидов

Table 3. The quantitative content of flavonoids

Объект Object	**Времена удерживания, Rt** Retention times, Rt	**Содержание рутина, %** Rutin content, %	**LogP**
Цветки Flowers	10,8	0,227 ± 0,004	–1,3
Бутоны Buds		0,156 ± 0,001	
		Содержание цинарозида, % Cinaroside content, %	0,5
Цветки Flowers	11,2	0,049 ± 0,009	
Бутоны Buds		0,038 ± 0,003	
		Содержание астрагалина, % Astragalin content, %	0,7
Цветки Flowers	12,4	0,012 ± 0,001	
Бутоны Buds		0,006 ± 0,001	
		Содержание космосиина, % Cosmosiin content, %	–0,1
Цветки Flowers	12,5	0,145 ± 0,002	
Бутоны Buds		0,123 ± 0,003	
		Содержание нарциссина, % Narcissin content, %	–1,0
Цветки Flowers	12,1	0,117 ± 0,001	
Бутоны buds		0,091 ± 0,004	

Примечание. Значение процентного содержания указано как среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

Note. The percentage value is indicated as the arithmetic mean ± standard deviation.

Полученные хроматограммы извлечений из бутонов и раскрывшихся цветков имеют сходный профиль. Площади пиков анализируемых веществ сопоставимы между собой в изучаемых объектах. Следовательно, можно сделать вывод, что со временем качественный флавоноидный состав у генеративных органов *S. pinnata* почти не изменяется.

Были обнаружены и количественно определены рутин, нарциссин, астрагалин, цинарозид и космосиин. Гликозиды флавоноидов рапонтицин и кемпферол обнаружены не были. Лидирующими пиками, соответствующими времени удержания гликозидов флавоноидов, были пики рутина и космосиина в обоих объектах. Наибольшее содержание рутина, равное 0,227 ± 0,004 %, было отмечено в раскрывшихся цветках *S. pinnata*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было определено общее содержание флавоноидов в цветках и бутонах *S. pinnata*, равное соответственно 0,474 ± 0,055 % и 0,638 ± 0,035 %, а также проведено выделение, идентификация и количественное определение отдельных гликозидов флавоноидов: рутина, нарциссина, астрагалина, цинарозида и космосиина – в цветках и бутонах клекачки перистой (*Staphylea pinnata* L.). Рапонтицин и кемпферол обнаружены не были. Лидирующим был пик, соответствующий времени удерживания СО рутина, наибольшее содержание которого, равное 0,227 ± 0,004 %, было отмечено в раскрывшихся цветках *S. pinnata*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Халикова О. В. Анализ изменения структуры лесных насаждений за 2017–2018 гг. на территории Джубгского, Абинского и Афипского лесничеств Краснодарского края. *Российский электронный научный журнал*. 2019;2(32):182–197. DOI: 10.31563/2308-9644-2019-32-2-182-197.
2. Сергеева А. С., Корунчикова В. В. Растительность бассейна реки Пшада и ее экологическая роль в сохранении естественных ландшафтов. *Экологический вестник Северного Кавказа*. 2009;5(2):56–65.
3. Шумкова О. А., Криворотов С. Б., Букарева О. В., Архипов Р. А. К изучению распространения охраняемых растений на Северо-Западном Кавказе. *Вестник ТвГУ. Серия «Биология и экология»*. 2019;3(55):186–193.
4. Lacikova L., Pferschy-Wenzig E.-M., Masterova I., Grancai D., Bauer R. Antiinflammatory potential and fatty acid content of lipophilic leaf extracts of four *Staphylea* L. species. *Natural Product Communications*. 2009;4(4):543–546. DOI: 10.1177/1934578X0900400420.
5. Laciková L., Švajdlenka E., Mašterová I., Grančai D. Isolation and identification of flower oil components from four *Staphylea* L. species. *Chemical Papers*. 2007;61(6):512–514. DOI: 10.2478/s11696-007-0071-y.
6. Lacikova L., Jancova M., Muselik J., Masterova I., Grancai D., Fickova M. Antiproliferative, cytotoxic, antioxidant activity and polyphenols contents in leaves of four *Staphylea* L. species. *Molecules*. 2009;14(9):3259–3267. DOI: 10.3390/molecules14093259.
7. Lacikova L., Muselik J., Masterova I., Grancai D. Antioxidant Activity and Total Phenols in Different Extracts of Four *Staphylea* L. Species. *Molecules*. 2007;12(1):98–102. DOI: 10.3390/120100986.
8. Аверьянова Е. В., Школьникова М. Н., Рожнов Е. Д., Минаков Д. В., Баташов Е. С., Шаихова Б. К. Исследование биологической активности флавоноидов облепихового шрота с применением специфических биотест-систем. *Химия растительного сырья*. 2020;4:235–241. DOI: 10.14258/jcprm.2020048859.
9. Крипак Е. М., Жохова Е. В., Лукашов Р. И. Антиоксидантные свойства вторичных метаболитов вербейника обыкновенного (*Lysimachia vulgaris* L.). *Достижения и перспективы создания новых лекарственных растительных препаратов.* 2023;62–69. DOI: 10.52101/9785870191102_62.
10. Сальникова Н. А., Самотруева М. А., Коновалов Д. А. Химический состав и фармакологические свойства растений рода *Gleditsia* L. (обзор литературы). *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».* 2019;(3):87–96. DOI: 10.21626/vestnik/2019-3/12.
11. Гаврилова Н. А., Шурыгина М. С., Курдюков Е. Е., Водопьянова О. А., Кривов Д. В. Новая методика количественного определения флавоноидов в цветках липы. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки*. 2020;2(30):5–13. DOI: 10.21685/2307-9150-2020-2-1.

12. Шемякина А. В. Представители дальневосточных видов рода Betula L. – ценный источник биологически активных веществ (обзор). В сб.: IX Международная научная конференция молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровье сбережения». 16–17 ноября 2021. Москва; 2021. 21–32 с. DOI: 10.52101/9785870191027_2021_21.
13. Quilantang N. G., Choi K., Lee B.-H., Lee S. Kaempferol Rhamnosides from *Geranium sibiricum* as Aldose Reductase Inhibitors and Their Content by HPLC Analysis. *Processes*. 2020;8(6):694. DOI: 10.3390/pr8060694.
14. Сайбель О. Л., Радимич А. И., Адамов Г. В., Даргаева Т. Д. Сравнительное фитохимическое изучение надземной части дикорастущего и культивируемого растения цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.). *Химия растительного сырья*, 2020;3:187–195. DOI: 10.14258/jcprm.2020037386.
15. Stoenescu A.-M., Trandafir I., Cosmulescu S. Determination of phenolic compounds using HPLC-UV method in wild fruit species. *Horticulturae*. 2022;8(2):84. DOI: 10.3390/horticulturae8020084.
16. Kim J., Kim R. H., Hwang K. T. Flavonoids in different parts of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and Tartary buckwheat (*F. tataricum*) during growth. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2023;120:105362. DOI: 10.1016/j.jfca.2023.105362.
17. Al-Huqail A. A., Bekhit A. A., Ullah H., Ayaz M., Mostafa N. M. Antimalarial and Antileishmanial Flavonoids from *Calendula officinalis* Flowers. *Agronomy*. 2023;13(11):2765. DOI: 10.3390/agronomy13112765.
18. Stefanis I., Chatzopoulou P., Krigas N., Karioti A. Exploring the Chemical Content of Primula veris L. subsp. veris Wild-Growing Populations along a Climate Gradient: An HPLC-PDA-MS Quality Assessment of Flowers, Leaves and Roots for Sustainable Exploitation. *Horticulturae*. 2023;9(10):1120. DOI: 10.3390/horticulturae9101120.
19. Alahmad A., Alghoraibi I., Zein R., Kraft S., Dräger G., Walter J.-G., Scheper T. Identification of major constituents of *Hypericum perforatum* L. extracts in Syria by development of a rapid, simple, and reproducible HPLC-ESI-Q-TOF MS analysis and their antioxidant activities. *ACS Omega*. 2022;7(16):13475–13493. DOI: 10.1021/acsomega.1c06335.
20. Doan T. T. M., Tran G. H., Nguyen T. K., Lim J. H., Lee S. Antioxidant activity of different cultivars of *Chrysanthemum morifolium* and quantitative analysis of phenolic compounds by HPLC/UV. *Applied Biological Chemistry*. 2024;67(1):17. DOI: 10.1186/s13765-024-00875-w.
21. Yousefbeyk F., Hemmati G., Gholipour Z., Ghasemi S., Evazalipour M., Schubert C., Koohi D. E., Böhm V. Phytochemical analysis, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of golden chamomile (*Matricaria aurea* (Loefl.) Schultz Bip). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2022;77(7–8):331–342. DOI: 10.1515/znc-2021-0269.
22. Мовсумов И. С., Гараев Э. Э., Гараев Э. А., Сулейманов Т. А., Юсифова Д. Ю. Фитохимическое исследование сырья *Alcea flavovirens* (Malvaceae) в Республике Азербайджан. *Растительные ресурсы*. 2020;56(3):276–279. DOI: 10.31857/S003399462003005X.
23. Васькова А. И., Куркин В. А., Соколова И. В. Исследование компонентного состава травы тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ. *Достижения и перспективы создания новых лекарственных растительных препаратов*. 2023;266-270. DOI: 10.52101/9785870191102_266.
24. Olennikov D. N., Kashchenko N. I., Chirikova N. K., Vasil'eva A. G., Gadimli A. I., Isaev J. I., Vennos C. Caffeoylquinic acids and flavonoids of fringed sagewort (*Artemisia frigida* Willd.): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS profile, HPLC-DAD quantification, *in vitro* digestion stability, and antioxidant capacity. *Antioxidants*. 2019;8(8):307. DOI: 10.3390/antiox8080307.
25. Полуянов А. М., Соколова А. Ю., Койнова А., Куликова С. Д., Малашенко Е. А., Бобкова Н. В. Идентификация и количественное определение флавоноидов методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):134–142. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-134-142.
26. 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.

REFERENCES

1. Khalikova O. V. Analysis of changes in forest structure for 2017–2018 on the territory of Jubsky, Abinsky and Afipsky forestry of Krasnodar territory. *Rossiisky elektronnyi nauchnyi zhurnal*. 2019;2(32):182–197. (In Russ.) DOI: 10.31563/2308-9644-2019-32-2-182-197.
2. Sergeeva A. S. Korunchikova V. V. Vegetation of Pshada river basin and its ecological role in preservation of natural landscapes. *The North Caucasus Ecological Herald*. 2009;5(2):56–65. (In Russ.)
3. Shumkova O. A., Krivorotov S. B., Bukareva O. V., Arkhipov R. A. On the distribution of protected plants in the North-West Caucasus. *Bulletin of Tver State University. Series: Biology and Ecology*. 2019;3(55):186–193. (In Russ.)
4. Lacikova L., Pferschy-Wenzig E.-M., Masterova I., Grancai D., Bauer R. Antiinflammatory potential and fatty acid content of lipophilic leaf extracts of four *Staphylea* L. species. *Natural Product Communications*. 2009;4(4):543–546. DOI: 10.1177/1934578X0900400420.
5. Laciková L., Švajdlenka E., Mašterová I., Grančai D. Isolation and identification of flower oil components from four *Staphylea* L. species. *Chemical Papers*. 2007;61(6):512–514. DOI: 10.2478/s11696-007-0071-y.
6. Lacikova L., Jancova M., Muselik J., Masterova I., Grancai D., Fickova M. Antiproliferative, cytotoxic, antioxidant activity and polyphenols contents in leaves of four *Staphylea* L. species. *Molecules*. 2009;14(9):3259–3267. DOI: 10.3390/molecules14093259.
7. Lacikova L., Muselik J., Masterova I., Grancai D. Antioxidant Activity and Total Phenols in Different Extracts of Four *Staphylea* L. Species. *Molecules*. 2007;12(1):98–102. DOI: 10.3390/120100986.
8. Averyanova E. V., Shkolnikova M. N., Rozhnov E. D., Minakov D. V., Batashov E. S., Shaikhova B. K. Investigation of the biological activity of sea buckthorn meal flavonoids using specific biotest systems. *Chemistry of plant raw material*. 2020;4:235–241. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2020048859.
9. Kripak E. M., Zhokhova E. V., Lukashov R. I. Antioxidant properties of secondary metabolites of common loosestrife (*Lysimachia vulgaris* L.). *Achievements and prospects for the creation of new medicinal herbal preparations*. 2023;62–69. (In Russ.) DOI: 10.52101/9785870191102_62.
10. Salnikova N. A., Samotruyeva M. A., Konovalov D. A. The chemical composition and pharmacological properties of plants of Gleditsia l. (literature review). *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*. 2019;(3):87–96. (In Russ.) DOI: 10.21626/vestnik/2019-3/12.
11. Gavrilova N. A., Shurygina M. S., Kurdyukov E. E., Vodop'yanova O. A., Krivov D. V. A new method of quantitative determination of flavonoids in linden flowers. *University proceedings. Volga region. Natural sciences*. 2020;2(30):5–13. (In Russ.) DOI: 10.21685/2307-9150-2020-2-1.
12. Shemyakina A. V. Representatives of the Far Eastern species of the genus Betula L. are a valuable source of biologically active substances (review). In: IX International Scientific Conference of Young Scientists "Modern Trends in the Development of Health Saving Technologies". November 16–17, 2021. Moscow; 2021. 21–32 p. (In Russ.) DOI: 10.52101/9785870191027_2021_21.
13. Quilantang N. G., Choi K., Lee B.-H., Lee S. Kaempferol Rhamnosides from *Geranium sibiricum* as Aldose Reductase Inhibitors and Their Content by HPLC Analysis. *Processes*. 2020;8(6):694. DOI: 10.3390/pr8060694.
14. Saybel O. L., Radimich A. I., Adamov G. V., Dargaeva T. D. Comparative phytochemical study of the aerial parts of the wild-growing and cultivat-ed chicory ordinary (*Cichorium intybus* L.).

Chemistry of plant raw material. 2020;3:187–195. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcprm.2020037386.

15. Stoenescu A.-M., Trandafir I., Cosmulescu S. Determination of phenolic compounds using HPLC-UV method in wild fruit species. *Horticulturae*. 2022;8(2):84. DOI: 10.3390/horticulturae8020084.
16. Kim J., Kim R. H., Hwang K. T. Flavonoids in different parts of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and Tartary buckwheat (*F. tataricum*) during growth. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2023;120:105362. DOI: 10.1016/j.jfca.2023.105362.
17. Al-Huqail A. A., Bekhit A. A., Ullah H., Ayaz M., Mostafa N. M. Antimalarial and Antileishmanial Flavonoids from *Calendula officinalis* Flowers. *Agronomy*. 2023;13(11):2765. DOI: 10.3390/agronomy13112765.
18. Stefanis I., Chatzopoulou P., Krigas N., Karioti A. Exploring the Chemical Content of Primula veris L. subsp. veris Wild-Growing Populations along a Climate Gradient: An HPLC-PDA-MS Quality Assessment of Flowers, Leaves and Roots for Sustainable Exploitation. *Horticulturae*. 2023;9(10):1120. DOI: 10.3390/horticulturae9101120.
19. Alahmad A., Alghoraibi I., Zein R., Kraft S., Dräger G., Walter J.-G., Scheper T. Identification of major constituents of *Hypericum perforatum* L. extracts in Syria by development of a rapid, simple, and reproducible HPLC-ESI-Q-TOF MS analysis and their antioxidant activities. *ACS Omega*. 2022;7(16):13475–13493. DOI: 10.1021/acsomega.1c06335.
20. Doan T. T. M., Tran G. H., Nguyen T. K., Lim J. H., Lee S. Antioxidant activity of different cultivars of *Chrysanthemum morifolium* and quantitative analysis of phenolic compounds by HPLC/UV. *Applied Biological Chemistry*. 2024;67(1):17. DOI: 10.1186/s13765-024-00875-w.
21. Yousefbeyk F., Hemmati G., Gholipour Z., Ghasemi S., Evazalipour M., Schubert C., Koohi D. E., Böhm V. Phytochemical analysis, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of golden chamomile (*Matricaria aurea* (Loefl.) Schultz Bip). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2022;77(7–8):331–342. DOI: 10.1515/znc-2021-0269.
22. Movsumova I. S., Garayevb E. E., Garayeva E. A., Suleymanova T. A., Yusifova D. Y. Phytochemical Study of the Flowers *Alcea flavovirens* (Malvaceae) from the Republic of Azerbaijan. *Rastitelnye Resursy*. 2020;56(3):276–279. (In Russ.) DOI: 10.31857/S003399462003005X.
23. Vaskova A. I., Kurkin V. A., Sokolova I. V. Study of the component composition of common yarrow herb using HPLC. *Achievements and prospects for the creation of new medicinal herbal preparations*. 2023;266–270. (In Russ.) DOI: 10.52101/9785870191102_266.
24. Olennikov D. N., Kashchenko N. I., Chirikova N. K., Vasil'eva A. G., Gadimli A. I., Isaev J. I., Vennos C. Caffeoylquinic acids and flavonoids of fringed sagewort (*Artemisia frigida* Willd.): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS profile, HPLC-DAD quantification, *in vitro* digestion stability, and antioxidant capacity. *Antioxidants*. 2019;8(8):307. DOI: 10.3390/antiox8080307.
25. 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.
26. 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.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.072; 543.6; 543.5

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1724

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка и аттестация стандартного образца надропарина кальция

А. В. Зыкова✉, С. В. Кривощеков, Д. А. Исаков, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

✉ **Контактное лицо:** Зыкова Анастасия Васильевна. **E-mail:** anastasya.zykova@mail.ru

ORCID: А. В. Зыкова – https://orcid.org/0009-0008-9365-800X; С. В. Кривощеков – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141;
Д. А. Исаков – https://orcid.org/0009-0005-9919-7353; А. М. Гурьев – https://orcid.org/0000-0002-1120-4979;
М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Статья поступила: 21.01.2024 **Статья принята в печать:** 22.05.2024 **Статья опубликована:** 24.05.2024

Резюме

Введение. Известно широкое применение препаратов гепарина для лечения и профилактики венозных тромбоэмболических осложнений. Одним из препаратов низкомолекулярного гепарина, успешно применяемых в клинической практике, является надропарин кальция. Современный подход к оценке качества лекарственных препаратов предполагает использование эталонов, в сравнении с которыми осуществляется контроль качества лекарственного средства – стандартных образцов (СО). Важнейшим специфичным параметром при оценке подлинности низкомолекулярных гепаринов является характеристика фракционного состава.

Цель. Целью работы являлась разработка, аттестация и определение стабильности в течение срока годности вторичного стандартного образца для определения подлинности надропарина кальция в рамках совершенствования системы контроля качества предприятия с перспективой создания отечественного фармакопейного стандартного образца.

Материалы и методы. Объектом разработки и аттестации являлся стандартный образец предприятия – низкомолекулярный гепарин, полученный на базе ОПУ ЦВТ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Аттестуемый стандартный образец получали очисткой надропарина кальция методом твердофазной экстракции. Полноту очистки подтверждали сравнением хроматограмм очищенных образцов с хроматограммами международного стандартного образца. Характеристики молекулярно-массового распределения определяли хроматографически. Стабильность аттестуемого СОП (стандартный образец предприятия) изучали при двух условиях хранения – при температуре ниже 8 °С в сухом состоянии в течение 16 месяцев и в растворе при температуре –40 °С в течение 6 месяцев – путем оценки трендов молекулярно-массового распределения.

Результаты и обсуждение. Для каждой серии аттестуемого стандартного образца в двух параллельных определениях рассчитаны молекулярная масса и молекулярно-массовые характеристики, представлена репрезентативная хроматограмма. Значения относительного стандартного отклонения молекулярной массы образцов и содержания контролируемых фракций не превышало 2,5 %. Детальный анализ молекулярно-массового распределения показал «классическую» зависимость RSD (относительное стандартное отклонение) от величины среднего со значительным увеличением до 30 % при малых значениях доли фракции (менее 0,5 %). Установлено, что в течение 16 месяцев при температуре хранения ниже 8 °С молекулярная масса и молекулярно-массовые характеристики стандартных образцов низкомолекулярного гепарина значимо не изменяются. Однако в растворе СОП при температуре хранения –40 °С в течение 6 месяцев деградировали более чем на 10 %.

Заключение. По результатам исследования разработан протокол получения стандартного образца предприятия низкомолекулярного гепарина для стандартизации субстанции надропарина кальция по показателю «молекулярно-массовое распределение». Установленный срок хранения образца – не менее 16 месяцев при температуре ниже 8 °С. Показана стабильность растворов стандартного образца при температуре хранения –40 °С в течение 3 месяцев.

Ключевые слова: стандартный образец, молекулярно-массовое распределение, надропарин кальция, хроматография, подлинность

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

Вклад авторов. С. В. Кривощеков, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов подготовили базу и материал для разработки и исследований, а также разработали план проведения исследования. Д. А. Исаков, С. В. Кривощеков, А. В. Зыкова провели эксперименты, статистическую обработку и оценку молекулярно-массовых характеристик. А. В. Зыкова, С. В. Кривощеков участвовали в написании и корректировке статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках соглашения с Минобрнауки России от 7 апреля 2022 г. № 075-11-2022-032.

Для цитирования: Зыкова А. В., Кривощеков С. В., Исаков Д. А., Гурьев А. М., Белоусов М. В. Разработка и аттестация стандартного образца надропарина кальция. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):164–170. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1724

Development and attestation of a standard sample of calcium nadroparin

Anastasia V. Zykova✉, Sergei V. Krivoshchekov, Denis A. Isakov, Artem M. Guryev, Mikhail V. Belousov

Siberian State Medical University, SSMU. 2, Moscow tract, Tomsk, 634050, Russia

✉ **Corresponding author:** Anastasia V. Zykova. **E-mail:** anastasya.zykova@mail.ru

© Зыкова А. В., Кривощеков С. В., Исаков Д. А., Гурьев А. М., Белоусов М. В., 2024
© Zykova A. V., Krivoshchekov S. V., Isakov D. A., Guryev A. M., Belousov M. V., 2024

ORCID: Anastasia V. Zykova – https://orcid.org/0009-0008-9365-800X; Sergei V. Krivoshchekov – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141;
Denis A. Isakov – https://orcid.org/0009-0005-9919-7353; Artem M. Guryev – https://orcid.org/0000-0002-1120-4979;
Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Received: 21.01.2024 **Accepted:** 22.05.2024 **Published:** 24.05.2024

Abstract

Introduction. The widespread use of heparin preparations for the treatment and prevention of venous thromboembolic complications is known. One of the low molecular weight heparin drugs successfully used in clinical practice is calcium nadroparin. The modern approach to assessing the quality of medicines involves the use of standards, in comparison with which the quality control of the drug is carried out – standard samples (SS). The most important specific parameter in assessing the authenticity of low molecular weight heparins is the characteristic of the fractional composition.

Aim. The aim of the work was to develop, attestation and determine the stability during the shelf life of a secondary standard sample to determine the authenticity of calcium nadroparin as part of improving the quality control system of the enterprise with the prospect of creating a domestic pharmacopoeia standard sample.

Materials and methods. The object of development and attestation was the standard sample of the enterprise – low molecular weight heparin, obtained on the basis of the Technology implementation center of Siberian state medical university. The certified standard sample was obtained by purification of calcium nadroparin by solid-phase extraction. The completeness of the purification was confirmed by comparing the chromatograms of the purified samples with the chromatograms of the international standard sample. The characteristics of the molecular weight distribution were determined chromatographically. The stability of the certified SSE (the standard sample of the enterprise) was studied under two storage conditions – at a temperature below 8 °C in a dry state for 16 months and in solution at –40 °C for 6 months by evaluating trends in molecular weight distribution.

Results and discussion. For each batch of the certified standard sample, the molecular weight and molecular weight characteristics are calculated in 2 parallel definitions, and a representative chromatogram is presented. The values of the relative standard deviation of the molecular weight of the samples and the content of the controlled fractions did not exceed 2.5 %. A detailed analysis of the molecular weight distribution showed the "classical" dependence of RSD (relative standard deviation) from the average value with a significant increase up to 30 % for small fraction values (less than 0.5 %). It was found that during 16 months at a storage temperature below 8 °C, the molecular weight and molecular weight characteristics of standard samples of low molecular weight heparin did not significantly change. However, in the SSE solution at a storage temperature of minus 40 °C for 6 months, they degraded by more than 10 %.

Conclusion. According to the results of the study, a protocol has been developed for obtaining a standard sample of low-molecular-weight heparin for the standardization of the calcium nadroparin substance according to the indicator "molecular weight distribution". The established shelf life of the sample is at least 16 months at temperatures below 8 °C. The stability of solutions of the standard sample at a storage temperature of –40 °C for 3 months is shown.

Keywords: standard sample, molecular weight distribution, calcium nadroparin, chromatography, identification

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. Sergei V. Krivoshchekov, Artem M. Guryev, Mikhail V. Belousov prepared the base and material for development and research, and also developed a research plan. Denis A. Isakov, Sergei V. Krivoshchekov, Anastasia V. Zykova conducted experiments, statistical processing and evaluation of molecular weight characteristics. Anastasia V. Zykova, Sergei V. Krivoshchekov participated in the writing and correction of the article.

Funding. The work was carried out within the framework of an agreement with the Ministry of Education and Science of Russia dated April 7, 2022 No. 075-11-2022-032.

For citation: Zykova A. V., Krivoshchekov S. V., Isakov D. A., Guryev A. M., Belousov M. V. Development and attestation of a standard sample of calcium nadroparin. *Drug development & registration*. 2024;13(2):164–170. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1724

ВВЕДЕНИЕ

Известно широкое применение препаратов гепарина для лечения и профилактики венозных тромбоэмболических осложнений. Так, при изучении течения COVID-19 выявлена коагулопатия, являющаяся одним из ключевых механизмов, ведущих к полиорганной недостаточности у пациентов с тяжелой формой заболевания [1–3]. Гепарин связывается с антитромбином и неселективно ингибирует II, IX, X, XI, XII факторы свертываемости крови, обладает непролонгированным действием и низкой биодоступностью в малых дозах, а также высокой вероятностью возникновения гепарининдуцированной тромбоцитопении [4–5]. Уменьшение молекулярной массы гепарина вследствие сокращения длины полисахаридных цепей повышает селективное ингибирование фактора Xa свертывающей системы крови, снижая вероятность геморрагических осложнений терапии [6]. Низкомолекулярные гепарины удобны для применения в терапии, так как не требуют постоянного контроля коагулограммы [7]. Еще одним преимуществом низкомолекулярных гепаринов является возможность их применения при планировании и вынашивании беременности [8–10]. Одним из препаратов низкомолекулярного гепарина, успешно применяемых в клинической практике, является надропарин кальция [11–12].

Современный подход к оценке качества лекарственных препаратов предполагает использование эталонов, в сравнении с которыми осуществляется контроль качества лекарственного средства – стандартных образцов (СО)[1] [13]. Основной сложностью является отсутствие отечественных стандартных образцов для многих лекарственных средств биологического происхождения, в том числе и низкомолекулярных гепаринов, что затрудняет логистические процессы и значительно увеличивает стоимость контроля качества препаратов на локальных предприятиях.

Процессы разработки и аттестации стандартных образцов являются комплексной задачей и зависят от назначения СО – определение подлинности, чистоты, количественного содержания. Важнейшим параметром при оценке подлинности низкомолекулярных гепаринов является характеристика фракционного состава, так как распределение по молекулярной массе является специфичным для каждого препарата. Фармакопея США рекомендует определение характерного молекулярно-массового распределения низкомолекулярных гепаринов методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)[2].

Целью работы являлась разработка, аттестация и определение стабильности в течение срока годности вторичного стандартного образца для определения подлинности надропарина кальция в рамках совершенствования системы контроля качества предприятия с перспективой создания отечественного фармакопейного стандартного образца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом разработки и аттестации являлся стандартный образец предприятия – низкомолекулярный гепарин, полученный на базе ОПУ ЦВТ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. В качестве первичного стандарта использовали эталонный стандарт Фармакопеи США «Калибрант молекулярной массы низкомолекулярного гепарина 10,6 мг» (USP, Low Molecular Weight Heparin Molecular Weight Calibrant RS), кат. № 1448854, партия № F0M224.

Аттестуемый стандартный образец получали очисткой надропарина кальция методом твердофазной экстракции с использованием картриджей, заполненных полимерным сорбентом поли(дивинилбензол-винилпирролидоном) (DVB-N-виниллпироллидоном) (Sep-Pak® Vac 6 cc (500 mg) Porapak® RDX Cartridges, Waters Chromatography Ireland Ltd., Ирландия), размер частиц – 125–150 мкм, размер пор – 200 Å. Полноту очистки подтверждали экспериментально. Картриджи, заполненные сорбентом, последовательно промывали 5 мл ацетонитрила и 5 мл воды очищенной, затем пропускали через сорбент водные растворы надропарина кальция с концентрацией 0,1 и 0,05 г/мл. Собранный элюат лиофильно высушивали (лиофильная сушка Ilshin, MCFD 8508, Корея) и хроматографировали. Сравнивали хроматограммы очищенных образцов с хроматограммами международного стандартного образца.

Характеристики молекулярно-массового распределения определяли при помощи жидкостного хроматографа Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Германия) с рефрактометрическим детектором RI-101. Хроматографировали в изократическом режиме, скорость потока – 0,5 мл/мин, температура колонки – +30 °С, объем вводимой пробы – 10 мкл, время хроматографирования – 30 мин. В качестве подвижной фазы использовали 2,84%-й раствор натрия сульфата с pH = 5,0.

Приготовление подвижной фазы. 28,4 г сульфата натрия помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяли в 600 мл воды и доводили объем до метки тем же растворителем. Доводили значение pH до 5,0 ± 0,02 с помощью разведенной (0,98 %) серной кислоты. Фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (восстановленная целлюлоза).

Раствор аттестуемого стандартного образца предприятия. Навеску 20 мг стандарта растворяли в 2 мл подвижной фазы, перемешивали и фильтровали через шприцевой фильтр (восстановленная целлюлоза).

Раствор стандартного образца низкомолекулярного гепарина (USP). Навеску 20 мг стандарта низкомолекулярного гепарина для калибровки растворяли в 2 мл подвижной фазы.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Навеску 100 мг глицина помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в подвижной фазе, доводили объем колбы растворителем до метки и перемешивали.

Хроматографическую систему считали пригодной при выполнении следующих условий: на хроматограмме раствора стандартного образца низкомолекулярного гепарина наблюдалась кривая пика низкомолекулярного гепарина, зарегистрированная в интервале от 12 до 23 минут; для основного пика на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы эффективность колонки составляла не менее 6000 теоретических тарелок; для основного пика на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы фактор асимметрии составлял не менее 0,8 и не более 1,5.

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. ОФС.1.1.0007 «Стандартные образцы». Доступно по: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/standartnye-obraztsy-/ Ссылка активна на 21.01.2024.

[2] The United States pharmacopoeia: USP 46. The national formulary: NF 41. 2023. Available at: https://www.uspnf.com/purchase-usp-nf. Available at: 21.01.2024.

Для построения калибровочного графика использовали времена удерживания пиков на хроматограмме, зарегистрированные с помощью рефрактометрического детектора, интегрируя сигнал низкомолекулярного гепарина, принимая его за смесь узких стандартов, молекулярные массы и содержание которых приведены в сертификате стандарта. При интегрировании пиков сигналы растворителя и солей не учитывали.

Далее строили калибровочную зависимость в координатах $\log M_i = f(t_R)$ с регрессионной зависимостью третьего порядка.

На хроматограмме растворов аттестуемого образца интегрировали сигнал, разбивая его не менее чем на 20 элементарных участков, после чего вычисляли среднемассовую молекулярную мас-су (M_w):

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n}(S_{RI,i} \cdot M_i)}{\sum_{i=1}^{n} S_{RI,i}},$$

где $S_{RI,i}$ – площадь i-го пика на хроматограмме испытуемого раствора; M_i – молекулярная масса i-го пика, найденная из калибровочного графика.

Далее рассчитывали содержание (X_i, %) фракции с заданной молекулярной массой для составления спецификации молекулярно-массового распределения стандартного образца.

Стабильность аттестуемого СОП (стандартный образец предприятия) изучали при двух условиях хранения – при температуре ниже 8 °С в сухом состоянии в течение 16 месяцев и при температуре –40 °С в течение 6 месяцев путем оценки трендов молекулярно-массового распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Путем твердофазной очистки получено 6 серий стандартного образца предприятия (S.1 – S.7), которые проанализированы для оценки молекулярно-массовых характеристик по калибровочной зависимости, построенной по международному стандартному образцу USP кат. № 1448854 (рисунок 1).

Для каждой серии аттестуемого стандартного образца в двух параллельных определениях рассчитаны молекулярная масса (таблица 1) и молекулярно-массовые характеристики (таблица 2), репрезентативная хроматограмма приведена на рисунке 2.

Значения относительного стандартного отклонения молекулярной массы образцов и содержания

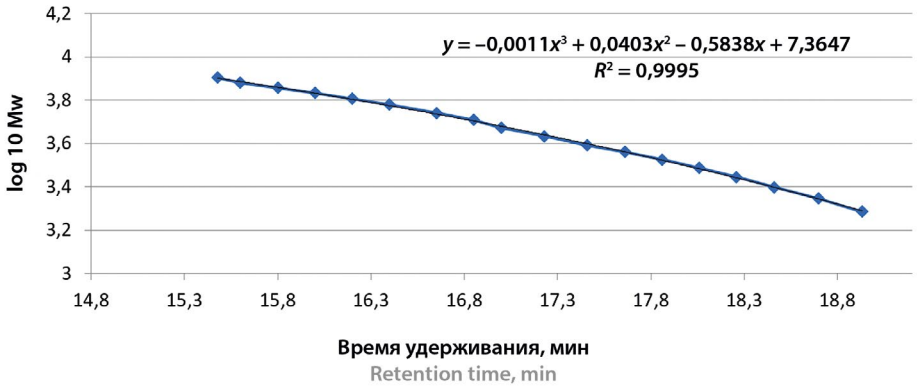


Рисунок 1. Калибровочная зависимость стандартного образца низкомолекулярного гепарина USP RS

Figure 1. Calibration dependence of the standard sample of low molecular weight heparin USP RS

Таблица 1. Молекулярная масса и содержание контролируемых фракций аттестуемого СОП

Table 1. Molecular weight and content of controlled fractions of certified standard sample

M_w, Да / M_w, Yes	S.1.1	S.1.2	S.2.1	S.2.2	S.3.1	S.3.2	S.4.1	S.4.2	S.5.1	S.5.2	S.6.1	S.6.2	Среднее Average	RSD, %
	4145	4152	4146	4146	4122	4137	4141	4137	4143	4111	4153	4105	4136	0,38
Фракция менее 2 кДа Fraction less than 2 kDa	11,4	11,5	12,1	11,5	11,8	11,8	11,8	11,7	11,5	12,2	11,8	12,1	11,77	2,24
Фракция 2–4 кДа Fraction 2–4 kDa	41,9	42,0	40,8	41,1	41,2	40,4	41,4	41,0	41,2	41,2	41,3	41,3	41,23	1,04
Фракция 2–8 кДа Fraction 2–8 kDa	81,9	81,4	80,8	81,5	81,6	81,5	81,4	81,4	81,7	80,9	81,0	84,8	81,66	1,28

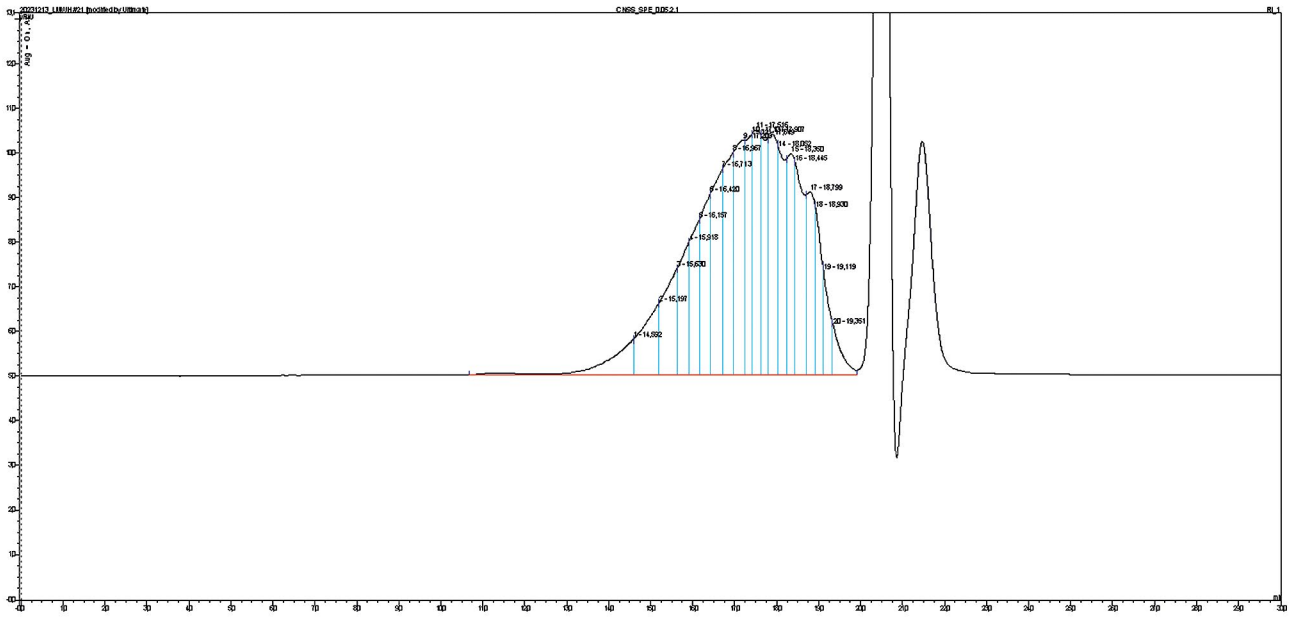


Рисунок 2. **Репрезентативная хроматограмма аттестуемого стандартного образца**

Figure 2. **Representative chromatogram of the certified standard sample**

Таблица 2. **Молекулярно-массовое распределение аттестуемого стандартного образца низкомолекулярного гепарина**

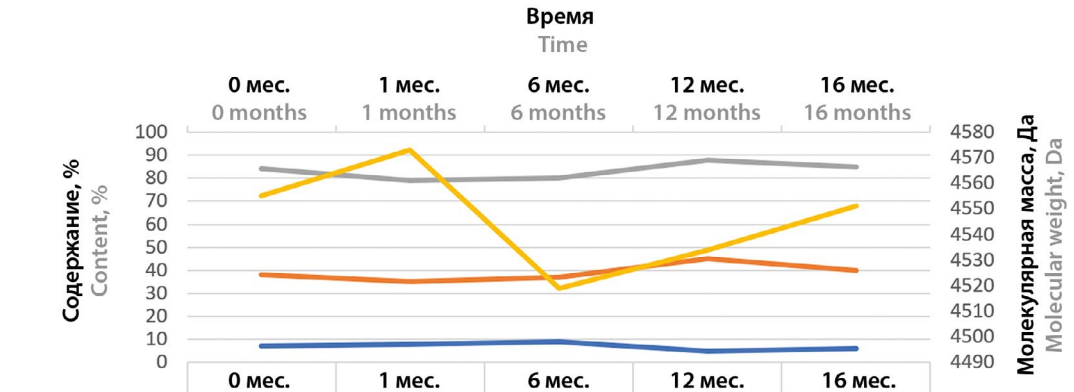
Table 2. **Molecular weight distribution of the certified standard low-molecular-weight heparin sample**

Образец Sample	Содержание (X_i, %) фракции низкомолекулярного гепарина с молекулярной массой (M_w, Da) Content (X_i, %) of the fraction of low molecular weight heparin with molecular weight (M_w, Da)																
M_w	18000	13600	12000	9600	8400	7200	6600	6000	5400	4800	4200	3600	3000	2400	1800	1200
S.1.1	0,19	0,17	0,27	1,94	2,82	5,08	4,25	4,71	6,66	7,40	10,58	22,78	12,76	13,23	6,78	0,39
S.1.2	0,28	0,29	0,33	1,99	2,85	5,02	4,24	4,94	6,72	7,08	10,46	22,27	12,75	13,19	7,15	0,44
S.2.1	0,18	0,19	0,32	2,03	2,90	5,05	4,65	4,67	6,17	7,43	10,75	22,54	12,56	12,99	7,05	0,51
S.2.2	0,18	0,16	0,30	2,03	2,91	5,19	4,50	4,93	6,64	7,12	10,25	23,04	12,64	12,90	6,77	0,43
S.3.1	0,21	0,14	0,29	1,82	2,82	5,07	4,13	4,95	6,76	7,12	10,68	22,67	12,91	12,87	7,06	0,51
S.3.2	0,18	0,13	0,26	1,92	2,84	5,16	4,59	4,12	7,21	6,89	10,33	23,15	12,88	13,04	6,82	0,47
S.4.1	0,21	0,19	0,28	2,02	2,83	5,02	4,11	5,29	6,03	7,40	10,11	22,63	12,63	13,91	6,82	0,52
S.4.2	0,20	0,20	0,28	1,99	2,81	5,10	4,86	4,04	6,2	7,81	10,59	22,33	13,01	13,10	6,92	0,54
S.5.1	0,17	0,19	0,29	1,99	2,79	5,01	5,03	3,87	7,00	7,20	10,60	22,54	12,90	12,90	7,08	0,43
S.5.2	0,21	0,23	0,30	1,98	2,85	4,98	4,23	4,67	6,32	7,62	10,62	22,00	13,31	12,91	7,24	0,54
S.6.1	0,23	0,33	0,36	2,08	2,84	5,16	4,81	4,10	6,33	7,49	10,11	22,57	13,25	13,04	6,84	0,46
S.6.2	0,22	0,17	0,25	1,87	2,77	5,12	4,14	4,48	6,67	7,05	10,36	22,73	12,86	13,30	7,35	0,67
$\underline{X}$	0,21	0,20	0,29	1,97	2,84	5,08	4,46	4,56	6,56	7,30	10,45	22,60	12,87	13,12	6,99	0,49
RSD, %	14,6	29,5	10,5	3,75	1,4	1,3	7,2	9,7	5,4	3,7	2,1	1,4	1,8	2,2	2,8	15,0

контролируемых фракций не превышает 2,5 % (таблица 1), что может свидетельствовать о пригодности СОП для контроля субстанции надропарина кальция и других низкомолекулярных гепаринов по показателю «молекулярно-массовое распределение».

Детальный анализ молекулярно-массового распределения (таблица 2) показывает «классическую» зависимость RSD от величины среднего со значительным увеличением до 30 % при малых значениях доли фракции (менее 0,5 %). Это может быть связано, в первую очередь, с принятой моделью регрессионного анализа (полином 3 степени) для охвата всего диапазона молекулярных масс низкомолекулярных гепаринов.

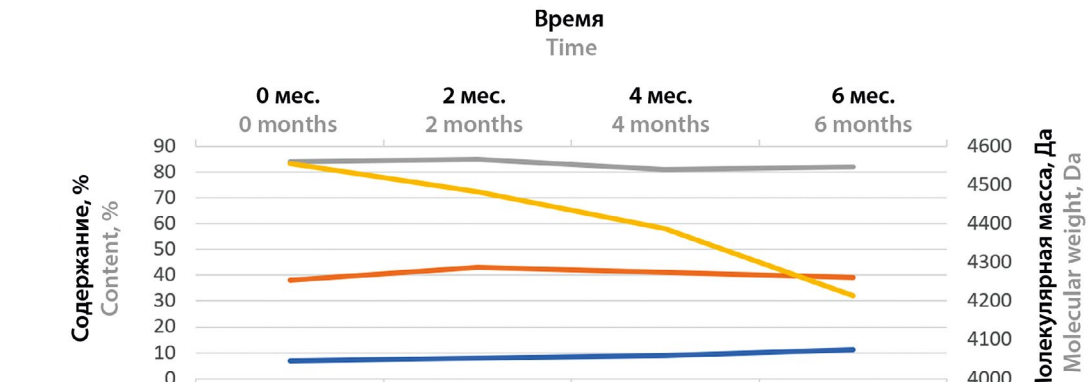
Сравнение характеристик молекулярно-массового распределения аттестуемого (CO_i) при хранении в течение 16 месяцев при температуре ниже 8 °C и в течение 6 месяцев при температуре –40 °C международного стандартного образца (CO_{St}) представлено на рисунках 3 и 4.



	0 мес. 0 months	1 мес. 1 months	6 мес. 6 months	12 мес. 12 months	16 мес. 16 months
<2 кДа, % <2 kDa, %	7	8	9	5	6
2–4 кДа, % 2–4 kDa, %	38	35	37	45	40
2–8 кДа, % 2–8 kDa, %	84	79	80	88	85
Mw, Да Mw, Da	4555	4573	4519	4534	4551

Рисунок 3. **График зависимости изменений молекулярно-массовых характеристик и молекулярной массы от времени при температуре 8 °С**

Figure 3. **Graph of changes in molecular weight characteristics and molecular weight versus time at 8 °C**



	0 мес. 0 months	2 мес. 2 months	4 мес. 4 months	6 мес. 6 months
<2 кДа, % <2 kDa, %	7	8	9	11
2–4 кДа, % 2–4 kDa, %	38	43	41	39
2–8 кДа, % 2–8 kDa, %	84	85	81	82
Mw, Да Mw, Da	4555	4483	4387	4214

Рисунок 4. **График зависимости изменений молекулярно-массовых характеристик и молекулярной массы от времени при температуре –40 °С**

Figure 4. **Graph of changes in molecular weight characteristics and molecular weight over time at a temperature of –40 °C**

Таким образом, установлено, что в течение 16 месяцев при температуре хранения ниже 8 °С молекулярная масса и молекулярно-массовые характеристики стандартных образцов низкомолекулярного гепарина значимо не изменяются. Однако в растворе СОП при температуре хранения –40 °С в течение 6 месяцев деградировали более чем на 10 %. Поэтому рекомендованный срок хранения растворов СОП при температуре –40 °С – 3 месяца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования разработан протокол получения стандартного образца предприятия низкомолекулярного гепарина для стандартизации субстанции надропарина кальция по показателю «молекулярно-массовое распределение». Установленный срок хранения образца – не менее 16 месяцев при температуре ниже 8 °С. Показана стабильность растворов стандартного образца при температуре хранения –40 °С в течение 3 месяцев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia J., Yu T., Zhang X., Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507–513. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
2. Нарделли П., Ландони Д. COVID-19-ассоциированный тромбовоспалительный статус: гипотеза MicroCLOTS и ее перспективы. *Общая реаниматология*. 2020;16(3):14–15. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-0-2.
3. Fox S. E., Akmatbekov A., Harbert J. L., Li G., Brown J. Q., Vander Heide R. S. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020;8(7):681–686. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30243-5.
4. Lazrak H. H., René É., Elftouh N., Leblanc M., Lafrance J.-P. Safety of low-molecular-weight heparin compared to unfractionated heparin in hemodialysis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrology*. 2017;18:187. DOI: 10.1186/s12882-017-0596-4.
5. Браилова Н. В., Дудинская Е. Н., Кузнецова В. А., Ткачева О. Н. Остеопороз и антитромботическая терапия. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(5):176–182. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4173.
6. Богачев В. Ю., Болдин Б. В., Родионов С. В. Низкомолекулярные гепарины во флебологической практике: в фокусе парнапарин. *Лечебное дело*. 2019;2:80–89. DOI: 10.24411/2071-5315-2019-12116.
7. Чупрова А. В., Лоскутова С. А., Шмаков А. Н. Контролируемая антикоагулянтная терапия в педиатрии. *Педиатрия*. 2004;2:52–57.
8. Huhle G., Geberth M., Hoffmann U., Heene D. L., Harenberg J. Management of heparin-associated thrombocytopenia in pregnancy with subcutaneous r-hirudin. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2000;49(1):67–69. DOI: 10.1159/000010216.
9. Кумыкова З. Х. Применение Фраксипарина во время планирования и ведения беременности при привычном невынашивании. *Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения*. 2015;4(10):77–80.
10. Cosmi B. Management of idiopathic venous thromboembolism. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2016;14(12):1371–1384. DOI: 10.1080/14779072.2016.1248406.
11. Грачева И. Л., Казакова И. А. Клинические аспекты применения надропарина кальция в терапии хронического пиелонефрита. *Вестник современной клинической медицины*. 2010;3(1):48–49.
12. Шмаков А. Н., Бударова К. В., Елизарьева Н. Л., Кохно В. Н. Место низкомолекулярных гепаринов в интенсивной терапии печеночной недостаточности. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020;40(1):110-114.
13. Щепочкина О. Ю., Гегечкори В. И., Прокофьева В. И., Чепило Д. А., Левко А. А., Чадова Н. Н., Шестаков В. Н. Современные подходы к разработке стандартных образцов лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(7):49–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-7-49-54.

REFERENCES

1. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia J., Yu T., Zhang X., Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507–513. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
2. Nardelli P., Landoni G. COVID-19-Related Thromboinflammatory Status: MicroCLOTS and Beyond (Editorial). *General Reanimatology*. 2020;16(3):14–15. (In Russ.) DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-0-2.
3. Fox S. E., Akmatbekov A., Harbert J. L., Li G., Brown J. Q., Vander Heide R. S. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020;8(7):681–686. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30243-5.
4. Lazrak H. H., René É., Elftouh N., Leblanc M., Lafrance J.-P. Safety of low-molecular-weight heparin compared to unfractionated heparin in hemodialysis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrology*. 2017;18:187. DOI: 10.1186/s12882-017-0596-4.
5. Brailova N. V., Dudinskaya E. N., Kuznesova V. A., Tkacheva O. N. Osteoporosis and antithrombotic therapy. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(5):176–182. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4173.
6. Bogachev V. Yu., Boldin B. V., Rodionov S. V. Low Molecular Weight Heparins in Phlebological Practice: Focus on Parnaparin. *Lechebnoe delo*. 2019;2:80–89. (In Russ.) DOI: 10.24411/2071-5315-2019-12116.
7. Chuprova A. V., Loskutova S. A., Shmakov A. N. Controlled anticoagulant therapy in pediatrics. *Pediatrics*. 2004;2:52–57. (In Russ.)
8. Huhle G., Geberth M., Hoffmann U., Heene D. L., Harenberg J. Management of heparin-associated thrombocytopenia in pregnancy with subcutaneous r-hirudin. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2000;49(1):67–69. DOI: 10.1159/000010216.
9. Kumykova Z. Kh. Fraxiparine prescription during planning and management of pregnancy in case of habitual miscarriage. *Obstetrics and gynecology. News, Opinions, Training*. 2015;4(10):77–80. (In Russ.)
10. Cosmi B. Management of idiopathic venous thromboembolism. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2016;14(12):1371–1384. DOI: 10.1080/14779072.2016.1248406.
11. Gracheva I. L., Kazakova I. A. Clinical aspects of the use of nadroparin calcium in the treatment of chronic pyelonephritis. *The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*. 2010;3(1):48–49. (In Russ.)
12. Shmakov A. N., Budarova K. V., Elizareva N. L., Kokhno V. N. Place of low molecular weight heparins in intensive therapy of heratic insufficiency. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2020;40(1):110–114. (In Russ.)
13. Shchepochkina O. Yu., Gegechkori V. I., Prokof'eva V. I., Chepilo D. A., Levko A. A., Chadova N. N., Shestakov V. N. Modern approaches to the development of drug standards. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2020;54(7):49–54. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-7-49-54.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.03

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1783

Check for updates

CC BY 4.0

Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

М. А. Токарева[1, 2]✉, Е. С. Мельников[1, 2], М. В. Белова[1, 3], Е.Н. Фишер[1, 4], Т. А. Родина[2], И. Е. Шохин[5, 6]

[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] Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени И. В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ГКБ им. И. В. Давыдовского ДЗМ»). 109240, Россия, г. Москва, ул. Яузская, д. 11

[3] Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»). 129090, Россия, г. Москва, Большая Сухаревская площадь, д. 3

[4] Общество с ограниченной ответственностью «Лаборатория фармацевтических исследований» (ООО «ЛФИ»). 121205, Россия, г. Москва, тер. Инновационного Центра Сколково, Большой б-р, д. 42, стр. 1, этаж 2, помещ. 243

[5] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

[6] Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

✉ **Контактное лицо:** Токарева Маргарита Алексеевна. **E-mail:** tokareva_m_a@student.sechenov.ru

ORCID: М. А. Токарева – https://orcid.org/0000-0001-7684-358X; Е. С. Мельников – https://orcid.org/0000-0002-8993-4808;
М. В. Белова – https://orcid.org/0000-0002-0861-5945; Е. Н. Фишер – https://orcid.org/0000-0002-6456-7669;
Т. А. Родина – https://orcid.org/0000-0002-0528-3068; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 16.02.2024 **Статья принята в печать:** 27.03.2024 **Статья опубликована:** 15.04.2024

Резюме

Введение. В последние годы растет число разрабатываемых и регистрируемых лекарственных средств пептидной природы, в связи с чем необходимы современные аналитические подходы и методики определения этих веществ в биологических матрицах для изучения фармакокинетики. Пептиды по структуре занимают промежуточное положение между малыми молекулами и биополимерами, что создаёт трудности при разработке методик их определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Дериватизация пептидов может способствовать достижению оптимального хроматографического разделения и снижению нижнего предела количественного определения методики.

Цель. Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида (ТДП) треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы. Определение ТДП в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. При пробоподготовке использована комбинация методов осаждения белков плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле, жидкость-жидкостной экстракции, дериватизации пептида пропионовым ангидридом. Внутренний стандарт (ВС): треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-лейцил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме, элюент А – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде, элюент В – 0,1%-й муравьиной кислоты в ацетонитриле. Колонка: Waters XBridge C18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм. Ионизация методом электрораспыления в положительном режиме. При детектировании в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM) для 4-замещенного ТДП пропионата использовали переходы: 681,30 → 73,95 m/z, 681,30 → 84,00 m/z, 681,30 → 101,90 m/z, 681,30 → 140,10 m/z, для 4-замещенного ВС пропионата: 686,00 → 74,10 m/z, 686,00 → 84,05 m/z, 686,00 → 102,00 m/z, 686,00 → 140,00 m/z.

Результаты и обсуждение. Валидация методики проведена в соответствии с требованиями Евразийского экономического союза по параметрам: селективности, эффекту матрицы, градуировочной кривой, правильности и прецизионности, степени извлечения, нижнему пределу количественного определения, переносу пробы, стабильности.

Заключение. Проведена разработка и валидация методики определения ТДП в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон составил 5,00–1000,00 нг/мл, что позволяет использовать методику при изучении фармакокинетики ТДП.

Ключевые слова: пептид, плазма крови, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, дериватизация

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

Вклад авторов. Е. С. Мельников, М. А. Токарева, Е. Н. Фишер, Т. А. Родина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. И. Е. Шохин, Е. Н. Фишер и М. В. Белова отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Токарева М. А., Мельников Е. С., Белова М. В., Фишер Е. Н., Родина Т. А., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):171–180. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1783

© Токарева М. А., Мельников Е. С., Белова М. В., Фишер Е. Н., Родина Т. А., Шохин И. Е., 2024
© Tokareva M. A., Melnikov E. S., Belova M. V., Fisher E. N., Rodina T. A., Shohin I. E., 2024

HPLC-MS/MS method development and validation for the determination of tetradecapeptide in human plasma

Margarita A. Tokareva[1, 2] ✉, Evgeny S. Melnikov[1, 2], Maria V. Belova[1, 3], Elizaveta N. Fisher[1, 4], Tatiana A. Rodina[2], Igor E. Shohin[5, 6]

[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] Clinical Hospital. I. V. Davidovsky Department of Health of the city of Moscow. 11, Yauzskaya str., Moscow, 109240, Russia
[3] N. V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine. 3, Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia
[4] LLC "Laboratory of pharmaceutical research" (LLC "LFI"). Room 243, 42/1, Bolshoy Boulevard, ter. Skolkovo Innovation Centre, Moscow, 121205, Russia
[5] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117246, Russia
[6] National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute). 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia

✉ **Corresponding author:** Margarita A. Tokareva. **E-mail:** tokareva_m_a@student.sechenov.ru

ORCID: Margarita A. Tokareva – https://orcid.org/0000-0001-7684-358X; Evgeny S. Melnikov – https://orcid.org/0000-0002-8993-4808; Maria V. Belova – https://orcid.org/0000-0002-0861-5945; Elizaveta N. Fisher – https://orcid.org/0000-0002-6456-7669; Tatiana A. Rodina – https://orcid.org/0000-0002-0528-3068; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 16.02.2024 **Accepted:** 27.03.2024 **Published:** 15.04.2024

Abstract

Introduction. The number of peptide drugs being developed and registered has increased in recent years. Therefore, modern analytical approaches and methods are required to determine these substances in biological matrices during pharmacokinetic studies. Peptides are structurally intermediate between small molecules and biopolymers, making it difficult to develop methods for determining them using High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS). Peptide derivatization can help achieve optimal chromatographic separation and increase method sensitivity.

Aim. To develop and validate a method for the determination of the tetradecapeptide (TDP) threonyl-glutamyl-lysyl-lysyl-arginyl-arginyl-glutamayl-threonyl-valyl-glutamyl-arginyl-glutamyl-lysyl-glutamate in human plasma by HPLC-MS/MS.

Materials and methods. The determination of TDP in human plasma was performed by HPLC-MS/MS. Sample preparation included a combination of blood plasma protein precipitation with propionic acid solution in methanol, liquid-liquid extraction with chloroform, and peptide derivatization with propionic anhydride. Internal standard (IS) was threonyl-glutamyl-lysyl-lysyl-arginyl-arginyl-glutamayl-threonyl-leucyl-glutamyl-arginyl-glutamyl-lysyl-glutamate. Chromatographic separation was performed in gradient mode, eluent A was 0.1 % formic acid solution in water, eluent B was 0.1 % formic acid in acetonitrile. Column: Waters XBridge C18, 4.6 × 50 mm, 5 µm. Ionization source was electrospray in positive mode. Multiple reaction monitoring (MRM) transitions for 4-substituted TDP propionate were: 681.30 → 73.95 m/z, 681.30 → 84.00 m/z, 681.30 → 101.90 m/z, 681.30 → 140.10 m/z, and for 4-substituted IS propionate: 686.00 → 74.10 m/z, 686.00 → 84.05 m/z, 686.00 → 102.00 m/z, 686.00 → 140.00 m/z.

Results and discussion. Validation of the developed method was carried out in accordance with the requirements of Eurasian Economic Union and the following parameters were determined: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy and precision, recovery, lower limit of quantification, sample carryover, stability.

Conclusion. The method for the determination of TDP in human blood plasma by HPLC-MS/MS was developed and validated. The analytical range was 5.00–1000.00 ng/mL, allowing the method to be used to study TDP pharmacokinetics.

Keywords: peptide, blood plasma, HPLC-MS/MS, validation, derivatization

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. Evgeny S. Melnikov, Margarita A. Tokareva, Elizaveta N. Fisher and Tatyana A. Rodina participated in the development and validation of the bioanalytical methodology. Igor E. Shohin, Elizaveta N. Fischer and Maria V. Belova were responsible for the organizational part of the study. All the above authors participated in the discussion of the results obtained in the form of scientific discussion.

For citation: Tokareva M. A., Melnikov E. S., Belova M. V., Fisher E. N., Rodina T. A., Shohin I. E. HPLC-MS/MS method development and validation for the determination of tetradecapeptide in human plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(2):171–180. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1783

ВВЕДЕНИЕ

Пептиды обладают высокой специфичностью связывания с мишенями, что обеспечивает терапевтический эффект при применении в малых дозах и делает пептиды особо привлекательными для разработки новых лекарственных средств [1, 2]. В свете увеличивающегося количества регистрируемых лекарственных средств пептидной природы [3–7] проводится множество доклинических и клинических исследований[1] [8], для которых требуется разработка высокочувствительных методик определения пептидов в биологических образцах.

По своей структуре, молекулярной массе и физико-химическим свойствам пептиды занимают промежуточное положение между малыми молекулами и белками [9]. В связи с этим при работе с пептидны-

[1] ClinicalTrials.gov. Available at: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home. Accessed: 01.03.2024.

ми молекулами могут применяться различные аналитические подходы, характерные как для малых молекул, так и для биополимеров. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) получил широкое распространение при анализе малых молекул ввиду высокой чувствительности и специфичности, также этот метод применяется и для определения пептидов в биологических образцах [10–14]. При определении белков традиционно используется метод иммуноферментного анализа (ИФА) [enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA], применимый и для коротких пептидов [15, 16]. Определение некоторых пептидных молекул возможно как методом ВЭЖХ-МС/МС, так и с помощью ELISA [17, 18]. Проведение иммуноферментного анализа требует наличия соответствующих наборов либо их разработки собственными силами. Однако ELISA не всегда обеспечивает достаточную селективность за счет перекрестной реактивности, поэтому метод ВЭЖХ-МС/МС на сегодняшний день все чаще применяется в биоаналитических исследованиях лекарственных средств пептидной природы [10].

При разработке методик определения пептидов методом ВЭЖХ-МС/МС в биологических образцах следует уделять особое внимание выбору способа пробоподготовки, поскольку часто такие молекулы присутствуют в образце в крайне низких концентрациях и может потребоваться концентрирование пробы для увеличения чувствительности [19]. Кроме того, многие пептиды проявляют выраженные гидрофильные свойства [20], что необходимо учитывать как при пробоподготовке, так и при выборе условий хроматографического разделения. Ввиду гидрофильности не для всех соединений возможно подобрать оптимальные условия хроматографического разделения в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Альтернативой может стать применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC] [21, 22] либо дериватизация пептида с целью увеличения его липофильности [23]. Кроме того, за счет дериватизации может быть достигнута большая чувствительность при детектировании [23].

Другой важной особенностью многих пептидов является низкая стабильность в присутствии биологической матрицы, что следует учитывать при разработке и валидации биоаналитической методики [24, 25].

Целью настоящей работы является разработка и валидация методики определения тетрадекапептида (ТДП) [tetradecapeptide, TDP] треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата (рисунок 1) в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Ранее в научной литературе не были описаны биоаналитические методики определения данного пептида в биологических образцах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR (Shimadzu Corporation, Япония) с тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь, Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автоматическим пробоотборником. Для обработки первичных данных использовали программное обеспечение LabSolutions ver. 5.97 (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция/Нидерланды/Израиль), муравьиная кислота (98 %, PanReac, Испания), метанол (класс «х.ч.», ООО ТД «ХИММЕД», Россия), хлороформ (99,9 %, Honeywell, Германия), пропионовая кислота (99,84 %, BASF, Германия), пропионовый ангидрид (>99,8 %, Sigma-Aldrich, США), вода деминерализованная I класса (Milli-Q, Millipore, Франция). Стандартные образцы: треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат (Россия, количественное содержание 100,5 %), треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-лейцил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат (внутренний стандарт, ВС) [Internal standard, IS] (Россия, количественное содержание 98,1 %).

Исходные стандартные растворы ТДП и ВС готовили путем растворения навески в смеси ацетонитрил : вода (1 : 1). Концентрация исходных стандартных растворов 1 для ТДП и ВС составляла 1 000 000 нг/мл, концентрация исходного стандартного раствора 2 ТДП составляла 10 000 нг/мл.

Рабочие стандартные растворы ТДП готовили из исходных стандартных растворов ТДП 1 или 2 путем их разведения в смеси ацетонитрил : вода (1 : 1). Аликвоты рабочих стандартных растворов ТДП (10 мкл) помещали в центрифужные микропробирки вместимостью 2 мл и замораживали при –30 °С. Рабочий стандартный раствор ВС готовили путем разведения исходного стандартного раствора в смеси ацетонитрил : вода (1 : 1) до получения 2500 нг/мл. Исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –30 °С.

Приготовление градуировочных образцов и образцов контроля качества и пробоподготовка

Градуировочные образцы (ГО) и образцы контроля качества (КК) [quality control, QC] готовили путем добавления 190 мкл интактной плазмы крови в мик-

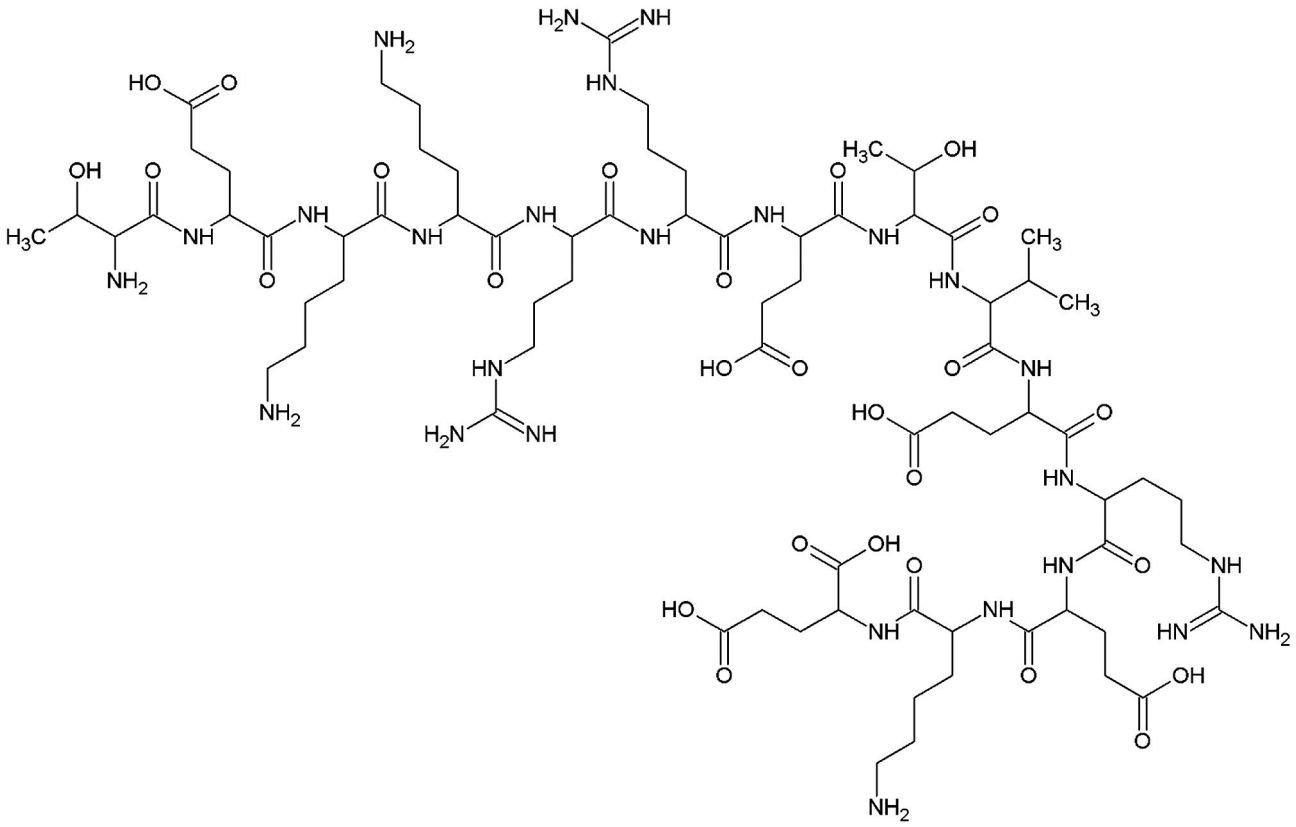


Рисунок 1. **Структура тетрадекапептида**

Figure 1. **Tetradecapeptide structure**

ропробирки типа «эппендорф» с заранее подготовленной аликвотой 10 мкл соответствующего рабочего стандартного раствора ТДП после размораживания с последующим интенсивным перемешиванием на встряхивателе типа «вортекс».

К 200 мкл образца (ГО, образца КК, образца интактной плазмы крови) прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС, 420 мкл раствора пропионовой кислоты в метаноле (1:20), перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 с, затем центрифугировали в течение 15 мин с относительным центробежным ускорением 15294g. Далее супернатант переносили в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 800 мкл хлороформа, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 с, затем центрифугировали в течение 15 мин с относительным центробежным ускорением 15294g. После центрифугирования отбирали около 200–250 мкл верхней (водной) фазы, переносили в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл и упаривали досуха в токе азота при комнатной температуре. К сухому остатку прибавляли 60 мкл раствора пропионовой кислоты в воде (1:5) и 55 мкл раствора пропионового ангидрида в ацетонитриле (1:10), перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 с, помещали пробирку в УЗ-баню при температуре 60 °С на 5 мин. Далее образец упаривали в токе азота при температуре 60 °С досуха. К полученному сухому остатку прибавляли 100 мкл воды Milli-Q, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 с, переносили в полипропиленовые вставки в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Концентрации ТДП и ВС в ГО (уровни 1–8) и образцах КК, соответствующих нижнему пределу количественного определения (НПКО) [lower limit of quantification, LLOQ], средненизкому [low-medium, LM], среднему [medium, M] и верхнему [high, H] уровням, представлены в таблице 1.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Хроматографическая колонка: Waters XBridge C18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза (ПФ): 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему) – элюент А, 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объему) – элюент В.
- Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин.

Таблица 1. Концентрации определяемых веществ в градуировочных образцах и образцах КК

Table 1. Concentrations of analytes in calibration and QC samples

Уровень Level	Концентрация, нг/мл Concentration, ng/mL	
	ТДП TDP	ВС IS
0	0,00	125,00
1	5,00	125,00
2	10,00	125,00
3	20,00	125,00
4	500,00	125,00
5	100,00	125,00
6	200,00	125,00
7	500,00	125,00
8	1000,00	125,00
LLOQ	5,00	125,00
L	15,00	125,00
LM	30,00	125,00
M	300,00	125,00
H	750,00	125,00

Градиент по составу ПФ представлен в таблице 2.

- Объем вводимой пробы: 7 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–5,50 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °С, линия десольватации 250 °С, напряжение на капилляре +5,0 кВ.

Таблица 2. Градиент по составу ПФ

Table 2. Mobile phase gradient

Время, мин Time, min	Элюент В, % Eluent B, %
0,00–2,00	10 → 22
2,00–2,40	22 → 100
2,40–3,60	100
3,60–4,10	100 → 10
4,10–5,50	10

- Время удерживания 4-замещенного ТДП пропионата: около 1,72 мин.
- Время удерживания 4-замещенного ВС пропионата: около 1,93 мин.
- Условия детектирования 4-замещенного ТДП пропионата в режиме MRM: 681,30 → 73,95 m/z, 681,30 → 84,00 m/z, 681,30 → 101,90 m/z, 681,30 → 140,10 m/z.
- Условия детектирования 4-замещенного ВС пропионата в режиме MRM: 686,00 → 74,10 m/z; 686,00 → 84,05 m/z, 686,00 → 102,00 m/z, 686,00→ 140,00 m/z.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке ВЭЖХ-МС/МС-методики для ТДП последовательно подбирались и оптимизировались условия детектирования и хроматографического разделения для достижения максимальной чувствительности и селективности.

Молекула ТДП обладает выраженными основными свойствами за счет наличия 3 остатков лизина, 3 остатков аргинина и N-концевой аминогруппы. Расчетное значение изоэлектрической точки составляет 8,17[1]. Благодаря этому исследуемый ТДП легко растворяется в воде и кислотах, а также для него характерно образование многозарядных квазимолекулярных ионов при положительной ионизации электрораспылением. Молекулярная масса ТДП составляет 1818,02 Да[2], исходя из этого были спрогнозированы значения m/z для одно- и многозарядных квазимолекулярных ионов, которые могут быть обнаружены в масс-спектре полного ионного тока (1819,00, 909,60, 607,10, 455,50, 364,60 m/z). Расчеты полностью согласовывались с экспериментальным масс-спектром, однако в нем практически не наблюдался однозарядный ион (1819,00 m/z).

При разработке методики было отмечено, что ввиду выраженных гидрофильных свойств ТДП обладает низким сродством к октадецилсиликагелю: время удерживания ТДП соответствовало мертвому времени хроматографической системы даже при снижении объемной доли элюента В до 2 %. Оптимальным решением данной проблемы является дериватизация ТДП пропионовым ангидридом. Этот подход хорошо изучен для пептидов, содержащих большое количество остатков лизина, и позволяет повысить липофильность, а также упрощает интерпретацию масс-спектров фрагментации квазимолекулярных ионов [26–28].

В реакции ТДП с пропионовым ангидридом в нейтральной и слабокислой среде могут участвовать ε-аминогруппы лизина и N-концевая аминогруппа [27]. Таким образом, при полном протекании реакции для ТДП ожидалось образование 4-замещенных пропионилированных производных. В масс-спектре полного ионного тока для продуктов дериватизации наибольшей интенсивностью обладал сигнал 681,30 m/z, что соответствует расчетам для трехзарядного квазимолекулярного иона четырежды пропионилированного ТДП.

При разработке методики пробоподготовки было установлено, что ТДП хорошо извлекается из плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле. Далее образец очищали от липофильных компонентов с помощью экстракции хлороформом. Параллельно избыточное количество метанола переходило в органическую фазу, а исследуемый пептид концентрировался в водной фазе. Последующие этапы пробоподготовки были экспериментально опти-

[1] Compute pI/Mw tool. Available at: https://web.expasy.org/compute_pi/ Accessed: 01.03.2024.

[2] Peptide calculator. Available at: https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/ Accessed: 01.03.2024.

мизированы для получения четырежды пропионилированного производного ТДП с максимальным выходом. В образцах не наблюдали ни продуктов неполного протекания реакции (одно-, дву-, тризамещенные варианты ТДП), ни продуктов избыточного пропионилирования с участием остатков аргинина.

В качестве ВС использовали аналог исследуемого ТДП с одной заменой аминокислоты в последовательности (замена валина на лейцин), что обеспечило увеличение молекулярной массы, но не оказало значительного влияния на кислотно-основные свойства ВС по сравнению с ТДП.

Валидация методики

Валидация разработанной методики была проведена по следующим параметрам: селективности, эффекту матрицы, градуировочной кривой, правильности (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионности (на уровнях внутри цикла, между циклами), степени извлечения, нижнему пределу количественного определения, переносу пробы, стабильности (стабильности исходных и рабочих стандартных растворов ТДП и ВС; краткосрочной стабильности («настольной» и «постпрепаративной»); стабильности при трехкратной заморозке-разморозке; долгосрочной стабильности ТДП в матрице)[1, 2, 3].

Селективность и специфичность

Анализировали 6 образцов нормальной интактной плазмы крови, по одному образцу гемолизной и хилёзной плазмы крови, а также 8 образцов на уровне НПКО, приготовленных с использованием интактной плазмы из тех же источников. Сигнал ТДП на хроматограммах интактной плазмы крови не превышал 11,29 % от сигнала на хроматограмме образца НПКО и 3,83 % в случае ВС, что соответствует нормам (не более 20 % для анализируемого вещества и 5 % для ВС). Хроматограммы образцов интактной плазмы крови и на уровне НПКО представлены на рисунках 2 и 3.

Градуировочная кривая

Проводили анализ ГО в диапазоне концентраций 5,00–1000,00 нг/мл. По полученным значениям строили градуировочные графики в координатах «отношение площади пика ТДП к площади пика ВС от отношения концентрации ТДП к концентрации ВС в плазме крови». В ходе валидации методики проведено 10 аналитических циклов, и во всех случаях коэффициенты корреляции составили более 0,99, а отклонения рассчитанных концентраций для ГО соответствовали нормам (не более 20 % на уровне НПКО и 15 % для остальных уровней). Пример градуировочного графика представлен на рисунке 4.

Правильность и прецизионность

Проводили анализ образцов КК, соответствующих уровням LLOQ, L, LM, M, H. Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня концентраций ТДП. Правильность и прецизионность были оценены внутри цикла, между двумя циклами, между тремя циклами. Максимальное отклонение среднего значения рассчитанной концентрации от номинальной составило 6,14 %, а относительное стандартное отклонение не превышало 12,33 % при нормах для обеих величин не более 20 % на уровне НПКО и 15 % для остальных уровней.

Степень извлечения и эффект матрицы

Средняя степень извлечения ТДП из образцов плазмы крови (8 источников интактной плазмы крови, включая по одному источнику гемолизной и хилезной плазмы) составила 51 % для уровня L, 50 % для уровня M, 62 % для уровня H, относительные стандартные отклонения составили 7,40, 5,05 и 10,85 % соответственно. Хотя степень извлечения ТДП не слишком высока, она сопоставима со степенью извлечения ВС, и средняя, нормализованная по ВС степень извлечения составила 95, 92 и 90 % для уровней L, M, H соответственно, относительные стандартные отклонения – 5,70, 6,58 и 8,53 %.

При оценке эффекта матрицы (8 источников интактной плазмы крови, включая по одному источнику гемолизной и хилезной плазмы) было обнаружено значительное усиление аналитического сигнала под действием соэлюирующихся компонентов образца по сравнению с пробами, приготовленными без использования биологической матрицы. Усредненный эффект матрицы для уровня L составил 2,94, а для уровня H составил 3,05, относительные стандартные отклонения составили 4,12 и 3,03 % соответственно, при этом эффект матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, составил 1,01 и 1,11 для уровней L и H соответственно, относительные стандартные отклонения – 5,86 и 3,82 %.

[1] Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 15.02.2023) «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107. Ссылка активна на 01.03.2024.

[2] EMA. European Medicines Agency. Bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation-scientific-guideline. Accessed: 01.03.2024.

[3] Research C for DE and. U.S. Food and Drug Administration. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry. Accessed: 01.03.2024.

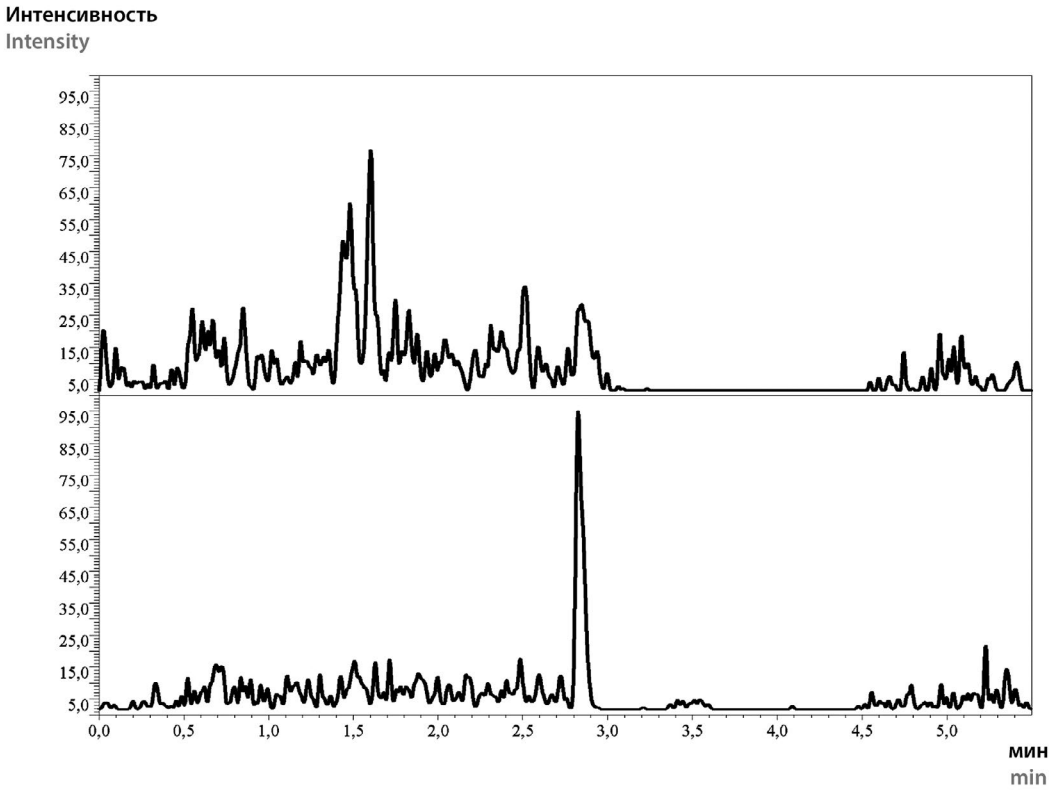


Рисунок 2. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови**

Figure 2. **Chromatogram of blank plasma sample**

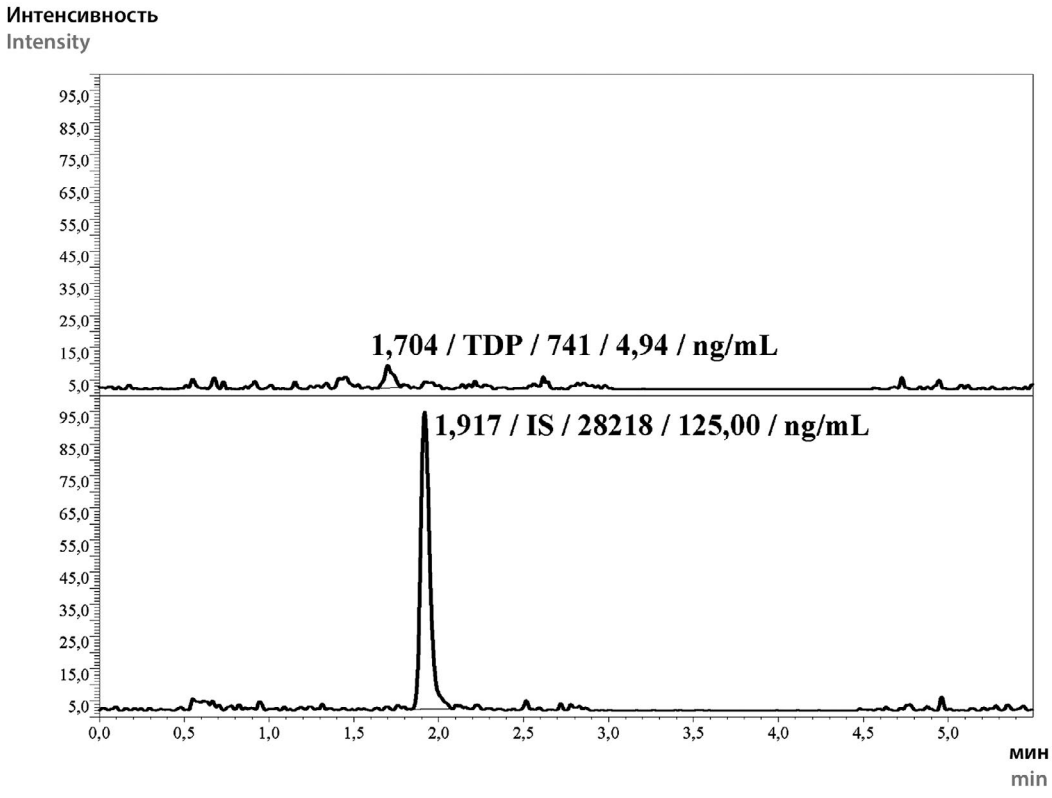


Рисунок 3. **Хроматограмма образца плазмы крови на уровне нижнего предела количественного определения**

Figure 3. **Chromatogram of plasma sample at lower limit of quantification**

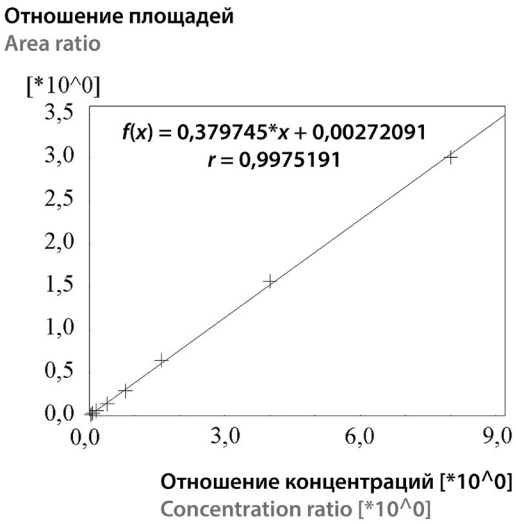


Рисунок 4. **Градуировочный график, цикл № 1**

Figure 4. **1st run calibration curve**

Результаты оценки степени извлечения и эффекта матрицы демонстрируют, что ВС по своим свойствам подобен ТДП и позволяет компенсировать различия в составе проб и возможные колебания эффективности процессов на различных стадиях пробоподготовки.

Перенос пробы

Доказано отсутствие аналитически значимого переноса пробы при последовательном анализе градуировочного образца с наибольшей концентрацией и образца интактной плазмы крови. На хроматограмме образца интактной плазмы крови площадь пика ТДП не превышала 13,67 % от площади пика на уровне НПКО (норма – не более 20 %), а площадь пика ВС составляла не более 2,75 % от площади пика на хроматограмме образца с добавлением ВС (норма – не более 5 %).

Стабильность

Было проанализировано по три образца на уровнях L и H для оценки «настольной» и «постпрепаративной» стабильности, стабильности исходных и рабочих стандартных растворов, стабильности при трехкратной заморозке-разморозке, долгосрочной стабильности ТДП в плазме.

Стабильность при замораживании-размораживании [freeze-thaw stability, FT] была оценена отдельно после каждого размораживания, всего выполнено 3 цикла. Каждая анализируемая проба подвергалась замораживанию не менее чем в течение 24 ч при температуре от –32 до –28 °С и оттаиванию в течение 6 ч при комнатной температуре. После этого часть проб помещали обратно в морозильную камеру, а часть анализировали. Полученные результаты приведены в таблице (таблица 3).

Таблица 3. **Оценка стабильности при трехкратной заморозке-разморозке ТДП на уровнях L и H**

Table 3. **Triple freeze-thaw cycles stability evaluation of TDPs at the levels L and H**

Уровень Level	**L**	**H**	**E, % (L)**	**E, % (H)**
Введено, нг/мл Inject, ng/mL	**15,00**	**750,00**		
FT – 1 цикл, найдено, нг/мл FT – 1 run, found ng/mL	16,57	732,52	10,45	–2,33
	14,12	756,80	–5,85	0,91
	16,37	782,04	9,16	4,27
Среднее Mean	15,69	757,12	4,59	0,95
FT – 2 цикл, найдено, нг/мл FT – 2 run, found ng/mL	13,47	693,86	–10,21	–7,49
	15,03	680,50	0,23	–9,27
	15,76	676,17	5,08	–9,84
Среднее Mean	14,75	683,51	–1,64	–8,87
FT – 3 цикл, найдено, нг/мл FT – 3 run, found ng/mL	11,65	673,28	–22,35	–10,23
	13,26	692,31	–11,63	–7,69
	13,70	705,23	–8,64	–5,97
Среднее Mean	12,87	690,27	–14,20	–7,96

Доказана «настольная» стабильность ТДП в составе плазмы крови при комнатной температуре в течение 12 ч. Среднее значение концентрации ТДП (% от номинальной концентрации) составило 90,02 % на уровне L и 94,62 % на уровне H.

Готовые пробы были стабильны в течение 24 ч при температуре от 2 до 8 °С. Среднее значение концентрации ТДП (% от номинальной концентрации) составило 101,01 % на уровне L и 102,24 % на уровне H.

Долгосрочная стабильность ТДП в плазме крови была оценена при температуре от –32 до –28 °С. Так как до начала исследования не было доступной информации о стабильности ТДП в плазме крови, была проведена расширенная оценка долгосрочной стабильности в плазме крови при хранении образцов в течение 5, 12, 19, 26, 35, 67 дней (рисунки 5, 6).

Стабильность исходного и рабочих стандартных растворов была изучена при хранении в течение 56 дней при температуре от –32 до –28 °С. Среднее значение концентрации ТДП (% от номинальной концентрации) составило 88,52 % на уровне L и 97,60 % на уровне H для исходного раствора, 91,02 % на уровне L и 109,48 % на уровне H для рабочих растворов. Для ВС среднее значение площади пика в случае исходного раствора составило 111,16 и 103,28 % для рабочего раствора относительно среднего значения площади пика для свежеприготовленного раствора.

Для всех видов стабильности полученные величины относительной погрешности соответствуют нормам (в диапазоне от –15 до +15 %).

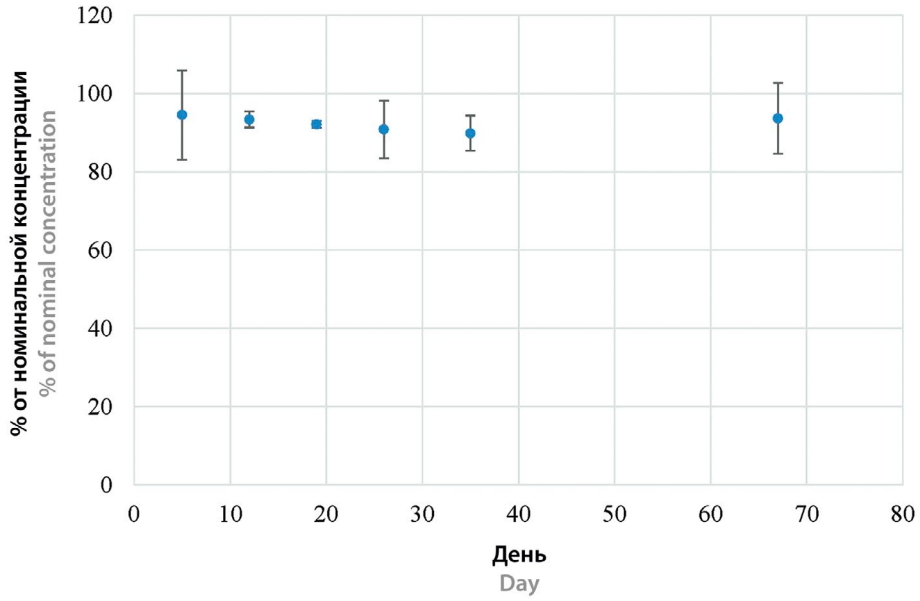


Рисунок 5. **Стабильность тетрадекапептида в плазме крови на уровне L при температуре от –32 до –28 °C**

Figure 5. **Tetradecapeptide stability in plasma at the level L at temperatures from –32 to –28 °C**

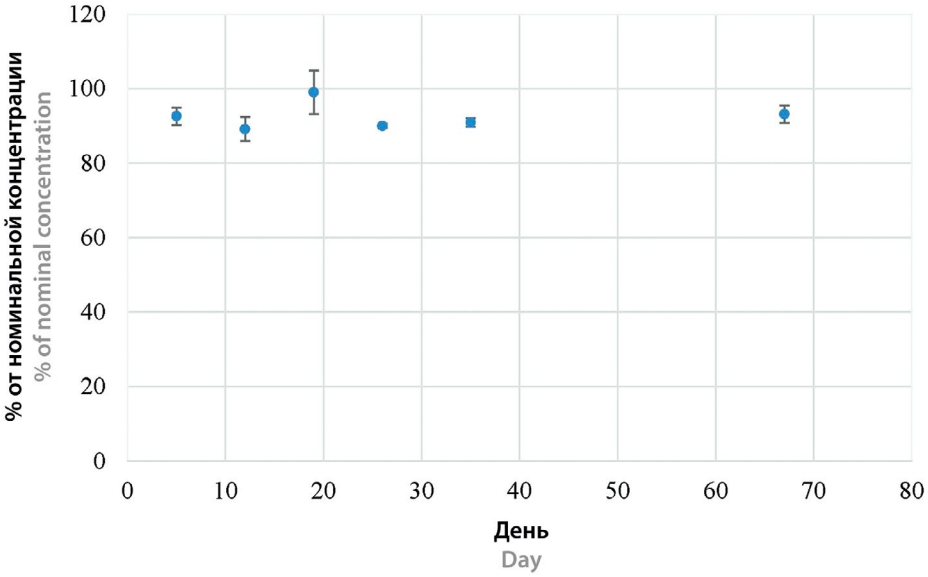


Рисунок 6. **Стабильность тетрадекапептида в плазме крови на уровне H при температуре от –32 до –28 °C**

Figure 6. **Tetradecapeptide stability in plasma at the level H at temperatures from –32 to –28 °C**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка и валидация методики определения ТДП в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Пробоподготовка включала этапы осаждения белков плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле, жидкость-жидкостной экстракции хлороформом с последующим упариванием и дериватизацией ТДП и ВС пропионовым ангидридом. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 5,00–1000,00 нг/мл в плазме крови, что позволяет использовать ее для изучения фармакокинетики ТДП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERNCES

1. De la Torre B. G., Albericio F. Peptide Therapeutics 2.0. *Molecules*. 2020;25(10):2293. DOI: 10.3390/molecules25102293.
2. Torchilin V. Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2008;5(2–3):e95–e103. DOI: 10.1016/j.ddtec.2009.01.002.

3. Al Shaer D., Al Musaimi O., Albericio F., de la Torre B. G. 2018 FDA Tides Harvest. *Pharmaceuticals*. 2019;12(2):52. DOI: 10.3390/ph12020052.
4. Al Shaer D., Al Musaimi O., Albericio F., de la Torre B. G. 2019 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2020;13(3):40. DOI: 10.3390/ph13030040.
5. Al Musaimi O., Al Shaer D., Albericio F., de la Torre B. G. 2020 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2021;14(2):145. DOI: 10.3390/ph14020145.
6. Al Shaer D., Al Musaimi O., Albericio F., de la Torre B. G. 2021 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2022;15(2):222. DOI: 10.3390/ph15020222.
7. Al Musaimi O., Al Shaer D., Albericio F., de la Torre B. G. 2022 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*. 2023;16(3):336. DOI: 10.3390/ph16030336.
8. Kaspar A. A., Reichert J. M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today*. 2013;18(17–18):807–817. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.05.011.
9. Apostolopoulos V., Bojarska J., Chai T.-T., Elnagdy S., Kaczmarek K., Matsoukas J., New R., Parang K., Paredes Lopez O., Parhiz H., Perera C. O., Pickholz M., Remko M., Saviano M., Skwarczynski M., Tang Y., Wolf W. M., Yoshiya T., Zabrocki J., Zielenkiewicz P., AlKhazindar M., Barriga V., Kelaidonis K., Mousavinezhad Sarasia E., Toth I. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules*. 2021;26(2):430. DOI: 10.3390/molecules26020430.
10. Ewles M., Goodwin L. Bioanalytical approaches to analyzing peptides and proteins by LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 2011;3(12):1379–1397. DOI: 10.4155/bio.11.112.
11. Rauh M. LC-MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B*. 2012;883–884:59–67. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.09.030.
12. Fisher E. N., Melnikov E. S., Gegeckori V., Potoldykova N. V., Enikeev D. V., Pavlenko K. A., Agatonovic-Kustrin S., Morton D. W., Ramenskaya G. V. Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of Short Peptide-Based Drugs in Human Blood Plasma. *Molecules*. 2022;27(22):7831. DOI: 10.3390/molecules27227831.
13. Ding J.-S., Peng W.-X., Zhang Z.-H., Li H.-D., Jiang X.-H. Determination of octreotide in human plasma by HPLC-MS with solid-phase extraction and study on the relative bioavailability of domestic and imported octreotide injections. *Yao Xue Xue Bao*. 2004;39(7):542–545.
14. Sauter M., Uhl P., Burhenne J., Haefeli W. E. Application of triple quadrupole tandem mass spectrometry to the bioanalysis of collision-induced dissociation-resistant cyclic peptides – Ultra-sensitive quantification of the somatostatin-analog pasireotide utilizing UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;194:113728. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113728.
15. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015;72:4–15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
16. Chen Y., Liang Y., Lv R., Xia N., Xue T., Zhao S. An immunological determination of somatostatin in pharmaceutical by sandwich ELISA based on IgY and polyclonal antibody. *Microchemical Journal*. 2019;145:532–538. DOI: 10.1016/j.microc.2018.11.019.
17. Oh H. S., Choi M., Lee T. S., An Y., Park E. J., Kim T. H., Shin S., Shin B. S. Pharmacokinetics and brain distribution of the therapeutic peptide liraglutide by a novel LC-MS/MS analysis. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2023;14(1):19. DOI: 10.1186/s40543-023-00382-5.
18. Malm-Erjefält M., Bjørnsdottir I., Vanggaard J., Helleberg H., Larsen U., Oosterhuis B., van Lier J. J., Zdravkovic M., Olsen A. K. Metabolism and Excretion of the Once-Daily Human Glucagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide in Healthy Male Subjects and Its In Vitro Degradation by Dipeptidyl Peptidase IV and Neutral Endopeptidase. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(11):1944–1953. DOI: 10.1124/dmd.110.034066.
19. De Souza I. D., Queiroz M. E. C. Advances in sample preparation and HPLC–MS/MS methods for determining amyloid-β peptide in biological samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2023;415(18):4003–4021. DOI: 10.1007/s00216-023-04631-9.
20. Hamman J. H., Enslin G. M., Kotzé A. F. Oral Delivery of Peptide Drugs. *BioDrugs*. 2005;19(3):165–177. DOI: 10.2165/00063030-200519030-00003.
21. Le Maux S., Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. Improved short peptide identification using HILIC–MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence. *Food Chemistry*. 2015;173:847–854. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.104.
22. Doulou E., Kalomiraki M., Parla A., Thermos K., Chaniotakis N. A., Panderi I. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection (HILIC-FL) for the Quantitation of Octreotide in Injection Forms. *Analytica*. 2021;2(4):121–129. DOI: 10.3390/analytica2040012.
23. Kang L., Weng N., Jian W. LC-MS bioanalysis of intact proteins and peptides. *Biomedical Chromatography*. 2020;34(1): e4633. DOI: 10.1002/bmc.4633.
24. Böttger R., Hoffmann R., Knappe D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLOS ONE*. 2017;12(6):e0178943. DOI: 10.1371/journal.pone.0178943.
25. Powell M. F. Chapter 30. Peptide Stability in Drug Development: in vitro Peptide Degradation in Plasma and Serum. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 1993;28:285–294.
26. Zee B. M., Garcia B. A. Discovery of lysine post-translational modifications through mass spectrometric detection. *Essays in Biochemistry*. 2012;52:147–63. DOI: 10.1042/bse0520147.
27. Lin S., Garcia B. A. Examining Histone Posttranslational Modification Patterns by High-Resolution Mass Spectrometry. *Methods in Enzymology*. 2012;512:3–28. DOI: 10.1016/B978-0-12-391940-3.00001-9.
28. Bonaldi T., Imhof A., Regula J. T. A combination of different mass spectroscopic techniques for the analysis of dynamic changes of histone modifications. *Proteomics*. 2004;4(5):1382–1396. DOI: 10.1002/pmic.200300743.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.038, 615.072

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1507

Check for updates

CC BY 4.0

Валидация тест-системы на основе метода иммуноферментного анализа для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях

В. В. Писарев✉, **А. В. Иванов**✉✉

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек». 111024, Россия, г. Москва, ул. 5-я Кабельная, д. 2-Б, стр. 1, офис 3–1

✉ **Контактное лицо:** Писарев Владимир Викторович. **E-mail:** vladimir.pisarev@probiotech.ru
✉✉ **Контактное лицо:** Иванов Андрей Владимирович. **E-mail:** gostyatin@gmail.com

ORCID: В. В. Писарев – https://orcid.org/0000-0003-3212-4369; А. В. Иванов – https://orcid.org/0000-0002-1676-7754.

Статья поступила: 09.06.2023 **Статья принята в печать:** 22.04.2024 **Статья опубликована:** 26.04.2024

Резюме

Введение. Одной из причин развития множества заболеваний, в первую очередь злокачественных, является повышенная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Бевацизумаб является препаратом для нейтрализации биологической активности VEGF и представляет собой рекомбинантные гуманизированные антитела. Его применение снижает васкуляризацию в очагах повышенной экспресии VEGF, что замедляет опухолевый рост, а также способствует восстановлению зрения при ряде офтальмологических заболеваний. Для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях человека представлена тест-система на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

Цель. Целью работы является валидация данной тест-системы.

Материалы и методы. Бланковые сыворотки добровольцев, раствор бевацизумаба, иммуноферментный анализ, твердофазный «сэндвич»-ИФА-набор, микропланшетный фотометр.

Результаты и обсуждение. Определены следующие характеристики тест-системы: нижний предел количественного определения – 2,0 мкг/мл, верхний калибровочный диапазон – до 200 мкг/мл, правильность и прецизионность внутри одной серии и между сериями не превышает 20 %, а общая ошибка метода – 30 %, краткосрочная стабильность для образцов при комнатной температуре – 6 часов, долгосрочная стабильность – 14 дней при –20 °С, возможность трехкратного замораживания/оттаивания образцов, возможность определения образцов с концентрацией выше верхнего калибратора после разбавления в 2 раза.

Заключение. Полученные результаты полностью соответствуют международным критериям приемлемости и позволяют использовать тест-систему ИФА производства ООО «НПЦ Пробиотек» для применения в области клинической лабораторной диагностики.

Ключевые слова: бевацизумаб, ИФА, валидация, лабораторная диагностика

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

Вклад авторов. В. В. Писарев – организационная часть исследования, планирование и проведение экспериментов и общее руководство. А. В. Иванов – анализ данных, обсуждение результатов и написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств ООО «Научно-производственный центр Пробиотек».

Для цитирования: Писарев В. В., Иванов А. В. Валидация тест-системы на основе метода иммуноферментного анализа для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):181–189. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1507

Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay test-system for bevacizumab concentration determing in biological fluids

Vladimir V. Pisarev✉, **Andrei V. Ivanov**✉✉

LLC "Probiotech". office 3–1, building 1, 2-B, 5th Kabelnaya str., Moscow, 111024, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir V. Pisarev. **E-mail:** vladimir.pisarev@probiotech.ru
✉✉ **Corresponding author:** Andrei V. Ivanov. **E-mail:** gostyatin@gmail.com

ORCID: Vladimir V. Pisarev – https://orcid.org/0000-0003-3212-4369; Andrei V. Ivanov – https://orcid.org/0000-0002-1676-7754.

Received: 09.06.2023 **Accepted:** 22.04.2024 **Published:** 26.04.2024

Abstract

Introduction. One of the reasons for the development of many diseases primarily malignant is the increased expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Bevacizumab is a drug that neutralizes the biological activity of VEGF. The molecular structure of bevacizumab is a recombinant humanized antibody. Its use reduces vascularization in the foci of increased VEGF expression which slows down tumor growth and also helps restore vision in a number of ophthalmic diseases. To determine the concentration of bevacizumab in human biological fluids a test system based on Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) is presented.

© Писарев В. В., Иванов А. В., 2024
© Pisarev V. V., Ivanov A. V., 2024

Aim. Aim of this study is the validation of this test system.
Materials and methods. blank sera of volunteers, bevacizumab solution, enzyme-linked immunosorbent assay, solid-phase sandwich ELISA kit, microplate photometer.
Results and discussion. The following characteristics of the test system were determined: the lower limit of quantification is 2.0 mcg/ml, the upper calibration range is up to 200 mcg/ml, the accuracy and precision within one series and between series does not exceed 20 %, and the total error of the method – 30 %, short-term stability for samples at room temperature – 6 hours, long-term stability – 14 days at –20 °C, the ability to freeze/thaw of samples is up to three times, the ability to determine samples with a concentration above the upper calibrator after diluting in 2 times.
Conclusion. The results obtained fully comply with international acceptance criteria and allow the use of the ELISA test system manufactured by LLC "Probiotek" for use in the field of clinical laboratory diagnostics.

Keywords: bevacizumab, ELISA, validation, laboratory diagnostics

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. Vladimir V. Pisarev – organizational part of the study, planning and conducting experiments and general management. Andrei V. Ivanov – data analysis, result discussion and writing the text.

Funding. The work was carried out at the expense of LLC "Probiotek".

For citation: Pisarev V. V., Ivanov A. V. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay test-system for bevacizumab concentration determing in biological fluids. *Drug development & registration*. 2024;13(2):181–189. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1507

ВВЕДЕНИЕ

Для развития процессов злокачественного перерождения клеток и прогресса большей части онкологических заболеваний требуется воздействие сразу нескольких факторов. Одним из наиболее важных факторов риска для роста и метастазирования опухолей является локальное нарушение регуляции ангиогенеза, вызванное чрезмерной активностью фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС, Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). В норме экспрессия VEGF обеспечивает рост сосудов во время эмбрионального развития, во время роста организма и восстановления кровоснабжения тканей при травмах [1]. Первоначальными причинами канцерогенеза, как правило, являются сочетанные наследственные и соматические мутации в генах, регулирующих процессы клеточной пролиферации и дифференцировки. Но возникающая солидная опухоль не может достигать значительных размеров и тем более метастазировать без притока питательных веществ и снабжения кислородом, обеспечиваемых растущей сосудистой сетью. При дальнейшей малигнизации клетки опухоли приобретают способность вызывать рост сосудов, активируя экспрессию ряда факторов роста, в том числе VEGF. Избыточная экспрессия VEGF наблюдается при случаях множественной миеломы [2], раке почки [3], раке груди [4], раке кожи и плоскоклеточной карциноме [5], колоректальном раке [6], аденокарциномах [7]. Также при нарушениях регуляции экспрессии VEGF возможно развитие ряда сосудистых и офтальмологических заболеваний, например неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, неоваскулярной глаукомы и диабетической ретинопатии [8].

VEGF представляет собой целое семейство белков [9]. Наибольшее клиническое значение имеет молекула VEGF-A, влияющая на рост кровеносных сосудов [10]. Именно VEGF-A наиболее изучен; так, выявлено, что имеется четыре изоформы: VEGF121, VEGF145, VEGF165 и VEGF189 [11–13]. Среди других членов семейства VEGF-C и VEGF-D активно участвуют в лимфангиогенезе [14]. Биологическая роль VEGF-B еще до конца не определена. Еще один представитель семейства VEGF, PlGF, обеспечивает плацентарный рост, может образовывать функциональные гетеродимеры с VEGF-A и также играет роль в ангиогенезе [10, 15]. Наконец, VEGF-E кодируется парапоксвирусом Orf и играет важную роль в развитии вирусной инфекции и ассоциированной патологии [10]. Биология VEGF является уникальной иллюстрацией того, как фундаментальные открытия, сделанные в лабораториях, за относительно короткий промежуток времени – менее чем за 15 лет – повлияли на терапевтические разработки и привели к значительным успехам в практической медицине [10]. Таргетная терапия, нацеленная на VEGF и связанные с ним регуляторные пути, широко используется при лечении заболеваний сетчатки глаз и в онкологии. Применение таких препаратов, как бевацизумаб, ранибизумаб, афлиберцепт, пегаптаниб (Bevacizumab, Ranibizumab, Aflibercept, Pegaptanib), способствует восстановлению зрения при ряде неоваскулярных офтальмоло-

гических заболеваний, хотя макромолекулярные свойства этих препаратов, сильная гидрофильность и плохая проницаемость гемато-офтальмического барьера ограничивают их эффективность [16]. Комбинирование ингибиторов VEGF с классическими химиотерапевтическими препаратами и агентами, нацеленными на другие молекулы или пути, участвующие в формировании и разрастании кровеносных сосудов, согласно данным ряда клинических испытаний, увеличивает продолжительность жизни пациентов и повышает эффективность противоопухолевой терапии [17]. Еще в начале 1990-х было продемонстрировано, что возможно подавление роста опухоли *in vivo* с помощью моноклональных антител против VEGF и блокирования VEGF-индуцированного ангиогенеза [18]. В дальнейшем этот подход привел к разработке препарата бевацизумаба.

Бевацизумаб прошел все фазы клинических испытаний в 2003–2005 годах и в 2004 году был одобрен в США для лечения рака и неоваскулярных офтальмологических заболеваний во многом благодаря разработкам Наполеона Феррара в корпорации Genentech (США) [16, 19]. С тех пор география применения препарата расширилась, и он успешно применяется в ряде европейских стран и США [16]. Препарат представляет собой гиперхимерные гуманизированные антитела класса IgG1, селективно связывающие VEGF, что ингибирует его взаимодействие с рецепторами Flt-1 и KDR на поверхности эндотелиальных клеток. Молекула состоит из двух тяжелых и двух легких цепей и имеет молекулярную массу 149 кДа [20]. При клиническом применении бевацизумаба отмечается множество эффектов кросс-взаимодействий как с молекулами-участниками регуляторных путей организма, так и с другими химиопрепаратами при комбинированной терапии. В зависимости от концентраций препарата такие взаимодействия могут как усиливать, так и угнетать фармакологический эффект. Именно поэтому чрезвычайную важность приобретает возможность точной оценки содержания бевацизумаба в биологических жидкостях пациента.

Для обнаружения и определения количества бевацизумаба в организме человека разработаны и применены на практике тест-системы, основанные на методах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ВЭЖХ и масс-спектрометрии LC-MS/MS и Proximity Extension Assay [21]. Данные методы требуют дорогостоящего оборудования и расходных материалов, с которыми может работать только высококвалифицированный персонал. Как правило, это возможно только в крупных исследовательских центрах. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) также применяется для количественной оценки концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях и обладает рядом преимуществ. Основными достоинствами метода ИФА является его высокая чувствительность и селективность в сочетании с относительно невысокой стоимостью, возможностью быстро наладить массовое производство тест-систем, возможностью применения практически в любой клинико-диагностической лаборатории без специальной подготовки персонала и дорогостоящего оборудования. Так, в исследовании [22] продемонстрирована возможность использования метода непрямого ИФА для оценки долгосрочной стабильности препаратов на основе моноклональных анти-VEGF-антител, в том числе и бевацизумаба. Данный метод является чувствительным, точным и селективным, что позволяет ему стать важным инструментом для количественного определения биологической активности таких лекарственных средств. В исследовании [23] продемонстрирована не только возможность использования метода ИФА для оценки концентрации препарата в крови, но и определена зависимость чувствительности метода от содержания свободного, частично конъюгированного с VEGF и полностью связанного бевацизумаба. Выявлено увеличение отношения между концентрациями свободного VEGF и комплексов VEGF-бевацизумаб от 100 до 1000 раз при изменении количества препарата от 12,5 до 125 нг/мл.

В связи с возрастающим опытом клинического применения бевацизумаба и необходимостью определения его концентраций в крови пациентов в рамках рутинной практики клинической лабораторной диагностики стоит задача создания отечественной тест-системы для определения концентрации данного препарата в биологических жидкостях методом ИФА. Данная задача успешно решена в ООО «Пробиотек», в результате разработана тест-система на основе твердофазного «сэндвич»-ИФА. Ранее подобный подход был успешно применен для разработки аналогичных тест-систем для определения трастузумаба [24] и этанерцепта [25].

Целью настоящего исследования является валидация данной тест-системы, демонстрация ее аналитических возможностей и соответствия международным стандартам[1, 2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ИФА

Аналитический метод представляет собой классический твердофазный «сэндвич»-ИФА с мостиковым конъюгированием с использованием антиидиотипических моноклональных антител захвата, кото-

[1] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guideline, Bioanalytical Method Validation M10 (2019). Available at: www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf. Accessed: 09.06.2023.

[2] Guideline on bioanalytical method validation. 21 July 2011. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Accessed: 09.06.2023.

рые специфически распознают гипервариабельные участки области связывания VEGF (complementarity determining regions, CDR) бевацизумаба (рисунок 1). Данные первичные антитела предварительно сорбированы на дно каждой лунки классического 96-луночного полистиролового планшета (ООО «НПЦ Пробиотех», Россия). На первом этапе анализа в лунки добавляется по 100 мкл калибраторов, бланковых образцов, образцов для контроля качества, разбавленных в 1000 раз исследуемых образцов сыворотки. После инкубации при встряхивании со скоростью 170 об/мин на шейкере Multi-3D (АО «Вектор-Бест», Россия) в течение 60 мин при комнатной температуре и трехкратной промывки промывочным раствором 0,025%-м Tween-20 (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия) в 0,01 М PBS бевацизумаб из аналитических образцов остается в связанном с первичными антителами состоянии. Второй этап включает добавление в каждую лунку планшета 100 мкл вторичных моноклональных антител против бевацизумаба (1:50000), не направленных против CDR-области связывания VEGF и меченных пероксидазой хрена (кат. № 77332, Sigma-Aldrich, США), в реакционном буфере 0,01 М ФСБ и 1%-го бычьего сывороточного альбумина (50-109-0661, Proliant Biologicals, LLC, США). После инкубации при встряхивании со скоростью 170 об/мин на шейкере Multi-3D в течение 60 мин при комнатной температуре и трехкратной промывки в течение 30 мин при комнатной температуре промывочным раствором следует добавление 100 мкл раствора 3,3′,5,5′-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубация в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Реакция останавливалась добавлением 100 мкл стоп-раствора, содержащего 1 М серную кислоту (ЗАО «НВО Иммунотех»).

Рисунок 1. Схема метода:

ИФА с первичными антителами на подложке и вторичными антителами, связанными с детектирующим реагентом. Так как молекула-мишень бевацизумаб сама представляет собой антитело, используется антиидиотипический захват

Figure 1. Method scheme:

ELISA with primary antibodies on a plate and secondary antibodies associated with a detection reagent. Since Since the target molecule of bevacizumab is itself an antibody, anti-idiotypic capture is used

Детекция проводится с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм в течение 5 мин после остановки реакции.

Исследования с применением биоматериалов человека проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Образцы крови людей, примененные для приготовления сывороток для образцов контроля качества и бланковых сывороток, были предоставлены ГКУЗ Тверской области «Станция переливания крови» Министерства здравоохранения Тверской области. Все доноры заполнили и подписали информированное согласие на участие в данном исследовательском проекте и на публикацию результатов.

Построение графиков для расчета концентрации бевацизумаба в зависимости от оптической плотности калибраторов и вычисление регрессионной модели выполнялись с помощью пакета анализа OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, США). Статистическая обработка результатов, вычисление правильности и прецизионности выполнялись с применением Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

Использовались формулы:

среднее значение

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i,$$

стандартное отклонение

$$\mathrm{SD} = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2},$$

коэффициент вариации

$$(\text{Прецизионность}) = \frac{\mathrm{SD}}{\bar{x}} \times 100\ \%,$$

% от теоретического

$$(\text{Правильность}) = \frac{\text{Полученное значение} - \text{Номинальное значение}}{\text{Номинальное значение}} \times 100\ \%.$$

$$\text{Общая ошибка} = |\text{прецизионность}| + |\text{правильность}|\ (\%).$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процедура валидации включает шесть основных этапов:

1) выбор калибровочного диапазона;
2) оценка селективности;
3) определение регрессионного уравнения;
4) тест на стабильность;
5) определение прецизионности и правильности между аналитическими сериями и внутри одной аналитической серии;

6) тест на необходимость разбавления и возможность анализа образца с концентрацией выше калибровочного диапазона после разведения.

В качестве стокового раствора для приготовления калибровочных образцов и образцов для контроля качества применялся раствор бевацизумаба 1 мг/мл в бланковой сыворотке. Из него было приготовлено всего 8 калибраторов с концентрацией бевацизумаба 0, 2, 4, 20, 65, 110, 160, 200 мкг/мл и 5 образцов для контроля качества с концентрацией 2, 5,5, 100, 150, 200 мкг/мл.

Калибраторы использовались для построения градуировочного графика в каждом аналитическом цикле, измерения проводились в дублях. Данные концентрации калибраторов и образцов для контроля качества были выбраны исходя из максимальных терапевтических значений бевацизумаба в крови человека, достигаемых при внутривенном введении доз от 1 до 10 мг/кг веса пациента 1 раз в неделю в течение 2–3 недель [26, 27]. В качестве нижнего ненулевого калибратора и нижнего предела количественного определения было выбрано значение концентрации бевацизумаба 2 мкг/мл, так как измеренные значения поддавались определению, были дискретными и воспроизводимыми с прецизионностью 1,6 %, не превышающей 25 %, и правильностью 95,0 %, входящей в диапазон 75–125 %. Верхний предел определен как 200 мкг/мл, так как при дальнейшем возрастании концентрации происходит выход на плато показаний оптической плотности. Дальнейшее увеличение концентрации не приводит к пропорциональному росту оптической плотности, в то время как при измерении концентраций бевацизумаба от 50 до 200 мкг/мл значения оптической плотности находятся в пределах 1,5–3,5 AU, что является оптимальным при использовании нелинейной регрессионной модели [28].

Для определения селективности методики были проведены исследования 10 образцов бланковой сыворотки с концентрацией бевацизумаба 2 мкг/мл, в трех повторах каждый. Образцы сыворотки были различного качества, в том числе гемолизированные и гиперлипидемические. Результаты данной серии экспериментов представлены в таблице 1. Усредненные значения концентраций после пересчета образцов для оценки селективности по калибровочной кривой, за исключением образца № 9 (10 % исследованных), находились в диапазоне 75–125 % от теоретического значения. Данный результат полностью удовлетворяет критериям приемлемости методики по селективности.

Одним из основных параметров тест-системы на основе ИФА является возможность определения концентрации аналитов на основе регрессионной модели, построенной на основе определения оптической плотности калибраторов. При использовании семи ненулевых калибраторов регрессионная модель представляет собой четырехпараметрическую зависимость, описываемую уравнением:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2.$$

где y – оптическая плотность; x – концентрация аналита; A_1, A_2, x_0, p – параметры уравнения.

Таблица 1. Значения измерений теста на селективность образца бевацизумаба с концентрацией 2 мкг/мл в сыворотках различного качества

Table 1. The values of the measurements of the selection of the bevacizumab sample with a concentration of 2 μg/ml in serums of various quality

Образец матрицы Matrix Sample	Концентрация Concentration	% от теоретической % from theoretic	Среднее, % Mean, %
1	1,89	94.5	90,4
	1,76	88,2	
	1,77	88,4	
2	2,06	103,1	97,8
	2,00	100,0	
	1,81	90,4	
3	1,95	97,7	100,7
	1,88	93,8	
	2,21	110,6	
4	2,25	112,7	102,3
	1,79	89,7	
	2,09	104,3	
5	2,51	125,3	122,0
	2,43	121,5	
	2,39	119,3	
6	2,49	124,5	115,4
	2,35	117,7	
	2,08	104,0	
7	2,34	116,9	105,0
	1,75	87,3	
	2,21	110,7	
8	2,01	100,3	98,4
	1,83	91,6	
	2,07	103,4	
9	2,58	128,8	125,4
	2,47	123,4	
	2,48	124,0	
10	2,39	119,4	114,9
	2,28	113,9	
	2,23	111,6	
Соответствует критерию Meets the criterion	9	90,0	

При использовании данного уравнения коэффициент детерминации R_2 для всех шести проведенных постановок превышал 0,99, а рассчитанные обратные значения концентраций калибраторов не отличались от теоретических значений более чем на 4 %, что значительно меньше допустимых 20 %. Параметры регрессионного уравнения для шести постановок приведены в таблице 2, а калибровочный график – на рисунке 2.

Таблица 2. **Параметры регрессионной модели**

Table 2. **Regression model parameters**

№ постановки Run number	Параметры уравнения Equation Parameters				Коэффициент детерминации R_2 R_2 Determination coefficient
	A_1	A_2	x_0	p	
1	0,05054	429 916	1119 262	0,95327	0,99972
2	0,05158	426 948	10594 232	0,97095	0,99991
3	0,05954	429 373	7493 888	104 263	0,99984
4	0,0574	417 897	7232 252	104 623	0,99989
5	0,04718	535 776	22083 661	0,94489	0,99973
6	0,05124	530 012	15557 753	0,92443	0,99961

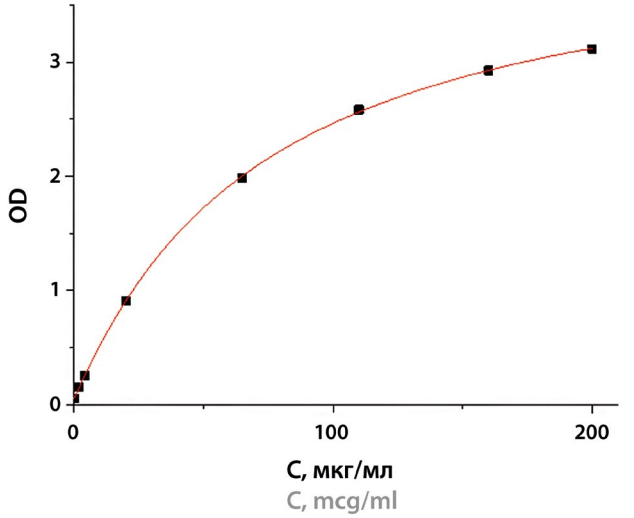


Рисунок 2. **График зависимости оптической плотности от концентрации калибровочных стандартов бевацизумаба.**

По оси абсцисс: C – концентрация бевацизумаба, мкг/мл.
По оси ординат: OD – оптическая плотность, условные единицы

Figure 2. **The dependence of the optical density on the concentration of calibration standards of bevacizumab.**

***X*-axis: C – bevacizumab concentration, mcg/ml.**
***Y*-axis: OD – Optical Density, Arbitrary Units**

Для подтверждения стабильности использования тест-системы при различных условиях хранения бевацизумаба в составе биологической матрицы были проведены серии экспериментов на краткосрочную стабильность, долгосрочную стабильность и множественное замораживание – оттаивание. Краткосрочная стабильность исследовалась после хранения образцов для контроля качества с концентрацией бевацизумаба 5,5 и 150 мкг/мл при комнатной температуре в течение 6 часов. Долгосрочная стабильность исследовалась после заморозки образцов для контроля качества с теми же концентрациями и хранения их при –20 °C в течение 14 суток. Стабильность при множественном замораживании – оттаивании определялась на образцах бевацизумаба тех же концентраций после трех циклов замораживания до –20 °C и последующего полного оттаивания. Результаты данных серий тестов представлены в таблице 3. Во всех случаях отклонения от номинального значения не превышали 16,2 %, что соответствует критериям приемлемости 20 % и подтверждает возможность использования рассматриваемой тест-системы для оценки концентраций бевацизумаба в биологических жидкостях при различных условиях их хранения.

Прецизионность и правильность метода с подсчетом общей ошибки внутри одной аналитической серии оценивались по результатам параллельных измерений пяти образцов контроля качества с концентрацией бевацизумаба 2, 5,5, 100, 150, 200 мкг/мл, каждого в трех повторах, на одном 96-луночном полистироловом планшете. Прецизионность и правильность метода между аналитическими сериями также оценивались по результатам параллельных анализов пяти образцов контроля качества, выполненных в шести аналитических сериях, в трех повторах для каждого исследуемого образца. Усредненные результаты испытаний представлены в таблице 4. Полученные средние концентрации аналитов отличались от номинального значения не более чем на 8,9 %. Внутрисерийная прецизионность (повторяемость) не превышала 13,4 %, а межсерийная (воспроизводимость) – 3,4 %. Общая ошибка не превышала 22,3 %. Данные значения с запасом укладываются в критерии приемлемости валидационных параметров, при которых средние значения измерений концентраций должны находиться в диапазоне ±20 % от номинальных значений, прецизионность – не превышать 20 %, а общая ошибка метода – 30 %.

Оценку необходимого разбавления с целью устранения влияния матрицы проводили с использованием образца контроля качества с концентрацией 2,0 мкг/мл, приготовленного на сыворотке крови человека, с последующим разбавлением в 500 и 1000 раз. Для расчета концентрации данных образцов использовали калибровочную кривую, полученную при анализе семи ненулевых калибровочных стандартов. Результаты представлены в таблице 5. Отклонение среднего значения концентрации образца контроля качества от теоретической величины составило 4,5 % при разбавлении в 500 раз и 13,5 % при разбавлении в 1000 раз, что не превысило допустимые 25 %.

Для проверки возможности применения тест-системы для оценки образцов в диапазоне концентраций, превышающих верхний калибровочный уровень после разбавления, был проведен отдельный тест. Специально подготовленный образец контроля качества с концентрацией 380,00 мкг/мл был разбавлен бланковой сывороткой в два раза и проанализирован в 6 повторах. В результате отклонение среднего значения концентрации образца контроля качества от теоретической величины с учетом разбавления составило 18,6 %, что не превысило допустимые 20 % (таблица 5).

Таблица 3. Данные тестов на краткосрочную стабильность, долгосрочную стабильность и множественное замораживание – оттаивание

Table 3. Data from short-term stability, long-term stability, and multiple freeze-thaw tests

Аналитические характеристики Analytical characteristics	Образцы для контроля качества Quality control samples	
	5,5 мкг/мл 5.5 µg/ml	150 мкг/мл 150 µg/ml
Краткосрочная стабильность при комнатной температуре в течение 6 часов Short term stability at RT for 6 hours		
Серия 1 Series 1	6,22	140,96
Серия 2 Series 2	6,68	147,38
Серия 3 Series 3	6,26	139,42
Среднее значение Mean	6,39	142,59
Стандартное отклонение Standard deviation	0,25	4,22
Коэффициент вариации (прецизионность), % CV, %	3,9	3,0
% от теоретического (правильность) Accuracy	116,2	95,1
Три цикла замораживания – оттаивания при –20 °C Three freeze-thaw cycles at –20 °C		
Серия 1 Series 1	6,35	135,24
Серия 2 Series 2	5,78	132,74
Серия 3 Series 3	5,96	130,06
Среднее значение Mean	6,03	132,68
Стандартное отклонение Standard deviation	0,29	2,59
Коэффициент вариации (прецизионность), % CV, %	4,8	2,0
% от теоретического (правильность) Accuracy	109,6	88,5
Долгосрочная стабильность при –20 °C в течение 14 суток Long-term stability at –20 °C for 14 days		
Серия 1 Series 1	6,18	140,76
Серия 2 Series 2	6,48	145,79
Серия 3 Series 3	6,32	141,35
Среднее значение Mean	6,33	142,63
Стандартное отклонение Standard deviation	0,15	2,75
Коэффициент вариации (прецизионность), % CV, %	2,4	1,9
% от теоретического (правильность) Accuracy	114,5	95,1

Таблица 4. Результаты исследований на прецизионность, правильность и общую ошибку определения концентраций бевацизумаба

Table 4. Results of studies on precision, accuracy and overall error in determining bevacizumab concentrations

Аналитические характеристики Analytical characteristics		Образцы для контроля качества Quality control samples				
		2,0 мкг/мл 2.0 µg/ml	5,5 мкг/мл 5.5 µg/ml	100 мкг/мл 100 µg/ml	150 мкг/мл 150 µg/ml	200 мкг/мл 200 µg/ml
Среднее значение, стандартное отклонение, правильность, прецизионность и общая ошибка Mean, standard deviation, accuracy, precision and total error	Между аналитическими сериями Between analytical series	**Среднее значение** Mean				
		1,92	5,35	95,5	143,3	182,16
		Стандартное отклонение Standard deviation				
		0,14	0,33	5,03	12,47	24,42
		Прецизионность (коэффициент вариации, %) CV, %				
		7,3	6,2	5,3	8,7	13,4
		Правильность (% среднего значения от теоретического) Accuracy				
		96,0	97,3	95,5	95,5	91,1
		Общая ошибка Total error				
		11,3	8,9	9,8	13,2	22,3
Среднее значение, стандартное отклонение, правильность, прецизионность и общая ошибка Mean, standard deviation, accuracy, precision and total error	Внутри одной аналитической серии Within one analytical series	**Среднее значение** Mean				
		1,9	5,23	95,87	139,14	179,01
		Стандартное отклонение Standard deviation				
		0,03	0,18	0,94	3,6	2,7
		Прецизионность (коэффициент вариации, %) CV, %				
		1,6	3,4	1,0	2,6	1,5
		Правильность (% среднего значения от теоретического) Accuracy				
		95,0	95,1	95,9	92,8	89,5
		Общая ошибка Total Error				
		6,58	8,35	5,11	9,83	12,0

Таблица 5. Результаты исследований на линейность разбавления и возможности разведения образца с концентрацией выше калибровочного диапазона

Table 5. Results of studies on dilution linearity and the possibility of diluting a sample with a concentration above the calibration range

Тест / Test	Необходимое разбавление / Dilution required		Оценка образца, превышающего верхний калибратор / Sample exceeding the upper calibrator evaluation
Концентрация образца для контроля качества / Quality control sample concentration	2,00 мкг/мл / 2.00 µg/ml	2,00 мкг/мл / 2.00 µg/ml	380 мкг/мл / 380 µg/ml
Разбавление / Dilution	в 500 раз / 500 times	в 1000 раз / 1000 times	в 2 раза / 2 times
Число повторов / Run number	3	3	6
Среднее значение / Mean	2,09	1,73	154,6
Стандартное отклонение / Standard deviation	0,09	0,09	6,86
Коэффициент вариации (прецизионность), % / CV, %	4,3	5,2	4,4
% от теоретического (правильность) / Accuracy	104,5	86,5	81,4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований выявлено, что тест-система для определения концентрации бевацизумаба в биологических жидкостях на основе твердофазного ИФА, разработанная в ООО «НПЦ Пробиотек», соответствует отечественным и международным критериям приемлемости и параметрам валидации[1]. Тест-система показала себя высокоэффективной и удобной в использовании, продемонстрировала высокую чувствительность и селективность. Прецизионность и точность результатов анализа с учетом критериев приемлемости достигается во всем исследованном интервале концентраций аналита – от 2,00 до 200,00 мкг/мл. Подтверждена возможность использования тест-системы для анализа гемолизных сывороток и образцов, хранящихся при комнатной температуре и после заморозки. Проведенная валидация демонстрирует возможность широкого использования тест-системы для оценки уровня бевацизумаба в крови пациентов в практике клинической лабораторной диагностики.

[1] ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» (п. 7.2. Выбор, верификация и валидация методов). Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200166732. Ссылка активна на 09.06.2023.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Apte R. S., Chen D. S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248–1264. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
2. Vincent L., Jin D. K., Karajannis M. A., Shido K., Hooper A. T., Rashbaum W. K., Pytowski B., Wu Y., Hicklin D. J., Zhu Z., Bohlen P., Niesvizky R., Rafii S. Fetal stromal-dependent paracrine and intracrine vascular endothelial growth factor-A/vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes proliferation and motility of human primary myeloma cells. *Cancer Research*. 2005;65(8):3185–3192. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3598.
3. Cao Y., Guangqi E., Wang E., Pal K., Dutta S. K., Bar-Sagi D., Mukhopadhyay D. VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Research*. 2012;72(16):3912–3918. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4058.
4. Lee T.-H., Seng S., Sekine M., Hinton C., Fu Y., Avraham H. K., Avraham S. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Medicine*. 2007;4(6):e186. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040186.
5. Lichtenberger B. M., Tan P. K., Niederleithner H., Ferrara N., Petzelbauer P., Sibilia M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell*. 2010;140(2):268–279. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.046.
6. Bhattacharya R., Ye X.-C., Wang R., Ling X., McManus M., Fan F., Boulbes D., Ellis L. M. Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Research*. 2016;76(10):3014–3024. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1605.
7. Chen T. T., Filvaroff E., Peng J., Marsters S., Jubb A., Koeppen H., Merchant M., Ashkenazi A. MET Suppresses Epithelial VEGFR2 via Intracrine VEGF-induced Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. *EBioMedicine*. 2015;2(5):406–420. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.03.021.
8. Fogli S., Del Re M., Rofi E., Posarelli C., Figus M., Danesi R. Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs. *Eye (Lond)*. 2018;32(6):1010–1020. DOI: 10.1038/s41433-018-0021-7.
9. Wiszniak S., Schwarz Q. Exploring the Intracrine Functions of VEGF-A. *Biomolecules*. 2021;11(1):128. DOI: 10.3390/biom11010128.
10. Melincovici C. S., Boşca A. B., Şuşman S., Mărginean M., Mihu C., Istrate M., Moldovan I. M., Roman A. L., Mihu C. M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2018;59(2):455–467.
11. Kazemi-Lomedasht F., Behdani M., Pooshang Bagheri K., Habibi Anbouhi M., Abolhassani M., Khanahmad H., Shahbazzadeh D., Mirzahoseini H. Expression and purification of functional human vascular endothelial growth factor-A 121; the most important angiogenesis factor. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2014;4(4):323–328. DOI: 10.5681/apb.2014.047.
12. Azimi-Nezhad M. Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathology. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;2(2):59–69.
13. Liu H., Tang L. Mechano-regulation of alternative splicing. *Current Genomics*. 2013;14(1):49–55. DOI: 10.2174/138920213804999156.
14. Kinashi H., Ito Y., Sun T., Katsuno T., Takei Y. Roles of the TGF-β–VEGF-C Pathway in Fibrosis-Related Lymphangiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(9):2487. DOI: 10.3390/ijms19092487.

15. Lecarpentier E., Tsatsaris V. Angiogenic balance (sFlt-1/PlGF) and preeclampsia. *Annales d'Endocrinologie*. 2016;77(2):97–100. DOI: 10.1016/j.ando.2016.04.007.
16. Cao Y., Langer R., Ferrara N. Targeting angiogenesis in oncology, ophthalmology and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2023;22(6):476–495. DOI: 10.1038/s41573-023-00671-z.
17. Halmos B., Burke T., Kalyvas C., Vandormael K., Frederickson A., Piperdi B. Pembrolizumab+chemotherapy versus atezolizumab+chemotherapy+/-bevacizumab for the first-line treatment of non-squamous NSCLC: A matching-adjusted indirect comparison. *Lung Cancer*. 2021;155:175–182. DOI: 10.1016/j.lungcan.2021.03.020.
18. Kim K. J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H. S., Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature*. 1993;362(6423):841–844. DOI: 10.1038/362841a0.
19. Ferrara N., Adamis A. P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15(6):385–403. DOI: 10.1038/nrd.2015.17.
20. Ellis L. M., Bevacizumab. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;Suppl:S8–S9. DOI: 10.1038/nrd1727.
21. Di Filippo L. D., Dos Santos K. C., Hanck-Silva G., de Lima F. T., Daflon Gremião M. P., Chorilli M. A Critical Review of Biological Properties, Delivery Systems and Analytical/Bioanalytical Methods for Determination of Bevacizumab. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2021;51(5):445–453. DOI: 10.1080/10408347.2020.1743641.
22. Surez I., Salmern-Garca A., Cabeza J., Capitn-Vallvey L. F., Navas N. Development and Use of Specific ELISA Methods for Quantifying the Biological Activity of Bevacizumab, Cetuximab and Trastuzumab in Stability Studies. *Journal of Chromatography B*. 2016;1032:155–142. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.05.045.
23. Kamerud J., Abrams M., Klover J. An ELISA for the Quantitative Determination of Free and Partially Bound Bevacizumab in Human Serum. *Eurofins Bioanalytical Service*. T2047. Available at: https://www.eurofins.com/media/12142677/eurofins-bioanalytical-services_2016-aaps-nbc_beva-poster-10may16_web.pdf. Accessed: 09.06.2023.
24. Pisarev V. V., Ivanov A. V. Validation of ELISA Test-system for Trastuzumab (Herceptin, Hertikad) quantitative determination in biological fluids. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2023;(1):58–64. (In Russ.) DOI: 10.37489/2587-7836-2023-1-58-64.
25. Pisarev V. V., Ivanov A. V. Validation of a test system based on solid-phase ELISA to assess the pharmacokinetics of etanercept. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. Available at: https://www.probiotech.ru/images/articles/ELISA%20etanercept%20Probiotech%202023.pdf. Accessed: 09.06.2023.
26. Han K., Peyret T., Quartino A., Gosselin N. H., Gururangan S., Casanova M., Merks J. H. M., Massimino M., Grill J., Daw N. C., Navid F., Jin J., Allison D. E. Bevacizumab dosing strategy in paediatric cancer patients based on population pharmacokinetic analysis with external validation. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2016;81(1):148–160. DOI: 10.1111/bcp.12778.
27. Han K., Peyret T., Marchand M., Quartino A., Gosselin N. H., Girish S., Allison D. E., Jin J. Population pharmacokinetics of bevacizumab in cancer patients with external validation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2016;78(2):341–351. DOI: 10.1007/s00280-016-3079-6.
28. Findlay J. W. A., Dillard R. F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *The AAPS Journal*. 2007;9(2):29. DOI: 10.1208/aapsj0902029.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.21

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1804

Check for updates

CC BY 4.0

Фармакологический скрининг нового производного вальпроевой кислоты с использованием метода фармакоэнцефалографии у крыс

Ю. И. Сысоев[1, 2]✉, Д. Д. Шиц[3], М. М. Пучик[3], Т. А. Гутий[1], Е. В. Федорова[1], В. А. Приходько[1, 4], И. А. Титович[1], А. С. Мелехова[5], А. Я. Беспалов[5], И. С. Князева[4], Е. Б. Шустов[5], С. В. Оковитый[1, 4]

[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 бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук» (ИФ им. И. П. Павлова). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

[3] Институт трансляционной биомедицины. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (ИТБМ. ФГБОУ ВО СПбГУ). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

[4] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой Российской академии наук» (ИМЧ РАН). 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, лит. А

[5] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ НКЦТ им. С. Н. Голикова ФМБА России). 192019, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

✉ **Контактное лицо:** Сысоев Юрий Игоревич. **E-mail:** susoyev92@mail.ru

ORCID: Ю. И. Сысоев – http://orcid.org/0000-0003-4199-5318; Д. Д. Шиц – https://orcid.org/0009-0007-3804-0197;
М. М. Пучик – http://orcid.org/0000-0003-1281-4354; Т. А. Гутий – http://orcid.org/0009-0002-3843-0770;
Е. В. Федорова – http://orcid.org/0009-0002-7781-3563; В. А. Приходько – http://orcid.org/0000-0002-4690-1811;
И. А. Титович – https://orcid.org/0000-0002-1343-4663; А. С. Мелехова – http://orcid.org/0000-0003-1883-3815;
А. Я. Беспалов – http://orcid.org/0000-0002-8118-8306; И. С. Князева – http://orcid.org/0000-0003-0026-6047;
Е. Б. Шустов – https://orcid.org/0000-0001-5895-688X; С. В. Оковитый – http://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Статья поступила: 18.03.2024 **Статья принята в печать:** 27.04.2024 **Статья опубликована:** 27.04.2024

Резюме

Введение. Наивный байесовский классификатор в комбинации с методом главных компонент позволяет эффективно различать эффекты антипсихотических средств, а также оценивать их дозозависимость по влиянию на параметры электрокортикограмм (ЭКоГ) у крыс. Для дальнейшего развития предложенного метода необходима его валидация в качестве инструмента скрининга новых малоизученных молекул. Перспективной нейрофармакологической группой являются производные вальпроевой кислоты, оказывающие не только противоэпилептический, но также и нормотимический, противомигренозный, нейропротекторный и обезболивающий эффекты.

Цель. Целью настоящей работы стало проведение фармакологического скрининга аминоэфира вальпроевой кислоты (АВК), проявляющего свойства антидота при острых отравлениях антихолинэстеразными средствами.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах с хронически имплантированными электрокортикографическими электродами. АВК вводили в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг. В качестве обучающей выборки, относительно которой классифицировали эффекты каждой дозы изучаемого соединения, использовали матрицы эффектов 7 препаратов: вальпроата натрия, блокатора дофаминовых D_2-рецепторов галоперидола, М-холиноблокатора тропикамида, H_1-гистаминоблокатора хлоропирамина, ингибитора ацетилхолинэстеразы галантамина, а также седативного средства дексмедетомидина и анксиолитика феназепама.

Результаты и обсуждение. Установлено, что АВК в дозе 0,5 мг/кг проявляет ЭКоГ-феномены, схожие с эффектами вальпроата натрия, а 10-кратное увеличение дозы приводит к преобладанию атропиноподобного действия. При введении в дозе 30 мг/кг соединение демонстрирует дексмедетомидиноподобное действие. Способность АВК блокировать центральные М-холинорецепторы подтверждает ареколиновый тест, в котором вещество в дозе 88 мг/кг полностью отменяло наступление тремора у мышей. Дексмедетомидиноподобное действие блокировало введение атипамезола в эквимолярных количествах, что может говорить о способности АВК в высоких дозах активировать центральные α_2-адренорецепторы. Результаты молекулярного докинга позволяют предположить, что этот эффект связан именно с исходной молекулой аминоэфира, а не с ее вероятными активными метаболитами.

Заключение. Полученные данные подтверждают эффективность наивного байесовского классификатора как инструмента прогнозирования фармакологической активности соединений по их влиянию на параметры ЭКоГ у крыс. Определение новых фармакологических эффектов малоизученных соединений может расширить потенциальный спектр применения в клинической практике, а также выявить возможные нежелательные лекарственные реакции их будущих препаратов.

Ключевые слова: аминоэфир вальпроевой кислоты, фармакоэнцефалография, электрокортикография, метод главных компонент, наивный байесовский классификатор, крысы

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

Вклад авторов. Ю. И. Сысоев, С. В. Оковитый – идея и планирование эксперимента. А. Я. Беспалов – синтез аминоэфира вальпроевой кислоты. Ю. И. Сысоев, Д. Д. Шиц, М. М. Пучик, Т. А. Гутий, Е. В. Федорова, И. А. Титович – проведение экспериментов и обработка данных. Ю. И. Сысоев, В. А. Приходько, Т. А. Гутий – подготовка иллюстраций. Ю. И. Сысоев, Е. В. Федорова, А. С. Мелехова, А. Я. Беспалов, И. А. Титович, В. А. Приходько, И. С. Князева, Е. Б. Шустов, С. В. Оковитый – подготовка и редактура рукописи.

© Сысоев Ю. И., Шиц Д. Д., Пучик М. М., Гутий Т. А., Федорова Е. В., Приходько В. А., Титович И. А., Мелехова А. С., Беспалов А. Я., Князева И. С., Шустов Е. Б., Оковитый С. В., 2024

© Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Gutiy T. A., Fedorova E. V., Prikhodko V. A., Titovich I. A., Melekhova A. S., Bespalov A. Ya., Knyazeva I. S., Shustov E. B., Okovityi S. V., 2024

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-75-01051 (создание библиотеки записей, валидация метода).

Для цитирования: Сысоев Ю. И., Шиц Д. Д., Пучик М. М., Гутий Т. А., Федорова Е. В., Приходько В. А., Титович И. А., Мелехова А. С., Беспалов А. Я., Князева И. С., Шустов Е. Б., Оковитый С. В. Фармакологический скрининг нового производного вальпроевой кислоты с использованием метода фармакоэнцефалографии у крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):190–206. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1804

Pharmacological screening of a new valproic acid derivative using the pharmacoencephalography method in rats

Yuriy I. Sysoev[1, 2]✉, Darya D. Shits[3], Maria M. Puchik[3], Timur A. Gutiy[1], Elizaveta V. Fedorova[1], Veronika A. Prikhodko[1, 4], Irina A. Titovich[1], Aleksandra S. Melekhova[5], Aleksandr Ya. Bespalov[5], Irina S. Knyazeva[4], Evgeniy B. Shustov[5], Sergey V. Okovityi[1, 4]

[1] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[2] Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. 6, naberezhnaya Makarova, Saint-Petersburg, 199034, Russia
[3] Institute of Translational Biomedicine. Saint Petersburg State University. 7–9, Universitetskaya naberezhnaya, Saint-Petersburg, 199034, Russia
[4] N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain, RAS. 12A, Academician Pavlova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia
[5] Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the FMBA. 1, Bekhtereva str., Saint-Petersburg, 192019, Russia

✉ **Corresponding author:** Yuriy I. Sysoev. **E-mail:** susoyev92@mail.ru

ORCID: Yuriy I. Sysoev – http://orcid.org/0000-0003-4199-5318; Darya D. Shits – https://orcid.org/0009-0007-3804-0197;
Maria M. Puchik – http://orcid.org/0000-0003-1281-4354; Timur A. Gutiy – http://orcid.org/0009-0002-3843-0770;
Elizaveta V. Fedorova – http://orcid.org/0009-0002-7781-3563; Veronika A. Prikhodko – http://orcid.org/0000-0002-4690-1811;
Irina A. Titovich – https://orcid.org/0000-0002-1343-4663; Aleksandra S. Melekhova – http://orcid.org/0000-0003-1883-3815;
Aleksandr Ya. Bespalov – http://orcid.org/0000-0002-8118-8306; Irina S. Knyazeva – http://orcid.org/0000-0003-0026-6047;
Evgeniy B. Shustov – https://orcid.org/0000-0001-5895-688X; Sergey V. Okovityi – http://orcid.org/0000-0003-4294-5531.

Received: 18.03.2024 **Accepted:** 27.04.2024 **Published:** 27.04.2024

Abstract

Introduction. The naïve Bayes classifier combined with principal component analysis allows to distinguish the effects of antipsychotic agents effectively as well as evaluate their dose-dependency based on their impact on electroencephalogram parameters in rats. Further development of this method requires its validation as an instrument for the screening of new understudied molecules. Valproic acid derivatives appear to be a promising neuropharmacological group as they exhibit not only antiepileptic activity but also mood-stabilizing, antimigraine, neuroprotective and analgesic effects.

Aim. This work was carried out to perform the pharmacological screening of a valproic acid aminoester (AVA) that exhibits antidote properties in case of poisoning with anticholinesterase agents.

Materials and methods. The experiments were conducted in white outbred rats with chronically implanted electrocorticographic electrodes. AVA was administered at doses of 0,5, 5 and 30 mg/kg. The training set, used as a reference to determine the pharmacological effects of each dose of the investigated substance, included matrixes of effects of 7 drugs: the antiepileptic agent sodium valproate, the D_2-dopamine receptor blocker haloperidol, the M-cholinergic receptor blocker tropicamide, the H_1-histamine receptor blocker chloropyramine, the acetylcholinesterase inhibitor galantamine, the sedative dexmedetomidine, and the anxiolytic phenazepam.

Results and discussion. AVA at the dose of 0,5 mg/kg showed effects similar to those of sodium valproate, while a tenfold dose increase led to the predominance of an atropine-like effect. When administered at the dose of 30 mg/kg, the compound exhibited dexmedetomidine-like action. The central M-anticholinergic effect of AVA was confirmed by an arecoline test in mice, in which the substance at a dose of 88 mg/kg completely abolished the onset of tremor. Dexmedetomidine-like action was cancelled by the administration of atipamezole in equimolar quantities, which may indicate the potential capability of AVA to activate α_2-adrenergic receptors at a high dose. The results of molecular docking suggest that this effect is related specifically to the original aminoester molecule and not to its presumable active metabolites.

Conclusion. The obtained results confirm the effectiveness of the naïve Bayes classifier as an instrument for the prediction of the pharmacological activity of compounds based on their impact on electroencephalogram parameters in rats. Identification of new pharmacological effects of understudied compounds may widen the potential range of their clinical application as well as reveal probable adverse effects.

Keywords: valproic acid aminoester, pharmacoencephalography, electrocortigography, principal component analysis, naïve Bayes classifier, rats

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

Contribution of the authors. Yuriy I. Sysoev, Sergey V. Okovityi – experimental design and planning. Aleksandr Ya. Bespalov – valproic acid aminoester synthesis. Yuriy I. Sysoev, Darya D. Shits, Maria M. Puchik, Timur A. Gutiy, Elizaveta V. Fedorova, Irina A. Titovich – experiment conduction and data analysis. Yuriy I. Sysoev, Veronika A. Prikhodko, Timur A. Gutij – visualization. Yuriy I. Sysoev, Elizaveta V. Fedorova, Veronika A. Prikhodko, Irina A. Titovich, Aleksandra S. Melekhova, Aleksandr Ya. Bespalov, Irina S. Knyazeva, Evgeniy B. Shustov, Sergey V. Okovityi – manuscript writing and review.

Funding. The work was carried out with the support of the Russian Science Foundation grant 23-75-01051 (electrocorticogram library creation, method validation).

For citation: Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Gutiy T. A., Fedorova E. V., Prikhodko V. A., Titovich I. A., Melekhova A. S., Bespalov A. Ya., Knyazeva I. S., Shustov E. B., Okovityi S. V. Pharmacological screening of a new valproic acid derivative using the pharmacoencephalography method in rats. *Drug development & registration*. 2024;13(2):190–206. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1804

ВВЕДЕНИЕ

Фармакоэнцефалография (фармако-ЭЭГ) является чувствительным инструментом скрининга и классификации эффектов психоактивных молекул [1–3]. Несмотря на то, что в экспериментах на животных моделях данный метод предполагает регистрацию полевых потенциалов с имплантированных электродов, записываемый сигнал во многом аналогичен таковому при записи с поверхности головы. С развитием методов машинного обучения возникают новые возможности использования данных фармако-ЭЭГ для решения задач прогнозирования. В ранее опубликованной работе было показано, что наивный байесовский классификатор (НБК) в комбинации с методом главных компонент (МГК) позволяет дифференцировать действие антипсихотических средств от седативного, а также сравнивать эффекты препаратов данной группы между собой по их влиянию на параметры электрокортикограмм (ЭкоГ) у крыс [4]. Позже предложенный подход был эффективно использован для выявления дозозависимости эффектов хлорпромазина и прометазина, двух препаратов с выраженным дофамино- и холиноблокирующим действием [5].

Для дальнейшего развития предлагаемого метода необходима оценка его эффективности как инструмента фармакологического скрининга новых малоизученных соединений. В последние годы большой интерес фармакологов вызывают алифатические амиды, циклические аналоги и другие производные вальпроевой кислоты [6]. Вальпроевая кислота имеет множество молекулярных мишеней действия [7], что позволяет использовать ее не только как противоэпилептический препарат, но и как потенциальное средство лечения мигрени [8], биполярного расстройства [9], болезни Альцгеймера [10], болезни Паркинсона [11] и нейропатической боли [12]. Ее химическая модификация позволяет снизить риск возникновения нежелательных лекарственных реакций, а также расширить спектр фармакологического действия [6].

В лаборатории синтеза лекарственных препаратов ФГБУ НКТЦ им. С.Н. Голикова ФМБА России был синтезирован аминоэфир вальпроевой кислоты (АВК, гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата), проявляющий свойства антидота при острых отравлениях антихолинэстеразными средствами (АХЭС) [13]. Молекула представляет собой сложный эфир вальпроевой кислоты с N-метилпиперидин-4-олом. Последний способен взаимодействовать с анионным центром М-холинорецепторов в ЦНС, тем самым блокируя их от перевозбуждения избытком ацетилхолина в результате угнетения ацетилхолинэстеразы АХЭС. Образующаяся при гидролизе сложноэфирной связи вальпроевая кислота, вероятно, определяет противосудорожный эффект АВК [14, 15]. Сочетание в одной молекуле двух перечисленных фармакофорных фрагментов обеспечивает комплексный характер ее фармакологической активности и позволяет достигать высокой эффективности как антидота при острых отравлениях антихолинэстеразными токсикантами в дозе 43 мг/кг при умеренной собственной токсичности (LD_{50} у белых беспородных крыс при внутрибрюшинном введении составляет 170 ± 1,2 мг/кг) [13].

Несмотря на то, что для соединения были показаны холинолитическая и противосудорожная активность, дозозависимость этих эффектов, а также влияние на работу других нейротрансмиттерных систем головного мозга у крыс неизвестны. В связи с этим **целью настоящей работы** был фармакологический скрининг разных доз АВК с использованием метода фармако-ЭЭГ у крыс. В качестве математического алгоритма классификации эффектов изучаемой молекулы был использован НБК. Обучающей выборкой служили эффекты различных доз вальпроевой кислоты, а также препаратов с М-холиноблокирущим, дофамино- и гистаминолитическим, антихолинэстеразным, анксиолитическим, седативным и снотворным действием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты с использованием лабораторных животных были выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европы от 22 сентября 2010 г., принципами Базельской декларации и рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 г. № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Протокол эксперимента был утвержден биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (протокол-заявка R-PEEG3-SA-2022 от 12.09.2022). Были предприняты все меры для уменьшения числа используемых животных и минимизации их страданий.

Лабораторные животные

Исследование фармако-ЭЭГ было выполнено на 66 крысах-самцах линии Wistar в возрасте 3 месяцев и массой 250–300 г, ареколиновый тест проводили на 14 белых беспородных мышах-самцах возрастом 3 месяца и массой 18–20 г. Животные были получены из ФГУП НИЦ «Курчатовский институт» – питомник «Рапполово» (Россия). Крыс содержали по 5 особей в клетке, мышей – по 7 особей при температуре в помещении 20–22 °C и световом режиме «12 ч свет 750 лк / 12 ч темнота». Все животные получали стандартный пищевой рацион (сухой полнорационный гранулированный экструдированный комбикорм, рецепт ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Россия) и имели свободный доступ к пище и воде. Перед началом экспериментов мыши и крысы прошли карантин в течение 14 суток.

Изготовление и имплантация ЭКоГ-электродов

Этапы изготовления нихромовых кортикографических электродов, протокол их имплантации, а также процедуры послеоперационного ухода за животными были подробно описаны в ранее опубликованной работе [16]. Для наркотизации животных использовали тилетамин и золазепам («Золетил 50», 10 мг/кг, внутримышечно, Virbac, Франция). Электроды FP1 и FP2 располагали в области первичной двигательной коры (AP = 0.0, ML = 2.5, DV = 1.0), C3 и C4 – первичной соматосенсорной коры над гиппокампом (AP = –4.0, ML = 2.5, DV = 1.0), O1 и O2 – вторичной зрительной коры (AP = –7.0, ML = 2.5, DV = 1.0). Референтный электрод имплантировали в носовую кость, заземляющий – под кожу в области шеи.

Процедуры послеоперационного ухода

Прооперированных крыс содержали в индивидуальных клетках с доступом к воде и корму *ad libitum* в течение всего периода исследования. Состояние животных оценивали сразу после выхода из наркоза и далее ежедневно утром и вечером; по необходимости обрабатывали швы 5%-м спиртовым раствором йода. Для профилактики возникновения инфекции сразу после операции животным вводили «Бициллин-3» (5000 ЕД/кг, подкожно, ОАО «Синтез», Россия), для снятия послеоперационной боли – кетопрофен (2,5 мг/кг, подкожно 1 раз в день в течение 3 дней, ООО «Велфарм», Россия). Во избежание обезвоживания крысам вводили подкожно 0,9%-й раствор натрия хлорида (5 мл 1 раз в день, ООО «Гротекс», Россия) в течение первых 3 дней после операции.

Условия регистрации ЭКоГ

Запись ЭКоГ у животных делали не ранее 8-го дня после имплантации с помощью 8-канального энцефалографа «Нейрон-Спектр-1» (ООО «Нейрософт», Россия) с полосой пропускания 0,5–35 Гц и частотой квантования 500 Гц. Регистрацию сигнала проводили одновременно с видеосъемкой поведения в условиях домашней клетки при искусственном освещении. Длительность записи составляла 1 час и включала в себя 30 минут фоновой активности (до введения препарата или физиологического раствора) и 30 минут после инъекции. Для дальнейшего анализа брали два участка записи по 60 секунд: непосредственно перед введением и спустя 20 минут после. На основании результатов предыдущих работ [4, 5] и собственного опыта использования поведенческих тестов большинство лекарственных средств, оказывающих влияние на ЦНС при внутрибрюшинном введении, успевают реализовать выраженный эффект в течение 20 минут. Исключение составляют препараты с субстратным механизмом действия (например, ноотропы) или пролекарства, но таковые в настоящей работе не использовались. Выбранные для анализа фрагменты содержали запись ЭКоГ в спокойном бодрствующем состоянии, так как двигательная активность (локомоция, стойки, груминг или скрэтчинг) могут в значительной мере затруднять выявление и различие эффектов препаратов на биоэлектрическую активность головного мозга у крыс [17]. Рассматриваемый в этой работе и описанный в предыдущих статьях [4, 5] подход к классификации и прогнозированию не ограничивает продолжительность отбираемых участков кортикограмм. Однако ввиду высокой фоновой активности некоторых крыс и, следовательно, необходимости очистки сигнала 60-секундная длительность была выбрана как оптимальная.

Вводимые препараты

Все используемые препараты вводили внутрибрюшинно, при необходимости предварительно растворив в физиологическом растворе до нужной концентрации. АВК вводили в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг исходя из ранее опубликованных работ [13, 15], а также имеющихся записей разных доз тропикамида [5]. Аналогичным образом были выбраны дозы вальпроата натрия, однако, учитывая, что в настоящем исследовании доза 0,5 мг/кг не оказала значимого эффекта на параметры ЭКоГ у крыс, максимальную дозу увеличили до 100 мг/кг. В обучающую выборку, относительно которой выявляли фармакологические эффекты АВК, были включены вальпроат натрия (VPA), а также использованные в предыдущих работах [4, 5] тропикамид (TRO), галоперидол (HAL), хлоропирамин (CPM), галантамин (GAL), дексмедетомидин (DEX) и феназепам (PHE) (таблица 1). В качестве контроля вводили физиологический раствор (ООО «Гротекс», Россия) в дозе 0,5 мл. Для оценки роли α_2-адренорецепторов в развитии фармакологического эффекта максимальной дозы АВК были собраны записи ($n = 5$), в которых крысам через 10 мин после введения АВК в дозе 30 мг/кг вводили антагонист α_2-адренорецепторов атипамезол (ООО «Апиценна», Россия) в эквимолярном количестве (20 мг/кг).

Для каждого препарата было сделано по 10 записей у разных животных. Например, АВК в дозе 30 мг/кг вводили крысам: #34, #38, #39, #41, #44, #47, #48, #56, #59, #60. Введение нового препарата осуществляли не ранее чем через 2–3 дня после предыдущей записи для исключения взаимодействия и остаточных эффектов. Число тестирований (обычно не больше 5–6) той или иной крысы определялось сохранностью хэдплага (коннектора с электродами), а также общим состоянием животного. В случае признаков инфекционного воспаления (гноя вокруг хэдплага, появления порфирина в области носа или глаз и др.) вводили повторно «Бициллин-3» (5000 ЕД/кг, подкожно, ОАО «Синтез», Россия) и следующее тестирование проводили не ранее чем через неделю. Если состояние не улучшалось, то животное

Таблица 1. Препараты и их дозы, используемые в качестве обучающей выборки для классификации эффектов аминоэфира вальпроевой кислоты. ГАМК – γ-аминофенилмасляная кислота, АХЭ – ацетилхолинэстераза; М-ХР – М-холинорецепторы; α_2-АР – α_2-адренорецепторы. VPA – вальпроат натрия; TRO – тропикамид; HAL – галоперидол; CPM – хлоропирамин; GAL – галантамин; DEX – дексмедетомидин; PHE – феназепам

Table 1. Agents used as the training set to classify the effects of the valproic acid aminoester and their doses. GABA – γ-aminophenylbutyric acid, AChE – acetylcholinesterase; M-ChR – M-cholinergic receptors; α_2-AR – α_2-adrenergic receptors. VPA – sodium valproate; TRO – tropicamide; HAL – haloperidol; CPM – chloropyramine; GAL – galantamine; DEX – dexmedetomidine; PHE – phenazepam

Препарат Agent	Производитель Manufacturer	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Мишень* Target*	Действие у крыс Effects in rats
VPA	G. L. Pharma GmbH (Австрия) G. L. Pharma GmbH (Austria)	5.0 30.0 100.0	Na^+-каналы, Ca^{2+}-каналы, $ГАМК_A$-рецепторы (?) Na^+ channels, Ca^{2+} channels, $GABA_A$ receptors (?)	Противосудорожное [18] Anticonvulsant [18]
TRO	Tocris Bioscience (Великобритания) Tocris Bioscience (Great Britain)	0,5 5.0 30.0	М-ХР M-ChR	Атропиноподобное [19] Atropine-like [19]
HAL	ООО «Велфарм» (Россия) LLC "Velpharm" (Russia)	0.3 2.0	D_2-рецепторы D_2 receptors	Антипсихотическое [20] Antipsychotic [20] Каталептогенное [21] Cataleptogenic [21]
CPM	EGIS Pharmaceuticals PLC (Венгрия) EGIS Pharmaceuticals PLC (Hungary)	20.0	H_1-рецепторы H_1 receptors	Седативное (?) Sedative (?)
GAL	Sopharma AD (Болгария) Sopharma AD (Bulgaria)	1.0	АХЭ AChE	↓ АХЭ в головном мозге [22] ↓ AChE in the brain [22]
DEX	Orion Corporation (Финляндия) Orion Corporation (Finland)	0.005 0.1	α_2-АР α_2-AR	Умеренное седативное [23] Moderate sedative [23] Сильное седативное [23] Strong sedative [23]
PHE	АО «Новосибхимфарм» (Россия) JSC "Novosibchimpharm" (Russia)	1.0	$ГАМК_A$-рецепторы $GABA_A$ receptors	Седативное/снотворное [24] Sedative/hypnotic [24]

Примечание. * Преимущественные молекулярные мишени действия.

Note. * Preferential molecular targets of action.

выводили из эксперимента. Еще одним критерием исключения было снижение качества фонового ЭКоГ-сигнала, что обычно происходит при длительном (более месяца) использовании животного. Наиболее часто ухудшение сигнала проявляется в виде выраженного снижения амплитуды во всех отведениях либо появления вспышек эпиактивности (спайков и острых волн на ЭКоГ). Всего в общий анализ вошли данные, полученные на 66 крысах.

Анализ ЭКоГ-сигнала, уменьшение размерности и прогнозирование

Анализ полученных записей осуществляли с помощью программы «Нейрон-Спектр.NETomega 1.6.10.8» (ООО «Нейрософт», Россия). Для всех 6 отведений (FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2) рассчитывали в общей сложности 132 амплитудно-спектральных характеристики ЭКоГ, включавших в себя среднюю и максимальную амплитуды сигнала, среднеквадратичное отклонение амплитуды сигнала и степень сжатия по Лемпелю – Зиву. Последний характеризует повторяемость сигнала, т. е. чем повторяемость больше, тем степень сжатия выше. Этот показатель встроен во многие программные комплексы работы с биомедицинскими сигналами и используется некоторыми исследователями для анализа ЭЭГ у крыс [25]. С помощью быстрого преобразования Фурье сигнал ЭКоГ переводили из временной в частотную область. Из сигнала выделяли δ- (0.5–4.0 Гц), θ- (4.0–8.0 Гц), α- (8.0–14.0 Гц) и β-ритмы (низкочастотные (НЧ) – 14.0–20.0 Гц и высокочастотные (ВЧ) – 20.0–35.0 Гц). Рассчитывали средние амплитуды ритмов волн, индексы и средние мощности ритмов. Индекс ритмов определяли как отношение площади под графиком спектра в частотном диапазоне конкретного ритма к общей площади под графиком спектра в полосе пропускания. Средняя мощность была рассчитана как усредненная мощность спектра в заданном частотном диапазоне. Параметры расчетов мощности: частота квантования – 500 Гц, длина эпохи анализа – 5 с, максимальное перекрывание эпох – 30 %, число точек для быстрого преобразования Фурье – 2048. Данные выражали как соотношения значений параметров после введения препарата к значениям соответствующих параметров до введения (рисунок 1).

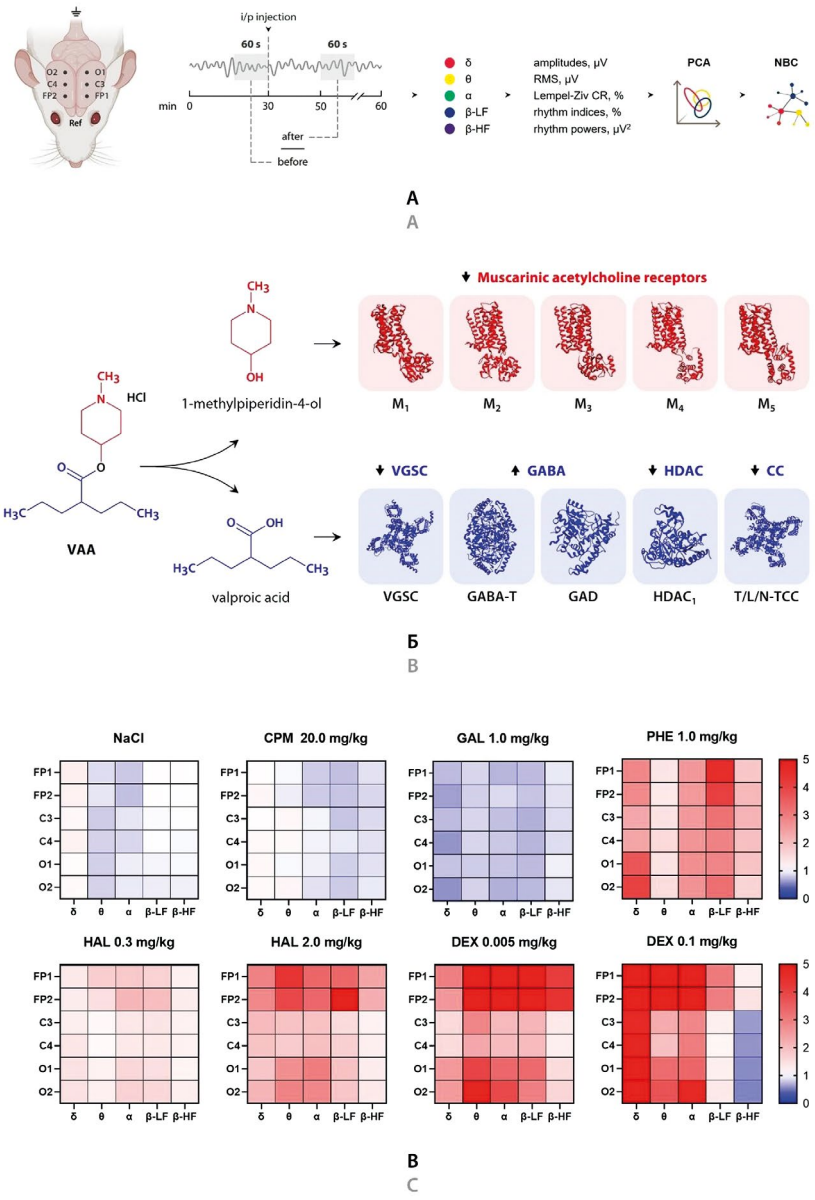


Рисунок 1. А. Этапы эксперимента:

I/p – внутрибрюшинно; RMS – среднеквадратичное отклонение; CR – степень сжатия; LF – низкочастотные; HF – высокочастотные; PCA – метод главных компонент; NBC – наивный байесовский классификатор; Ref – референтный электрод.

Б. Структурная формула аминоэфира вальпроевой кислоты, предполагаемые активные метаболиты и их фармакологические мишени:

VGSC, voltage-gated sodium channels – потенциалзависимые натриевые каналы; GABA-T, GABA transaminase – трансаминаза ГАМК; GAD, glutamate decarboxylase – глутаматдекарбоксилаза; HDAC1, histone deacetylase 1 – гистондеацетилаза-1; T/L/N-TCC, T/L/N-type calcium channels – кальциевые каналы T/L/N-подтипа.

В. Тепловые карты медианных значений средней мощности δ-, θ-, α- и β-ритмов в отведениях FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2 при введении физиологического раствора (NaCl), галоперидола (HAL), галантамина (GAL), дексмедетомидина (DEX), хлоропирамина (CPM) и феназепама (PHE). Исходными данными были отношения значений средней мощности ритмов спустя ~20 мин после введения препаратов к значениям соответствующих показателей до введения (~30-я минута фоновой записи). Для каждой группы было сделано по 10 записей

Figure 1. A. Stages of the experiment:

I/p – intraperitoneal; RMS – root mean square; CR – compression ratio; LF – low-frequency; HF – high-frequency; PCA – principal component analysis; NBC – naïve Bayes classifier; Ref – reference electrode.

B. Structural formula of AVA, its presumed active metabolites and their pharmacological targets:

VGSC, voltage-gated sodium channels; GABA-T, γ-aminobutyric acid transaminase; GAD, glutamate decarboxylase; HDAC1, histone deacetylase 1; T/L/N-TCC, T/L/N-type calcium channels.

C. Heatmaps of mean rhythm powers for the δ-, θ-, α- and β-rhythms in channels FP1, FP2, C3, C4, O1, and O2 following administration of saline (NaCl), haloperidol (HAL), galantamine (GAL), dexmedetomidine (DEX), chloropyramine (CPM), phenazepam (PHE). The heatmap reflects the ratios of mean rhythm power values at ~20 min after drug administration to the respective values before the administration (~30th minute into the baseline record). 10 records per group were made

Обработку и последующий анализ полученных данных выполняли с помощью надстройки для MS Excel XLSTAT 2016.02.28451. Уменьшение размерности данных осуществляли с помощью метода главных компонент (МГК), который применяли к стандартизованным данным X_norm (X – mean(X)/std(X)). Далее делали разложение корреляционной матрицы X_norm^T*X. После обучали модель НБК и проводили классификацию по 4 новым интегративным показателям PC1, PC2, PC3 и PC4, описывающим порядка 80 % дисперсии данных [5]. В качестве обучающей выборки были использованы матрицы эффектов вальпроата натрия, тропикамида, галантамина, галоперидола, хлоропирамина, дексмедетомидина и феназепама.

Ареколиновый тест

Ареколиновый тест используют для выявления центрального М-холиноблокирующего действия веществ, о котором говорит уменьшение продолжительности тремора или его полное устранение [26]. Ареколин – М-холиномиметик, по действию похожий на пилокарпин, но лучше проникающий через ГЭБ, в связи с чем проявляющий центральные М-холиномиметические эффекты. Животные были разделены на 2 группы по 7 животных: контроль и мыши, которым вводили АВК подкожно в дозе 88 мг/кг (1/2 LD_{50}) однократно за 30 мин до инъекции ареколина (25 мг/кг подкожно в область холки). Регистрировали латентный период наступления тремора (минуты), длительность тремора (минуты), выраженность генерализованного мелко- и среднеамплитудного тремора тела животного (баллы, в среднем за период тремора).

Молекулярный докинг

Для компьютерного моделирования из базы данных Protein Data Bank[1] загружали объемные структуры α_2-адренорецепторов (ADRA2): A (PDB ID: 6KUX) с разрешением 2.70 Å, полученный методом рентгеноструктурного анализа (РСА); B (PDB ID: 6K41) с разрешением 2.90 Å, полученный методом криоэлектронной микроскопии; C (PDB ID: 6KUW) с разрешением 2.80 Å, полученный методом РСА. Молекулярный докинг был проведен сервером Galaxy7TM[2]. Подготовка структур белков и лигандов при pH = 7.4, оптимизация структур «белок – лиганд» и расчет свободной энергии связывания методом MM/GBSA выполняли с помощью скриптов, написанных на языке программирования Python 3.9 с использованием библиотек RDKit и OpenBabel. Оценку связывания лигандов в активных сайтах и их визуализацию проводили в программе PyMOL 2.5.4[3], объем полостей в белках рассчитан в модуле PyVOL 1.7.6. Объем Ван-дер-Ваальса лигандов был вычислен с помощью программы MarvinSketch 23.16. Конкретные аминокислотные остатки названы согласно трехбуквенной номенклатуре с добавлением их порядкового номера в цепи рецептора.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы GraphPad Prism 9.0.0. Достоверность различий оценивали по непараметрическому методу точной вероятности Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прогнозирование фармакологической активности АВК с помощью НБК

Введение препаратов из обучающей выборки вызывало специфические изменения амплитудно-спектральных характеристик электрокортикограмм (ЭКоГ) у крыс. На рисунках 1 и 2 представлены тепловые карты медианных значений средней мощности δ-, θ-, α- и β-ритмов в регистрируемых отведениях при введении физиологического раствора, галоперидола, галантамина, дексмедетомидина, хлоропирамина, феназепама и тропикамида. Стоит отметить, что в контрольной группе также были отмечены характерные изменения, проявляющиеся некоторым подъемом активности δ- и снижением θ-, α-ритмов. Вероятно, это связано с тем, что в течение 50 минут после начала записи (30 минут фона и 20 минут после инъекции) испытуемые животные теряют интерес к экспериментаторам и к расположенным рядом компьютеру, штативу для проводов и пр. Введение галантамина в дозе 1 мг/кг снижало среднюю мощность δ-, θ-, α- и β-ритмов во всех отведениях. Эффекты хлоропирамина, галоперидола, феназепама и дексмедетомидина (рисунок 1 С), а также тропикамида (рисунок 2) были описаны в предыдущей работе [5].

Введение вальпроевой кислоты (рисунок 2) в наименьшей из тестируемых доз (5 мг/кг) несколько увеличивало мощность θ-, α- и β-НЧ-ритмов во фронтальных отведениях и снижало активность β-НЧ-ритмов во всех областях. Увеличение дозы препарата до 30 мг/кг усиливало мощность преимуществен-

[1] Protein Data Bank (PDB). Available at: https://www.rcsb.org/ Accessed: 18.03.2024.

[2] Galaxy7TM. Available at: http://galaxy.seoklab.org/7TM. Accessed: 18.03.2024.

[3] PyMOL. Available at: https://pymol.org/2/ Accessed: 18.03.2024.

но δ- и α-ритмов (в ~1,5 раза по сравнению с базовым уровнем) без какой-либо выраженной специфичности. Также для этой дозы было характерно слабое увеличение активности обоих β-ритмов в области первичной соматосенсорной коры (электроды C3 и C4). Доза вальпроевой кислоты 100 мг/кг в 2–2,5 раза увеличивала среднюю мощность δ-, θ-, α- и β-НЧ-ритмов и в ~1,5 раза – β-ВЧ-ритмов. АВК во всех тестируемых дозах линейно увеличивал среднюю мощность δ-, θ-, α- и β-НЧ-ритмов (рисунок 2); увеличение активности β-ВЧ-ритмов было заметно с дозы 5 мг/кг. Выявленные изменения были чуть более выражены во фронтальных областях коры.

Анализ полученных данных МГК показал, что 77,3 % дисперсии могут быть описаны 4 главными компонентами (PC1 – PC4), которые использовали для дальнейшей работы. Факторные нагрузки амплитудно-спектральных характеристик ЭКоГ, характеризующие их вклад в формирование той или иной главной компоненты, приведены в виде тепловой карты на рисунке 3. Компонента PC1, описывающая 52,3 % дисперсии, была образована амплитудными характеристиками сигнала (как в целом, так и отдельными ритмами), а также коррелирующими с ними значениями спектральной мощности ритмов. Все перечисленные параметры ЭКоГ влияли на значение

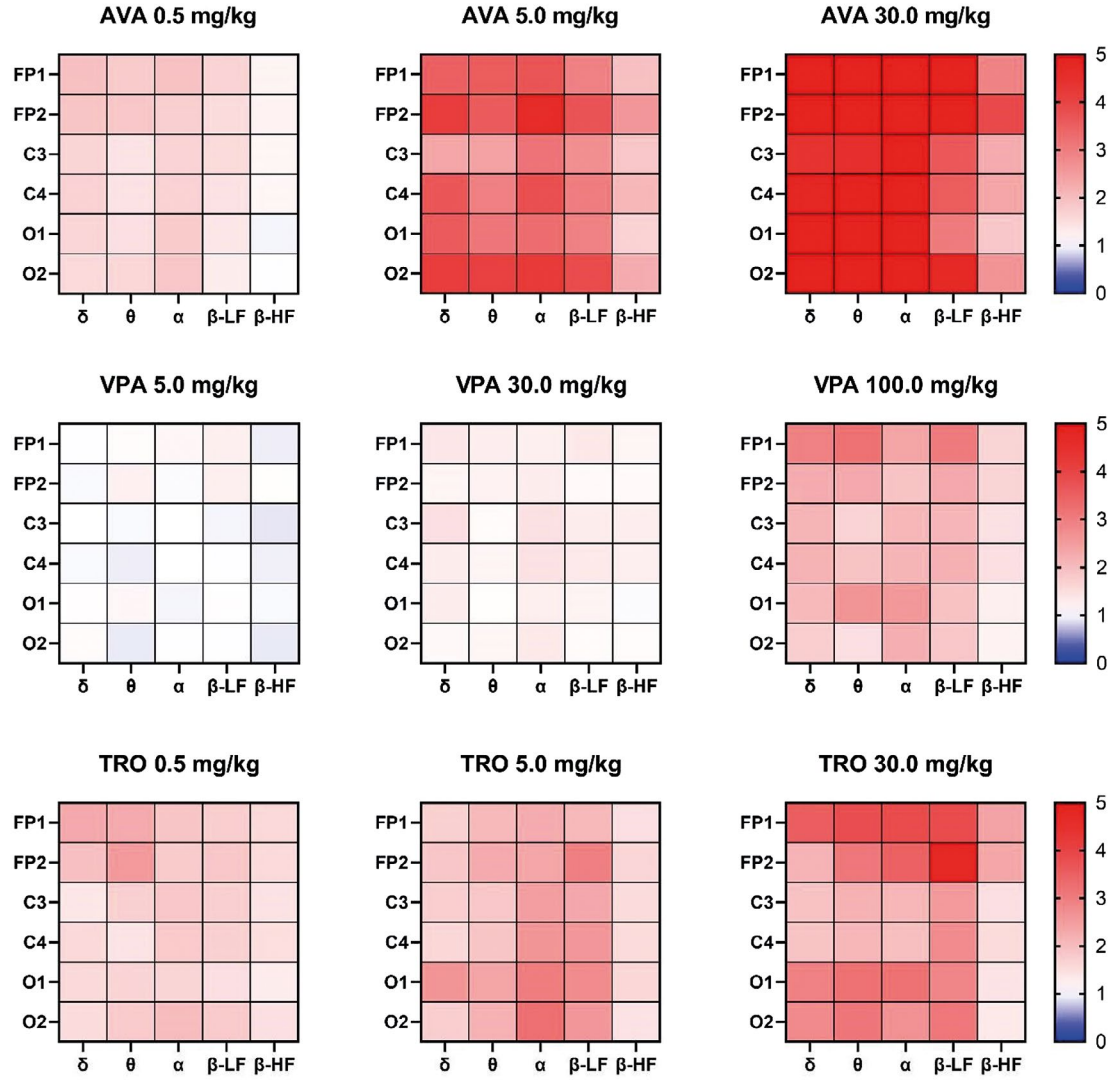
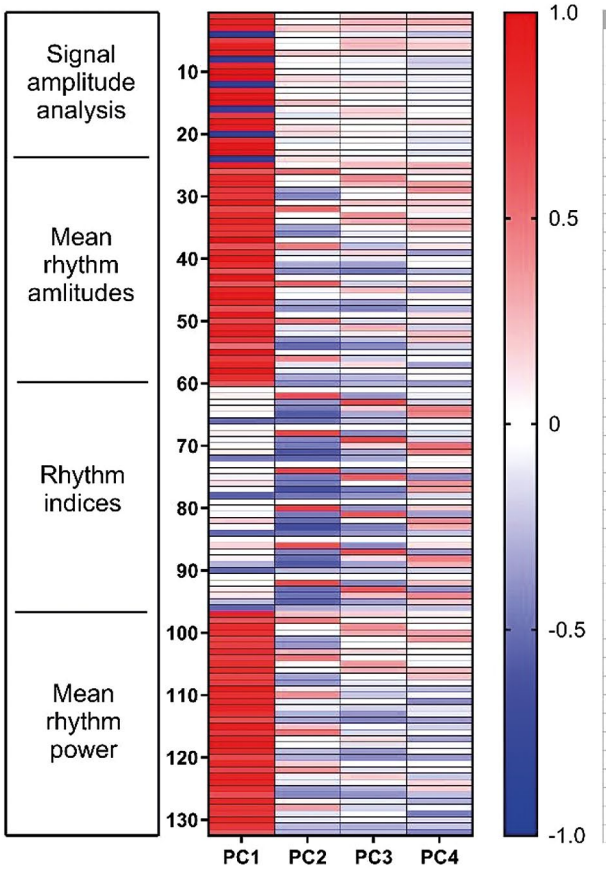


Рисунок 2. **Тепловые карты медианных (*n* = 10 для каждой группы) значений средней мощности δ-, θ-, α- и β-ритмов в отведениях FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2 при введении аминоэфира вальпроевой кислоты (AVA), вальпроата натрия (VPA) и тропикамида (TRO). Исходными данными были отношения значений средней мощности ритмов спустя ~20 мин после введения препаратов к значениям соответствующих показателей до введения (~30-я минута фоновой записи). Для каждой группы было сделано по 10 записей**

Figure 2. **Heatmaps of mean (*n* = 10 for each group) rhythm powers for the δ-, θ-, α- and β-rhythms in channels FP1, FP2, C3, C4, O1, and O2 following the administration of valproic acid aminoester (AVA), sodium valproate (VPA) and tropicamide (TRO). The heatmaps reflect the ratios of mean rhythm power values at ~20 min after drug administration to the respective values before the administration (~30th minute into the baseline record). 10 records per group were made**



#	Variable	Lead	#	Variable	Lead	#	Variable	Lead
1	Max amp	FP1	45	Theta amp	C4	89	Beta-LF ind	O1
2	Min amp	FP1	46	Alpha amp	C4	90	Beta-HF ind	O1
3	RMS	FP1	47	Beta-LF amp	C4	91	Band pass ind	O2
4	Lempel-Ziv	FP1	48	Beta-HF amp	C4	92	Delta ind	O2
5	Max amp	FP2	49	Band pass amp	O1	93	Theta ind	O2
6	Min amp	FP2	50	Delta amp	O1	94	Alpha ind	O2
7	RMS	FP2	51	Theta amp	O1	95	Beta-LF ind	O2
8	Lempel-Ziv	FP2	52	Alpha amp	O1	96	Beta-HF ind	O2
9	Max amp	C3	53	Beta-LF amp	O1	97	Band pass mp	FP1
10	Min amp	C3	54	Beta-HF amp	O1	98	Delta mp	FP1
11	RMS	C3	55	Band pass amp	O2	99	Theta mp	FP1
12	Lempel-Ziv	C3	56	Delta amp	O2	100	Alpha mp	FP1
13	Max amp	C4	57	Theta amp	O2	101	Beta-LF mp	FP1
14	Min amp	C4	58	Alpha amp	O2	102	Beta-HF mp	FP1
15	RMS	C4	59	Beta-LF amp	O2	103	Band pass mp	FP2
16	Lempel-Ziv	C4	60	Beta-HF amp	O2	104	Delta mp	FP2
17	Max amp	O1	61	Band pass ind	FP1	105	Theta mp	FP2
18	Min amp	O1	62	Delta ind	FP1	106	Alpha mp	FP2
19	RMS	O1	63	Theta ind	FP1	107	Beta-LF mp	FP2
20	Lempel-Ziv	O1	64	Alpha ind	FP1	108	Beta-HF mp	FP2
21	Max amp	O2	65	Beta-LF ind	FP1	109	Band pass mp	C3
22	Min amp	O2	66	Beta-HF ind	FP1	110	Delta mp	C3
23	RMS	O2	67	Band pass ind	FP2	111	Theta mp	C3
24	Lempel-Ziv	O2	68	Delta ind	FP2	112	Alpha mp	C3
25	Band pass amp	FP1	69	Theta ind	FP2	113	Beta-LF mp	C3
26	Delta amp	FP1	70	Alpha ind	FP2	114	Beta-HF mp	C3
27	Theta amp	FP1	71	Beta-LF ind	FP2	115	Band pass mp	C4
28	Alpha amp	FP1	72	Beta-HF ind	FP2	116	Delta mp	C4
29	Beta-LF amp	FP1	73	Band pass ind	C3	117	Theta mp	C4
30	Beta-HF amp	FP1	74	Delta ind	C3	118	Alpha mp	C4
31	Band pass amp	FP2	75	Theta ind	C3	119	Beta-LF mp	C4
32	Delta amp	FP2	76	Alpha ind	C3	120	Beta-HF mp	C4
33	Theta amp	FP2	77	Beta-LF ind	C3	121	Band pass mp	O1
34	Alpha amp	FP2	78	Beta-HF ind	C3	122	Delta mp	O1
35	Beta-LF amp	FP2	79	Band pass ind	C4	123	Theta mp	O1
36	Beta-HF amp	FP2	80	Delta ind	C4	124	Alpha mp	O1
37	Band pass amp	C3	81	Theta ind	C4	125	Beta-LF mp	O1
38	Delta amp	C3	82	Alpha ind	C4	126	Beta-HF mp	O1
39	Theta amp	C3	83	Beta-LF ind	C4	127	Band pass mp	O2
40	Alpha amp	C3	84	Beta-HF ind	C4	128	Delta mp	O2
41	Beta-LF amp	C3	85	Band pass ind	O1	129	Theta mp	O2
42	Beta-HF amp	C3	86	Delta ind	O1	130	Alpha mp	O2
43	Band pass amp	C4	87	Theta ind	O1	131	Beta-LF mp	O2
44	Delta amp	C4	88	Alpha ind	O1	132	Beta-HF mp	O2

Рисунок 3. Факторные нагрузки, характеризующие степень вовлечения каждого из 132 анализируемых параметров в формирование компонент PC, PC2, PC3 и PC4, используемых для дальнейших вычислений с использованием НБК.

Amp – амплитуда (мкВ); RMS – среднеквадратичное отклонение (мкВ); Lempel – Ziv – степень сжатия по Лемпелю – Зиву (%), ind – индекс ритма (%), mp – средняя мощность ритма (мкВ²)

Figure 3. Factor loadings reflecting the degree of involvement of each of the 132 parameters analyzed into the formation of the PC, PC2, PC3, and PC4 principal components, used for the subsequent analysis using the NBC.

Amp – amplitude (μV); RMS – root mean square (μV); Lempel – Ziv, Lempel – Ziv compression ratio (%); ind – rhythm index (%); mp – mean rhythm power (μV²)

PC1 вне зависимости от расположения регистрирующих электродов. На значение компоненты PC2 (12,2 %) в большей степени оказывала воздействие активность δ- и β-ритмов во всех отведениях. Величину PC3 (7,4 %) практически полностью определяли индексы δ- и θ-ритмов. Компонента PC4 (5,3 %) была образована преимущественно величиной средней амплитуды и мощности θ-ритма в теменных и затылочных областях коры. В целом первые четыре главные компоненты образовывали те же самые показатели, что и в ранее опубликованной работе [5].

Далее для всех записей из обучающей выборки, а также 3 доз АВК были рассчитаны значения по 4 новым параметрам (главным компонентам PC1 – PC4). В таблице 2 приведены примеры значений главных компонент 10 записей изучаемого соединения в дозе 0,5 мг/кг. После этого на основании рассчитанных данных осуществляли прогнозирование фармакологической активности АВК в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг с использованием НБК. Для каждой записи были получены вероятности совпадения эффектов на ЭКоГ с таковыми у препаратов обучающей выборки (вальпроата натрия, тропикамида, галоперидола, хлоропирамина, галантамина, дексмедетомидина и феназепама). Для всех тестируемых групп рассчитывали медианное значение вероятности сходства с той или иной референтной группой, на основании чего можно было сделать выводы о характере действия той или иной дозы АВК (рисунок 4).

АВК в дозе 0,5 мг/кг продемонстрировал наибольшее сходство эффектов с вальпроатом натрия в дозах 30 и 100 мг/кг (медианные значения вероятности сходства 0,139 и 0,084 соответственно). Для этой дозы также было выявлено некоторое холинолитическое действие, о чем свидетельствует определение изучаемого вещества как «тропикамида» в дозах 0,5 и 5 мг/кг (0,049 и 0,045 соответственно). Увеличение дозы АВК до 5 мг/кг приводило к преобладанию М-холиноблокирующего эффекта (сходство с тропи-

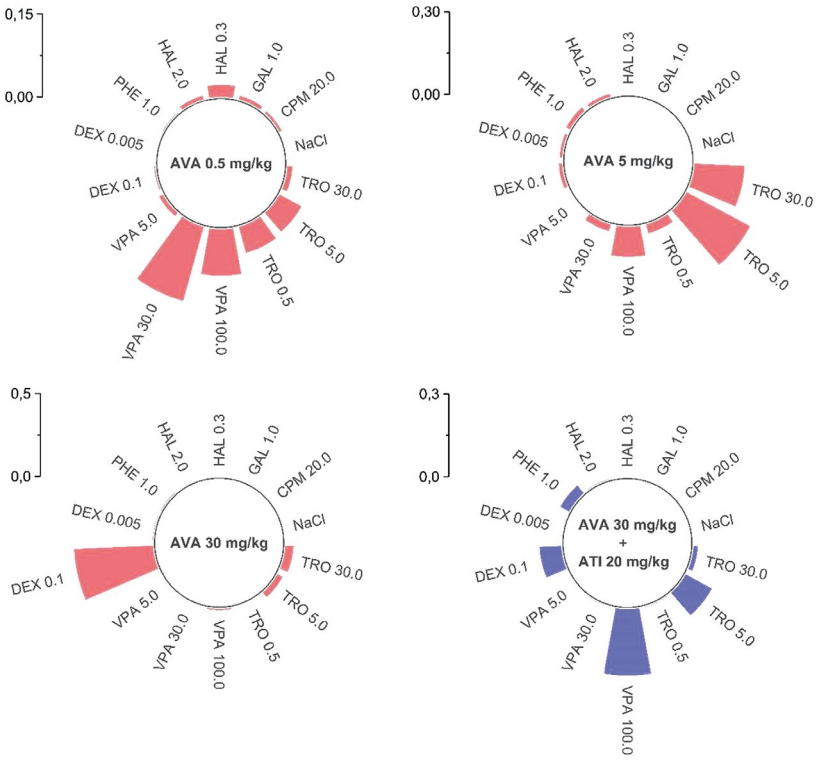


Рисунок 4. Радиальные диаграммы медианных значений вероятности сходства фармакологической активности аминоэфира вальпроевой кислоты (АВК, AVA) в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг, а также АВК с антагонистом α_2-адренорецепторов атипамезолом (ATI) с препаратами обучающей выборки, полученных с использованием НБК.

CPM – хлоропирамин; GAL – галантамин; HAL – галоперидол; PHE – феназепам; DEX – дексмедетомидин; VPA – вальпроат натрия; TRO – тропикамид

Figure 4. Radar bar plots for the median identity probability values for the valproic acid aminoester (AVA) pharmacological activity at the doses of 0,5, 5 and 30 mg/kg, and AVA with the α_2-adrenergic blocker atipamezole (ATI) with the training set drugs, obtained using the naïve Bayes classifier.

CPM – chloropyramine; GAL – galantamine; HAL – haloperidol; PHE – phenazepam; DEX – dexmedetomidine; VPA – sodium valproate; TRO – tropicamide

камидом 5 и 30 мг/кг составило 0,261 и 0,182 соответственно). У дозы 5 мг/кг НБК определял также некоторое вальпроатоподобное действие (сходство с вальпроатом натрия 100 мг/кг составило 0,108). Наибольшая из изучаемых доз АВК (30 мг/кг) была классифицирована как α_2-адреномиметическая (дексмедетомидиноподобная, медианное значение вероятности сходства 0,477). Блокада α_2-адренорецепторов введением антагониста атипамезола возвращала действие изучаемого препарата в дозе 30 мг/кг к вальпроатоподобному и холинолитическому (сходство с вальпроатом натрия в дозе 100 мг/кг 0,241 и тропикамидом в дозе 5 мг/кг 0,108). При этом после введения α_2-адреноблокатора некоторое дексмедетомидиноподобное действие все же сохранялось (0,079).

Ареколиновый тест

Введение АВК в дозе 88 мг/кг устраняло центральные эффекты М-холиномиметика ареколина (возникновение тремора), таким образом проявляя центральную М-холинолитическую активность (таблица 3).

Таблица 2. Пример рассчитанных значений главных компонент PC1 – PC4 для 10 записей, полученных после введения АВК в дозе 0,5 мг/кг

Table 2. An example of calculated principal component PC1 – PC4 values for 10 records obtained after valproic acid aminoester administration at the dose of 0,5 mg/kg

Запись Entry	Главные компоненты Principal components			
	PC1 (52,3 %)	PC2 (12,3 %)	PC3 (7,4 %)	PC4 (5,35 %)
1	–5,099	–1,149	0,895	–0,578
2	–0,516	–3,436	3,412	–1,768
3	–4,596	2,971	–0,342	0,090
4	4,268	4,501	–4,858	1,281
5	–3,333	3,553	0,596	–0,176
6	–2,113	1,652	0,193	0,547
7	–6,485	–1,063	1,688	–1,345
8	–6,900	3,526	–1,432	–0,378
9	–3,750	0,696	–0,472	1,212
10	–4,189	1,137	1,733	–1,624

Примечание. В скобках указан процент дисперсии данных, описываемый соответствующей главной компонентой.

Note. The percentage of data variance described by the corresponding principal component is indicated in parentheses.

Таблица 3. **Результаты ареколинового теста**

Table 3. **Arecoline test results**

Показатель Parameter	Ареколин Arecoline	Ареколин + АВК Arecoline + AVA	Достоверность различий, $p<$ Statistical significance, $p<$
Латентный период тремора, мин Tremor onset latency, min	1,56 ± 0,05	тремор отсутствует no tremor	0,003*
Длительность тремора, мин Tremor duration, min	25,3 ± 2,4	тремор отсутствует no tremor	0,003*
Интенсивность тремора, баллы Tremor intensity, points	1,89 ± 0,12	тремор отсутствует no tremor	0,003*

Примечание. * Достоверность различий оценивали по непараметрическому методу точной вероятности Фишера.

Note. * The significance of differences was assessed using the nonparametric Fisher exact probability method.

Молекулярный докинг

Для валидации полученного сходства эффектов АВК в дозе 30 мг/кг с дексмедетомидином была проведена оценка связывания молекулы (а также ее вероятных метаболитов – вальпроевой кислоты и N-метилпиперидин-4-ола) с 3 подтипами α_2-адренорецепторов (A2A, A2B и A2C) методом молекулярного докинга. Было выбрано 10 лучших моделей комплексов «белок – лиганд» каждой из вариаций для оценки места связывания [27]. Значения энергий (G_{dock}, G_{bind} и G_{comp}), указанные в таблицах на рисунках 5–7, являются средними арифметическими этих десяти результатов. Более отрицательные энергии указывают на большую аффинность данного соединения по отношению к данному рецептору. В качестве референтного внутреннего лиганда был выбран норадреналин.

По результатам MM/GBSA было установлено, что АВК имеет примерно одинаковое сродство к рецепторам всех трех подтипов: энергии взаимодействия АВК-ADRA2A, АВК-ADRA2B и АВК-ADRA2C, полученные методом MM/GBSA, составили –54,289, –49,195 и –50,738 ккал/моль соответственно (для сравнения: энергии взаимодействия норадреналина с теми же рецепторами составили –54,810, –54,699 и –50,303 ккал/моль соответственно). Вальпроевая кислота и N-метилпиперидин-4-ол имели достаточно высокие значения энергий взаимодействия, входящие в диапазон –36,639 ÷ –15,219 ккал/моль, из чего можно сделать вывод об отсутствии сродства данных молекул по отношению к α_2-адренорецепторам.

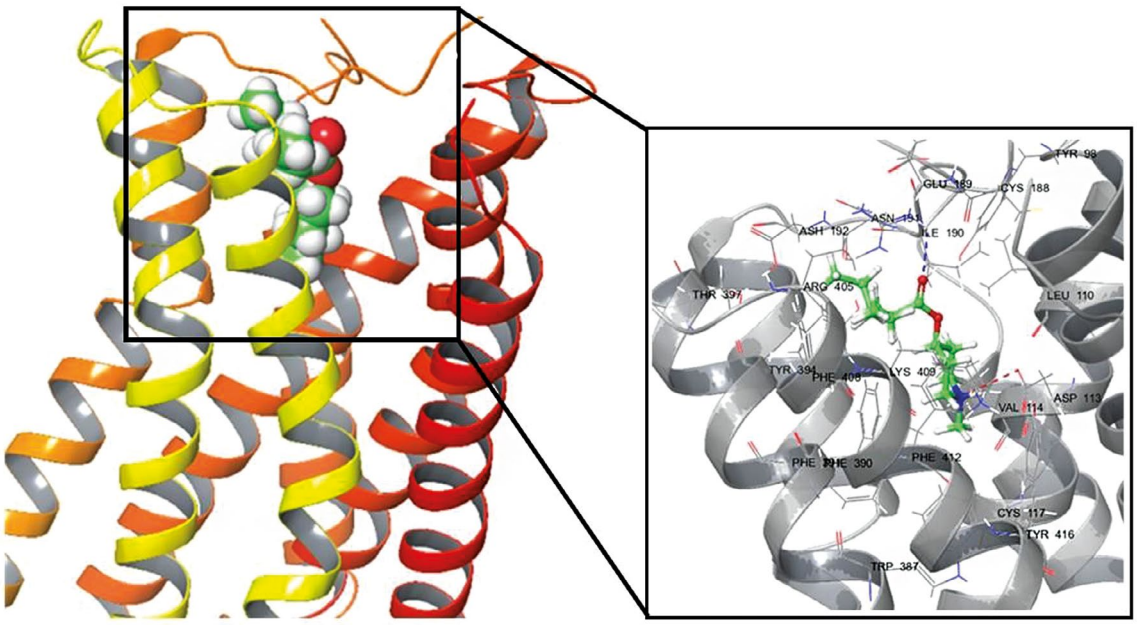
На сегодняшний день вальпроевая кислота является одним из наиболее часто назначаемых противоэпилептических препаратов, эффективным практически при всех формах эпилепсии [28]. Дальнейшее изучение позволило рассмотреть ее в качестве средства для лечения пациентов с биполярным аффективным расстройством [9], мигренью [8] и нейропатиями [12]. В попытках минимизации побочных эффектов (главным образом эмбрио- и гепатотоксичности) и увеличения клинической эффективности вальпроевой кислоты были синтезированы ее различные аналоги и производные. Первичные модификации молекулы включали изменение карбоксильной группы (замена амидом), изменение основной цепи (замена циклическими звеньями) и/или изменение характера ветвления путем введения ненасыщенных связей [6].

Изучаемый в данной работе АВК представляет из себя сложный эфир вальпроевой кислоты с пиперидиновым фрагментом (N-метилпиперидин-4-олом). Пиперидиновый фрагмент способен взаимодействовать с анионным центром М-холинорецепторов в ЦНС, тем самым блокируя рецепторы от перевозбуждения избытком ацетилхолина в результате токсического действия ингибиторов ацетилхолинэстеразы при отравлении ими. Другой фрагмент, отщепляясь при гидролизе сложноэфирной связи в условиях *in vivo*, образует вальпроевую кислоту, что определяет противосудорожное действие АВК. Сочетание в одной молекуле двух указанных механизмов позволяет рассматривать соединение как эффективный антидот при острых отравлениях АХЭС [15].

В проведенном исследовании был впервые осуществлен фармакологический скрининг АВК в дозах 0,5, 5 и 30 мг/кг с использованием фармако-ЭЭГ и методов машинного обучения (НБК). Предлагаемый метод позволил выявить у молекулы дозозависимые вальпроатоподобные и холинолитические эффекты, что согласуется с ее изначально заявленной активностью. В ареколиновом тесте соединение полностью отменяло наступление тремора у мышей, что подтверждает спрогнозированное атропиноподобное действие.

Полученное для высокой дозы АВК сходство с дексмедетомидином, отменяемое атипамезолом, вероятнее всего, свидетельствует об активации изучаемым соединением α_2-адренорецепторов. Этот эффект может быть, с одной стороны, связан с активностью именно пиперидинового фрагмента, поскольку введение α_2-антагониста восстанавливало в большей степени вальпроатоподобное действие, но не М-холиноблокирующее. Частичное сохранение группой AVA + ATI сходства с дексмедетомидином и неполное восстановление холинолитического эффекта может свидетельствовать о том, что N-метилпиперидин-4-ол способен взаимодействовать не только с анионным центром М-холинорецепторов, но и α_2-адренорецепторами.

На сегодняшний день среди классических агонистов α_2-адренорецепторов (клонидин, дексмедетомидин, гуанфацин и др.) еще не было синтезировано производных пиперидина. Тем не менее к этой химической группе относятся в том числе и некоторые опиоидные анальгетики, например фентанил и



Protein	V_{cav}	Ligand	$V_{vdW_{lig}}$	$G_{Docking}$	$G_{MM/GBSA}$
A2A	583	AVA	265	-6,901	-54,289
		VPA	156	-5,313	-15,219
		MPO	126	-5,597	-31,528
		ATI	208	-7,577	-49,974
		NE	156	-8,080	-54,810

Рисунок 5. Изображения общего плана комплекса AVA-ADRA2A (слева) и крупного плана лиганд-белкового взаимодействия в этом комплексе с указанием взаимодействующих с лигандом аминокислотных остатков (справа).

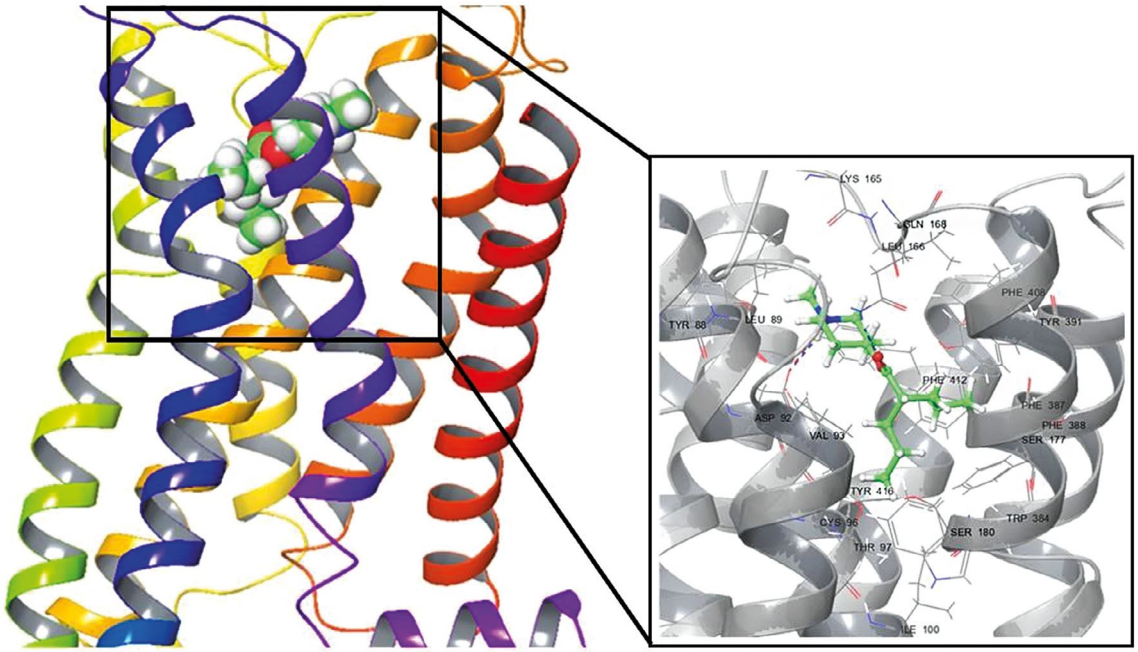
В таблице: Protein – сокращённое наименование рецептора; V_{cav} – объем активного сайта рецептора, Å³; Ligand – сокращенное наименование лиганда (AVA – аминоэфир вальпроевой кислоты, VPA – вальпроевая кислота, MPO – N-метил-4-пиперидинола, ATI – атипамезол, NE – норадреналин); $V_{vdW_{lig}}$ – объем молекулы, Å³; $G_{Docking}$ – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная в результате молекулярного докинга, ккал/моль; $G_{MM/GBSA}$ – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная методом MM/GBSA, ккал/моль

Figure 5. General AVA-ADRA2A complex design (on the left) and a close-up of ligand-protein interaction in the given complex with indication of amino-acid residues interacting with the ligand (on the right).

In the table: Protein – receptor short title; V_{cav} – receptor active site volume (Å³); Ligand – ligand short title (AVA – valproic acid aminoester, VPA – valproic acid, MPO – N-methyl-4-piperidinol, ATI – atipamezole, NE – noradrenaline); $V_{vdW_{lig}}$ – molecule volume (Å³); $G_{Docking}$ – ligand-protein interaction energy received using molecular docking (kkal/mol); $G_{MM/GBSA}$ – ligand-protein interaction energy received using MM/GBSA method (kkal/mol)

тримеперидин. Опиоиды, такие как меперидин, проявляют мощные противодрожательные свойства у грызунов подобно агонистам α_2-адренорецепторов, которые не могут быть полностью устранены предварительным введением антагониста опиоидных рецепторов налоксона [29]. В исследовании Höcker и др. было показано, что меперидин и ремифентанил взаимодействуют с α_2-адренорецепторами в мозге мышей, проявляя различное сродство к α_{2A}-, α_{2B}- и α_{2C}-адренорецепторам [30].

Одним из классических эффектов α_2-адреномиметиков является седация [31], которую можно было наблюдать при введении дексмедетомидина в любой из тестируемых доз. Введение АВК в дозе 30 мг/кг визуально не только не вызывало седации у испытуемых животных, но и позволяло наблюдать ажитацию, характерную для высоких доз холинолитических препаратов [32]. Несмотря на то, что спрогнозированная активность высокой дозы аминоэфира не соответствовала визуальному состоянию тестируемых крыс, справедливым объяснением может быть то, что высокоамплитудные δ-ритмы, характерные для действия α_2-адреномиметиков, перекрывали ЭЭГ-эффекты М-холиноблокирующего действия. При этом нельзя исключать вариант, что оба фармакологических эффекта могли реализоваться одновремен-



Protein	V_{cav}	Ligand	$V_{vdW_{lig}}$	$G_{Docking}$	$G_{MM/GBSA}$
A2B	341	AVA	265	-7,252	-49,195
		VPA	156	-5,297	-20,471
		MPO	126	-5,833	-36,639
		ATI	208	-8,277	-61,881
		NE	156	-8,858	-54,699

Рисунок 6. Изображения общего плана комплекса AVA-ADRA2B (слева) и крупного плана лиганд-белкового взаимодействия в этом комплексе с указанием взаимодействующих с лигандом аминокислотных остатков (справа).

В таблице: Protein – сокращенное наименование рецептора; V_{cav} – объем активного сайта рецептора, Å³; Ligand – сокращенное наименование лиганда (AVA – аминоэфир вальпроевой кислоты, VPA – вальпроевая кислота, MPO – N-метилпиперидин-4-ола, ATI – атипамезол, NE – норадреналин); $V_{vdW_{lig}}$ – объем молекулы, Å³; $G_{Docking}$ – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная в результате молекулярного докинга, ккал/моль; GMM/GBSA – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная методом MM/GBSA, ккал/моль

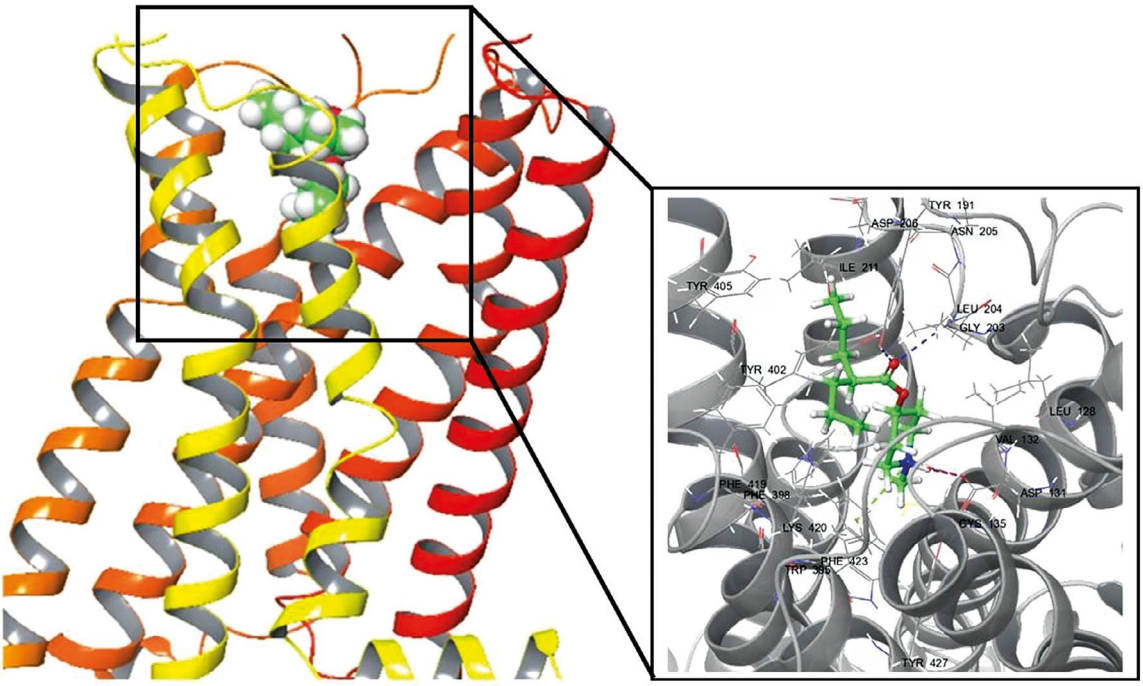
Figure 6. General AVA-ADRA2B complex design (on the left) and a close up of ligand-protein interaction in the given complex with indication of amino-acid residues interacting with the ligand (on the right).

In the table: Protein – receptor short title; V_{cav} – receptor active site volume (Å³), Ligand – ligand short title (AVA – valproic acid aminoester, VPA – valproic acid, MPO – N-methyl-4-piperidinol, ATI – atipamezole, NE – noradrenaline); $V_{vdW_{lig}}$ – molecule volume (Å³); $G_{Docking}$ – ligand-protein interaction energy received using molecular docking (kkal/mol); $G_{MM/GBSA}$ – ligand-protein interaction energy received using MM/GBSA method (kkal/mol)

но. Схожая особенность была отмечена в предыдущей работе, когда ни для одной из доз противоаллергического препарата прометазина не было выявлено сколько-нибудь значимого H_1-гистаминоблокирующего действия [5].

Молекулярный докинг показал, что исходная молекула АВК имеет наименьшие энергии связывания со всеми тремя подтипами α_2-адренорецепторов по сравнению со своими вероятными активными метаболитами – вальпроевой кислотой и N-метилпиперидин-4-олом. Эти значения энергий связывания изучаемой молекулы были несколько меньше таковых норадреналина, взятого в качестве контроля. Данные результаты могут объяснить, почему именно в высоких дозах было обнаружено дексмедетомидинополобное действие АВК.

Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффективности НБК как инструмента скрининга фармакологической активности соединений по их влиянию на амплитудно-спектральные характеристики ЭКоГ у крыс. Для повышения эффективности предложенного метода требуется пополнение ис-



Protein	V_{cav}	Ligand	$V_{vdW_{lig}}$	$G_{Docking}$	$G_{MM/GBSA}$
A2C	658	AVA	265	-6,012	-50,738
		VPA	156	-4,867	-24,795
		MPO	126	-5,249	-32,989
		ATI	208	-8,020	-50,848
		NE	156	-8,146	-50,303

Рисунок 7. Изображения общего плана комплекса AVA-ADRA2C (слева) и крупного плана лиганд-белкового взаимодействия в этом комплексе с указанием взаимодействующих с лигандом аминокислотных остатков (справа).

В таблице: Protein – сокращенное наименование рецептора; V_{cav} – объем активного сайта рецептора, Å³; Ligand – сокращенное наименование лиганда (AVA – АВК, VPA – вальпроевая кислота, MPO – N-метилпиперидин-4-ола, ATI – атипамезол, NE – норадреналин); $V_{vdW_{lig}}$ – объем молекулы, Å³; $G_{Docking}$ – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная в результате молекулярного докинга, ккал/моль; $G_{MM/GBSA}$ – энергия лиганд-белкового взаимодействия, полученная методом MM/GBSA, ккал/моль

Figure 7. General AVA-ADRA2C complex design (on the left) and a close up of ligand-protein interaction in the given complex with indication of amino-acid residues interacting with the ligand (on the right).

In the table: Protein – receptor short title; V_{cav} – receptor active site volume (Å³); Ligand – ligand short title (AVA – valproic acid aminoester, VPA – valproic acid, MPO – N-methyl-4-piperidinol, ATI – atipamezole, NE – noradrenaline), $V_{vdW_{lig}}$ – molecule volume (Å³); $G_{Docking}$ – ligand-protein interaction energy received using molecular docking (kkal/mol); $G_{MM/GBSA}$ – ligand-protein interaction energy received using MM/GBSA method (kkal/mol)

пользуемой библиотеки записей большим числом эталонных психотропных препаратов, а также выбор оптимальных настроек используемых алгоритмов классификации. Также в дальнейших работах необходимо ответить на некоторые важные вопросы. В первую очередь, какие характеристики ЭКоГ являются наиболее информативными с точки зрения эффектов психоактивных препаратов? Мы используем амплитудно-спектральные характеристики сигнала, однако значительный объем информации также содержат данные кросскорреляционного и когерентного анализа. Однако, по нашим наблюдениям (данные не опубликованы), кросскорреляции и когерентности в том виде, в котором их вычисляет «Нейрон-Спектр.NETomega», не дают логической картины при классификации с использованием МГК и НБК, поэтому пока не используются нами в работе.

Другим вопросом является выбор оптимального количества записей в каждой группе. НБК – это вероятностная модель, для которой нет формального требования к числу входных примеров для каждого класса. Для ее корректной работы важна незави-

симость признаков для каждого примера, которая в нашем случае гарантируется использованием главных компонент, являющихся ортогональными по построению (т. е. независимыми). Достаточность сильно зависит от структуры данных и от дисперсии признаков внутри одного класса. Для того чтобы судить о ней, в машинном обучении для решения задач классификации обычно смотрят на качество классификации и устойчивость качества при случайном переразбиении (кросс-валидация) [33]. В данном случае качество классификации достаточно высоко и устойчиво. Вопрос о минимальных достаточных выборках опять же довольно сложен и в отличие от стандартных статистических критериев не имеет аналитического решения, которое можно получить с помощью того или иного инструмента для расчета мощности критерия. Для ответа на этот вопрос в случае использования моделей машинного обучения нужно изучать поведение кривых обучения для разных размеров выборки, оценивать стабильность и анализировать изменение с ростом количества примеров в выборке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было установлено, что АВК в дозе 0,5 мг/кг обладает преимущественно вальпроатоподобным действием, 5 мг/кг – холиноблокирующим, а 30 мг/кг – α_2-адреномиметическим. Ареколиновый тест у мышей подтверждает центральное М-холиноблокирующее действие изучаемого соединения. Результаты молекулярного докинга говорят как о возможности связывания АВК с α_2-адренорецепторами, так и о том, что дексмедетомидиноподобное действие определяется активностью именно исходной молекулы, а не ее вероятными метаболитами – вальпроевой кислотой и N-метилпиперидин-4-олом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dimpfel W., Hoffmann J. A. Electropharmacograms of rasagiline, its metabolite aminoindan and selegiline in the freely moving rat. *Neuropsychobiology*. 2010;62(4):213–220. DOI: 10.1159/000319947.
2. Dimpfel W., Roeska K., Seilheimer B. Effect of Neurexan on the pattern of EEG frequencies in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12:126. DOI: 10.1186/1472-6882-12-126.
3. Drinkenburg W. H. I. M., Ahnaou A., Ruigt G. S. F. Pharmaco-EEG Studies in Animals: A History-Based Introduction to Contemporary Translational Applications. *Neuropsychobiology*. 2016;72(3–4):139–150. DOI: 10.1159/000443175.
4. Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Prikhodko V. A., Idiyatullin R. D., Kotelnikova A. A., Okovityi S. V. Use of Naïve Bayes Classifier to Assess the Effects of Antipsychotic Agents on Brain Electrical Activity Parameters in Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022;58(4):1130–1141. DOI: 10.1134/S0022093022040160.
5. Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Knyazeva I. S., Korelov M. S., Prikhodko V. A., Titovich I. A., Selizarova N. O., Okovityi S. V. Pharmacoencephalographic assessment of antipsychotic agents' effect dose-dependency in rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2023;59:2153–2167. DOI: 10.1134/S0022093023060200.
6. Mishra M. K., Kukal S., Paul P. R., Bora S., Singh A., Kukreti S., Saso L., Muthusamy K., Hasija Y., Kukreti R. Insights into Structural Modifications of Valproic Acid and Their Pharmacological Profile. *Molecules*. 2021;27(1):104. DOI: 10.3390/molecules27010104.
7. Tursunov A. N., Vasilyev D. S., Nalivaeva N. N. Molecular Mechanisms of Valproic Acid Action on Signalling Systems and Brain Functions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2023;59:1740–1755. DOI: 10.1134/S0022093023050228.
8. Calabresi P., Galletti F., Rossi C., Sarchielli P., Cupini L. M. Antiepileptic drugs in Migraine: From Clinical Aspects to Cellular Mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007;28(4):188–195. DOI: 10.1016/j.tips.2007.02.005.
9. Scarselli M. Lithium and Valproic Acid in Bipolar Disorders and Beyond. *Current Neuropharmacology*. 2023;21(4):890. DOI: 10.2174/1570159X2104230307123319.
10. Zhang X.-Z., Li X.-J., Zhang H.-Y. Valproic acid as a promising agent to combat Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*. 2010;81(1):3–6. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.09.003.
11. Carriere C. H., Kang N. H., Niles L. P. Neuroprotection by valproic acid in an intrastriatal rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2014;267:114–121. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.028.
12. Gill D., Derry S., Wiffen P. J., Moore R. A. Valproic acid and sodium valproate for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011;(10):CD009183. DOI: 10.1002/14651858.CD009183.pub2.
13. Беспалов А. Я., Прокопенко Л. И., Горчакова Т. Л., Петров А. Н., Зайцева М. А., Мелехова А. С., Бельская А. В., Мельникова М. В., Иванов М. Б. Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4ил)-2-пропилпентаноата, обладающий холинолитической и противосудорожной активностью. Патент РФ № RU 2714135 C1. 12.02.2020. Доступно по: https://patents.google.com/patent/RU2714135C1/ru. Ссылка активна на 15.04.2024.
14. Мелехова А. С., Петров А. Н., Беспалов А. Я., Бельская А. В., Мельникова М. В., Зацепин Э. П., Шестова Г. В., Ганеев А. А. Экспериментальная фармакотерапия судорожного синдрома при моделировании тяжелого отравления карбаматом. *Medline.ru*. 2019;20:294–306.
15. Мелехова А. С., Беспалов А. Я., Верведа А. Б., Бондаренко А. А., Мельникова М. В., Пономарева А. Е. Многокритериальная оценка фармакологической активности оригинальных соединений вальпроевой кислоты для купирования первично-генрализованных судорог, вызванных камфорой. *Medline.ru*. 2023;24:107–120.
16. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Idiyatullin R. D., Chernyakov R. T., Karev V. E., Okovityi S. V. A Method for Chronic Registration of Brain Cortical Electrical Activity in Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022;58(1):292–301. DOI: 10.1134/S0022093022010252.
17. Hansen I. H., Agerskov C., Arvastson L., Bastlund J. F., Sørensen H. B. D., Herrik K. F. Pharmaco-electroencephalographic responses in the rat differ between active and inactive locomotor states. *European Journal of Neuroscience*. 2019;50(2):1948–1971. DOI: 10.1111/ejn.14373.
18. Kaboutari J., Zendehdel M., Habibian S., Azimi M., Shaker M., Karimi B. The antiepileptic effect of sodium valproate during different phases of the estrous cycle in PTZ-induced seizures in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2012;68(2):155–161. DOI: 10.1007/s13105-011-0127-x.
19. Bryant S. M., Rhee J. W., Thompson T. M., Lu J. J., Aks S. E. Parenteral ophthalmic tropicamide or cyclopentolate protects rats from lethal organophosphate poisoning. *American Journal of Therapeutics*. 2009;16(3):231–234. DOI: 10.1097/MJT.0b013e318182254b.
20. Geyer M. A., Krebs-Thomson K., Braff D. L., Swerdlow N. R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology*. 2001;156(2–3):117–154. DOI: 10.1007/s002130100811.

21. Waku I., Magalhães M. S., Alves C. O., de Oliveira A. R. Haloperidol-induced catalepsy as an animal model for parkinsonism: A systematic review of experimental studies. *European Journal of Neuroscience.* 2021;53(11):3743–3767. DOI: 10.1111/ejn.15222.
22. Geerts H., Guillaumat P.-O., Grantham C., Bode W., Anciaux K., Sachak S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Research.* 2005;1033(2):186–193. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.11.042.
23. Hunter J. C., Fontana D. J., Hedley L. R., Jasper J. R., Lewis R., Link R. E., Secchi R., Sutton J., Eglen R. M. Assessment of the role of α_2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *British Journal of Pharmacology.* 1997;122(7):1339–1344. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701520.
24. Voronina T. A., Nerobkova L. N. [Effect of phenazepam on sleep cycles in rats]. *Farmakol Toksikol.* 1981;44(1):18–20.
25. Abásolo D., Simons S., Morgado da Silva R., Tononi G., Vyazovskiy V. V. Lempel-Ziv complexity of cortical activity during sleep and waking in rats. *Journal of Neurophysiology.* 2015;113(7):2742–2752. DOI: 10.1152/jn.00575.2014.
26. Дергачев В. Д., Яковлев Е. Е., Брусина М. А., Бычков Е. Р., Питровский Л. Б., Шабанов П. Д. Противопаркинсоническая активность новых лигандов N-метил-D-аспартат-рецепторов в тесте ареколинового гиперкинеза. *Медицинский Совет*. 2021;12:406–412. DOI: 10/21518/2079-701X-2021-12-406-412.
27. Ballesteros J. A., Weinstein H. Integrated methods for the construction of the three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences.* 1995;25:366–428. DOI: 10.1016/S1043-9471(05)80049-7.
28. Manford M. Recent advances in epilepsy. *Journal of Neurology.* 2017;264(8):1811–1824. DOI: 10.1007/s00415-017-8394-2.
29. Kurz M., Belani K. G., Sessler D. I., Kurz A., Larson M. D., Schroeder M., Blanchard D. Naloxone, meperidine, and shivering. *Anesthesiology.* 1993;79(6):1193–1201. DOI: 10.1097/00000542-199312000-00009.
30. Höcker J., Weber B., Tonner P. H., Scholz J., Brand P.-A., Ohnesorge H., Bein B. Meperidine, remifentanil and tramadol but not sufentanil interact with α_2-adrenoceptors in α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-adrenoceptor knock out mice brain. *European Journal of Pharmacology.* 2008;582(1–3):70–77. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.12.022.
31. Kable J. W., Murrin L. C., Bylund D. B. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2000;293(1):1–7.
32. Watanabe H., Shimizu H. Effect of anticholinergic drugs on striatal acetylcholine release and motor activity in freely moving rats studied by brain microdialysis. *The Japanese Journal of Pharmacology.* 1989;51(1):75–82. DOI: 10.1254/jjp.51.75.
33. Bishop C. M. Pattern Recognition and Machine Learning. New York: Springer; 2006. 778 p.

REFERENCES

1. Dimpfel W., Hoffmann J. A. Electropharmacograms of rasagiline, its metabolite aminoindan and selegiline in the freely moving rat. *Neuropsychobiology.* 2010;62(4):213–220. DOI: 10.1159/000319947.
2. Dimpfel W., Roeska K., Seilheimer B. Effect of Neurexan on the pattern of EEG frequencies in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2012;12:126. DOI: 10.1186/1472-6882-12-126.
3. Drinkenburg W. H. I. M., Ahnaou A., Ruigt G. S. F. Pharmaco-EEG Studies in Animals: A History-Based Introduction to Contemporary Translational Applications. *Neuropsychobiology.* 2016;72(3–4):139–150. DOI: 10.1159/000443175.
4. Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Prikhodko V. A., Idiyatullin R. D., Kotelnikova A. A., Okovityi S. V. Use of Naïve Bayes Classifier to Assess the Effects of Antipsychotic Agents on Brain Electrical Activity Parameters in Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2022;58(4):1130–1141. DOI: 10.1134/S0022093022040160.
5. Sysoev Yu. I., Shits D. D., Puchik M. M., Knyazeva I. S., Korelov M. S., Prikhodko V. A., Titovich I. A., Selizarova N. O., Okovityi S. V. Pharmacoencephalographic assessment of antipsychotic agents' effect dose-dependency in rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2023;59:2153–2167. DOI: 10.1134/S0022093023060200.
6. Mishra M. K., Kukal S., Paul P. R., Bora S., Singh A., Kukreti S., Saso L., Muthusamy K., Hasija Y., Kukreti R. Insights into Structural Modifications of Valproic Acid and Their Pharmacological Profile. *Molecules.* 2021;27(1):104. DOI: 10.3390/molecules27010104.
7. Tursunov A. N., Vasilyev D. S., Nalivaeva N. N. Molecular Mechanisms of Valproic Acid Action on Signalling Systems and Brain Functions. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2023;59:1740–1755. DOI: 10.1134/S0022093023050228.
8. Calabresi P., Galletti F., Rossi C., Sarchielli P., Cupini L. M. Antiepileptic drugs in Migraine: From Clinical Aspects to Cellular Mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2007;28(4):188–195. DOI: 10.1016/j.tips.2007.02.005.
9. Scarselli M. Lithium and Valproic Acid in Bipolar Disorders and Beyond. *Current Neuropharmacology.* 2023;21(4):890. DOI: 10.2174/1570159X2104230307123319.
10. Zhang X.-Z., Li X.-J., Zhang H.-Y. Valproic acid as a promising agent to combat Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin.* 2010;81(1):3–6. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.09.003.
11. Carriere C. H., Kang N. H., Niles L. P. Neuroprotection by valproic acid in an intrastriatal rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2014;267:114–121. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.028.
12. Gill D., Derry S., Wiffen P. J., Moore R. A. Valproic acid and sodium valproate for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2011;(10):CD009183. DOI: 10.1002/14651858.CD009183.pub2.
13. Bespalov A. Ya., Prokopenko L. I., Gorchakova T. L., Petrov A. N., Zaytseva M. A., Melekhova A. S., Belskaya A. V., Melnikova M. V., Ivanov M. B. (1-methylpiperidin-4-yl)-2-propylpentanoate hydrochloride, having cholinolytic and anticonvulsant activity. Patent RU 2714135 C1. 12.02.2020. Available at: https://patents.google.com/patent/RU2714135C1/ru. Accessed: 15.04.2024. (In Russ.)
14. Melekhova A. S., Petrov A. N., Bespalov A. Y., Belskaya A. V., Melnikova M. V., Zatsepin E. P., Shestova G. V., Ganeev A. A. Experimental pharmacotherapy of convulsive syndrome in the simulation of severe carbamate poisoning. *Medline.ru.* 2019;20:294–306. (In Russ.)
15. Melekhova A. S., Bespalov A. Y., Verveda A. B., Bondarenko A. A., Mel'nikova M. V., Ponomareva A. E. Multicriteria assessment of pharmacological activity of original valproic acid compounds for the relief of primary generalized seizures, caused by camphor. *Medline.ru.* 2023;24:107–120. (In Russ.)
16. Sysoev Yu. I., Prikhodko V. A., Idiyatullin R. D., Chernyakov R. T., Karev V. E., Okovityi S. V. A Method for Chronic Registration of Brain Cortical Electrical Activity in Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2022;58(1):292–301. DOI: 10.1134/S0022093022010252.
17. Hansen I. H., Agerskov C., Arvastson L., Bastlund J. F., Sørensen H. B. D., Herrik K. F. Pharmaco-electroencephalographic responses in the rat differ between active and inactive locomotor states. *European Journal of Neuroscience.* 2019;50(2):1948–1971. DOI: 10.1111/ejn.14373.
18. Kaboutari J., Zendehdel M., Habibian S., Azimi M., Shaker M., Karimi B. The antiepileptic effect of sodium valproate during different phases of the estrous cycle in PTZ-induced seizures in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry.* 2012;68(2):155–161. DOI: 10.1007/s13105-011-0127-x.
19. Bryant S. M., Rhee J. W., Thompson T. M., Lu J. J., Aks S. E. Parenteral ophthalmic tropicamide or cyclopentolate protects rats from

lethal organophosphate poisoning. *American Journal of Therapeutics*. 2009;16(3):231–234. DOI: 10.1097/MJT.0b013e318182254b.
20. Geyer M. A., Krebs-Thomson K., Braff D. L., Swerdlow N. R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology*. 2001;156(2–3):117–154. DOI: 10.1007/s002130100811.
21. Waku I., Magalhães M. S., Alves C. O., de Oliveira A. R. Haloperidol-induced catalepsy as an animal model for parkinsonism: A systematic review of experimental studies. *European Journal of Neuroscience*. 2021;53(11):3743–3767. DOI: 10.1111/ejn.15222.
22. Geerts H., Guillaumat P.-O., Grantham C., Bode W., Anciaux K., Sachak S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Research*. 2005;1033(2):186–193. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.11.042.
23. Hunter J. C., Fontana D. J., Hedley L. R., Jasper J. R., Lewis R., Link R. E., Secchi R., Sutton J., Eglen R. M. Assessment of the role of α_2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *British Journal of Pharmacology*. 1997;122(7):1339–1344. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701520.
24. Voronina T. A., Nerobkova L. N. [Effect of phenazepam on sleep cycles in rats]. *Farmakol Toksikol*. 1981;44(1):18–20.
25. Abásolo D., Simons S., Morgado da Silva R., Tononi G., Vyazovskiy V. V. Lempel-Ziv complexity of cortical activity during sleep and waking in rats. *Journal of Neurophysiology*. 2015;113(7):2742–2752. DOI: 10.1152/jn.00575.2014.
26. Dergachev V. D., Yakovleva E. E., Brusina M. A., Bychkov E. R., Piotrovskiy L. B., Shabanov P. D. Antiparkinsonian activity of new N-methyl-D-aspartate receptor ligands in the arecoline hyperkinesis test. *Medical Council*. 2021;12:406–412. (In Russ.) DOI: 10/21518/2079-701X-2021-12-406-412.
27. Ballesteros J. A., Weinstein H. Integrated methods for the construction of the three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*. 1995;25:366–428. DOI: 10.1016/S1043-9471(05)80049-7.
28. Manford M. Recent advances in epilepsy. *Journal of Neurology*. 2017;264(8):1811–1824. DOI: 10.1007/s00415-017-8394-2.
29. Kurz M., Belani K. G., Sessler D. I., Kurz A., Larson M. D., Schroeder M., Blanchard D. Naloxone, meperidine, and shivering. *Anesthesiology*. 1993;79(6):1193–1201. DOI: 10.1097/00000542-199312000-00009.
30. Höcker J., Weber B., Tonner P. H., Scholz J., Brand P.-A., Ohnesorge H., Bein B. Meperidine, remifentanil and tramadol but not sufentanil interact with α_2-adrenoceptors in α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-adrenoceptor knock out mice brain. *European Journal of Pharmacology*. 2008;582(1–3):70–77. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.12.022.
31. Kable J. W., Murrin L. C., Bylund D. B. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;293(1):1–7.
32. Watanabe H., Shimizu H. Effect of anticholinergic drugs on striatal acetylcholine release and motor activity in freely moving rats studied by brain microdialysis. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1989;51(1):75–82. DOI: 10.1254/jjp.51.75.
33. Bishop C. M. Pattern Recognition and Machine Learning. New York: Springer; 2006. 778 p.

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+

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.616-008.8-097.591.166.1

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1677

Check for updates

CC BY 4.0

Изучение влияния ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) на характеристики репродуктивной системы самцов крыс

Р. Г. Фархутдинов[1], К. А. Пупыкина[2]✉, Л. А. Шарафутдинова[1], А. М. Федорова[1], З. Р. Хисматуллина[1], М. И. Гарипова[1], Е. Ф. Королева[2], А. А. Ямалеева[1], Т. Д. Рендюк[3]

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский университет науки и технологий» (ФГБОУ ВО УУНТ), 450076, Россия, Приволжский федеральный округ, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32

[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 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:** Пупыкина Кира Александровна. **E-mail:** pupykinaka@gmail.com

ORCID: Р. Г. Фархутдинов – https://orcid.org/0000-0002-2541-8994; К. А. Пупыкина – https://orcid.org/0000-0001-8817-7289;
Л. А. Шарафутдинова – https://orcid.org/0000-0003-0162-7879; А. М. Федорова – https://orcid.org /0000-0003-4911-3981;
З. Р. Хисматуллина – https://orcid.org/0000-0002-3209-5265; М. И. Гарипова – https://orcid.org /0000-0001-7157-6806;
Е. Ф. Королева – https://orcid.org/0000-0001-5798-6382; А. А. Ямалеева – https://orcid.org/0000-0001-9546-0461;
Т. Д. Рендюк – https://orcid.org/0000-0002-0359-3847.

Статья поступила: 01.12.2023 **Статья принята в печать:** 13.05.2024 **Статья опубликована:** 17.05.2024

Резюме

Введение. Разработка новых эффективных и безопасных лекарственных растительных средств, способных оказывать положительное воздействие на репродуктивный статус, является актуальной задачей отечественной фармации. Лекарственные растения рассматриваются как средства альтернативной терапии, направленные на повышение уровня тестостерона и фертильности у мужчин. Арсенал лекарственных растений, применяемых в традиционной медицине для лечения заболеваний у мужчин, представлен в основном фитоадаптогенами, большинство из которых имеют малый ресурсный потенциал на территории России, поэтому актуальным является поиск растений с достаточной сырьевой базой и имеющих потенциал к культивированию. Ярутка полевая является перспективным лекарственным растением, так как широко используется в народной медицине как мочегонное, противовоспалительное, потогонное, антигистаминное, гемостатическое, вяжущее средство, оказывает положительное влияние на процессы сперматогенеза и широко распространена на территории нашей страны. Однако сведения о химическом составе и биологической активности *Thlaspi arvense* L. недостаточны, что показывает актуальность ее дальнейшего, более подробного изучения с целью обоснования возможности применения в практической медицине и решения вопросов стандартизации лекарственного растительного сырья.

Цель. Изучение влияния травы ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) на характеристики репродуктивной системы самцов крыс.

Материалы и методы. Объектом исследования служил настой травы ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L). Изучены особенности репродуктивного поведения самцов крыс после 21-дневного введения настоя травы ярутки полевой с помощью тестов, позволяющих количественно оценить выраженность половой мотивации и сексуальной активности самцов. Проведена оценка жизнеспособности сперматозоидов в эякуляте крыс, произведен подсчет общего количества сперматозоидов (ОКС, млн), дегенеративных и неподвижных форм (%). С помощью классических гистологических методов изучены морфофизиологические показатели сперматогенеза крыс контрольной и опытной групп животных. Иммуноферментным методом определена концентрация тестостерона в сыворотке крови экспериментальных групп животных.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты позволяют сделать заключение о повышении фертильности крыс на фоне курсового введения настоя травы ярутки полевой, о чем свидетельствует увеличение содержания тестостерона в крови, улучшение показателей спермограммы и морфофизиологических характеристик сперматогенеза в семенниках крыс. Применение настоя травы ярутки полевой оказывает протекторное действие на сперматогенез. Выявлено увеличение толщины сперматогенного эпителия, диаметра поперечного сечения извитых семенных канальцев и индекса сперматогенеза по сравнению с контрольной группой животных. Показано положительное влияние ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) на показатели половой мотивации и сексуальной активности самцов крыс.

Заключение. Ярутка полевая является перспективным лекарственным растением, так как способна оказывать положительное влияние на либидо, количество и подвижность сперматозоидов, выработку половых гормонов, сперматогенез, а также на гипофизарно-гонадную ось, что связано с содержанием в ней комплекса биологически активных веществ.

Ключевые слова: трава, половое поведение, подвижность сперматозоидов, сперматогенез, тестостерон

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

Вклад авторов. Р. Г. Фархутдинов, К. А. Пупыкина, Л. А. Шарафутдинова разработали дизайн эксперимента. Л. А. Шарафутдинова и А. М. Федорова провели гистологические исследования и исследовали половое поведение животных. К. А. Пупыкина, Е. Ф. Королева осуществляли заготовку сырья и приготовление извлечений для исследования. Р. Г. Фархутдинов, Л. А. Шарафутдинова, К. А. Пупыкина, Е. Ф. Королева, З. Р. Хисматуллина, Т. Д. Рендюк участвовали в обработке данных и в написании текста статьи. М. И. Гарипова и А. А. Ямалеева провели определение содержания тестостерона. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

© Фархутдинов Р. Г., Пупыкина К. А., Шарафутдинова Л. А., Федорова А. М., Хисматуллина З. Р., Гарипова М. И., Королева Е. Ф., Ямалеева А. А., Рендюк Т. Д., 2024

© Farkhutdinov R. G., Pupykina K. A., Sharafutdinova L. A., Fedorova A. M., Hismatullina Z. R., Garipova M. I., Koroleva E. F., Yamaleeva A. A., Rendyuk T. D., 2024

Для цитирования: Фархутдинов Р. Г., Пупыкина К. А., Шарафутдинова Л. А., Федорова А. М., Хисматуллина З. Р., Гарипова М. И., Королева Е. Ф., Ямалеева А. А., Рендюк Т. Д. Изучение влияния ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) на характеристики репродуктивной системы самцов крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):208–216. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1677

The study of the influence of *Thlaspi arvense* L. on the characteristics of the reproductive system of male rats

Rashit G. Farkhutdinov[1], Kira A. Pupykina[2] ✉, Lucia A. Sharafutdinova[1], Albina M. Fedorova[1], Zuhra R. Hismatullina[1], Margarita I. Garipova[1], Ekaterina F. Koroleva[2], Anna A. Yamaleeva[1], Tamara D. Rendyuk[3]

[1] Ufa University of Science and Technology. 32, Zaki Validi str., Ufa, Republic of Bashkortostan, Volga Federal District, 450076, Russia
[2] Bashkir State Medical University (BSMU). 3, Lenina str., Ufa, Republic of Bashkortostan, Volga Federal District, 450008, Russia
[3] I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Kira A. Pupykina. **E-mail:** pupykinaka@gmail.com

ORCID: Rashit G. Farkhutdinov – https://orcid.org/0000-0002-2541-8994; K. Kira A. Pupykina – https://orcid.org/0000-0001-8817-7289; Lucia A. Sharafutdinova – https://orcid.org/0000-0003-0162-7879; Albina M. Fedorova – https://orcid.org /0000-0003-4911-3981; Zuhra R. Hismatullina – https://orcid.org/0000-0002-3209-5265; Margarita I. Garipova – https://orcid.org /0000-0001-7157-6806; Ekaterina F. Koroleva – https://orcid.org/0000-0001-5798-6382; Anna A. Yamaleeva – https://orcid.org/0000-0001-9546-0461; Tamara D. Rendyuk – https://orcid.org/0000-0002-0359-3847.

Received: 01.12.2023 **Accepted:** 13.05.2024 **Published:** 17.05.2024

Abstract

Introduction. The development of new effective and safe herbal medicines capable of having a positive effect on reproductive status is an urgent task of domestic pharmacy. Medicinal plants are considered as alternative therapies aimed at increasing testosterone levels and fertility in men. The arsenal of medicinal plants used in traditional medicine for the treatment of diseases in men is mainly represented by phytoadaptogens, most of which have a small resource potential in Russia, therefore, it is relevant to search for plants with a sufficient raw material base and with the potential for cultivation. *Thlaspi arvense* L. is a promising medicinal plant, as it is widely used in folk medicine as a diuretic, anti-inflammatory, diaphoretic, antihistamine, hemostatic, astringent, has a positive effect on the processes of spermatogenesis and is widely distributed in our country. However, information on the chemical composition and biological activity of *Thlaspi arvense* L. they are insufficient, which shows the relevance of its further more detailed study in order to substantiate the possibility of application in practical medicine and solutions to the issues of standardization of medicinal plant raw materials.

Aim. The study of the influence of *Thlaspi arvense* L. on the characteristics of the reproductive system of male rats.

Materials and methods. The object of the study was an infusion of herba *Thlaspi arvense* L. The features of the reproductive behavior of male rats after 21-day administration of the infusion of grass yarutka field were studied using tests that allow quantifying the severity of sexual motivation and sexual activity of males. The viability of spermatozoa in the ejaculate of rats was assessed, the total number of spermatozoa (ACS, million), degenerative and immobile forms (%) was calculated. Morphophysiological parameters of spermatogenesis of rats of control and experimental groups of animals were studied using classical histological methods. The concentration of testosterone in the blood serum of experimental groups of animals was determined by the enzyme immunoassay.

Results and discussion. The results obtained allow us to conclude that the fertility of rats has increased against the background of the course administration of the infusion of herba *Thlaspi arvense* L., as evidenced by an increase in the testosterone content in the blood, improvement of spermogram indicators and morphophysiological characteristics of spermatogenesis in the testicles of rats. The use of the infusion of herba *Thlaspi arvense* L. has a protective effect on spermatogenesis. An increase in the thickness of the spermatogenic epithelium, the diameter of the cross-section of the convoluted seminal tubules and the index of spermatogenesis compared with the control group of animals was revealed. The positive effect of *Thlaspi arvense* L. on indicators of sexual motivation and sexual activity of male rats is shown.

Conclusion. *Thlaspi arvense* L. is a promising medicinal plant, as it is able to have a positive effect on libido, the number and mobility of spermatozoa, the production of sex hormones, spermatogenesis, as well as on the pituitary-gonadal axis, which is associated with the content of a complex of biologically active substances in it.

Keywords: herba, sexual behavior, sperm motility, spermatogenesis, testosterone

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. Rashit G. Farkhutdinov, Kira A. Pupykina, Lucia A. Sharafutdinova developed the design of the experiment. Lucia A. Sharafutdinova and Albina M. Fedorova conducted histological studies and investigated the sexual behavior of animals. Kira A. Pupykina, Ekaterina F. Koroleva carried out the procurement of raw materials and preparation of extracts for research. Rashit G. Farkhutdinov, Lucia A. Sharafutdinova, Kira A. Pupykina A., Ekaterina F. Koroleva, Zuchra R. Hismatullina, Tamara D. Rendyuk participated in data processing and in writing the text of the article. The authors Margarita I. Garipova and Anna A. Yamaleeva. carried out the determination of testosterone content. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Farkhutdinov R. G., Pupykina K. A., Sharafutdinova L. A., Fedorova A. M., Hismatullina Z. R., Garipova M. I., Koroleva E. F., Yamaleeva A. A., Rendyuk T. D. The study of the influence of *Thlaspi arvense* L. on the characteristics of the reproductive system of male rats. *Drug development & registration*. 2024;13(2):208–216. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1677

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во всем мире интерес к лекарственным средствам растительного происхождения неуклонно растет, что связано с увеличением осложнений при назначении синтетических препаратов и изменением фармакологического эффекта при совместном их применении, особенно при лечении лиц пожилого возраста [1–46, 12, 17]. Хорошо известно, что с возрастом у мужчин в крови снижается кон-

центрация тестостерона [37]. Воздействие эндокринных дизрапторов, ксенобиотиков, ожирение, диабет, сопутствующие хронические заболевания, алкоголизм, прием лекарственных препаратов оказывают негативное влияние на репродуктивное здоровье человека, приводят к развитию позднего гипогонадизма мужчин [20]. Среди неблагоприятных эффектов экзогенных факторов, обусловленных дефицитом андрогенов, – снижение либидо, эректильная дисфункция, уменьшение волосяного покрова, повышенная утомляемость, снижение мышечной массы и минеральной плотности костей, увеличение жировых отложений, раздражительность, низкое качество жизни [4, 10]. В целом большинство указанных проблем можно решить с помощью современных методов лечения, в частности путем хирургического вмешательства, гормональной терапии или использования вспомогательных репродуктивных технологий [43]. Кроме того, в качестве эффективного способа защиты рассматриваются средства альтернативной терапии с использованием лекарственных растений, направленные на повышение уровня тестостерона в сыворотке, что может способствовать облегчению части симптомов. Такая лечебно-профилактическая тактика не противопоставляется практической медицине, а может повысить эффективность стандартных методов лечения [2, 3, 7, 10, 38, 44, 46].

Одним из важных факторов фертильности является количество сперматозоидов, а уменьшение их количества может снизить вероятность успешной беременности [31]. Высказано предположение, что сперматогенез и созревание половых клеток зависят от степени цитотоксических и патологических поражений сперматогенных клеток [4, 32, 39]. Повреждение клеток происходит также под действием свободных радикалов и окислительного стресса, что связывают с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот в их плазматической мембране и очень низким уровнем цитоплазматических антиоксидантов [23, 39]. Основным эффектом перекисного окисления липидов во всех клетках, особенно в сперме, является нарушение структуры и функции органелл или клеточных мембран (процессы переноса ионов, текучесть и проницаемость, метаболические градиенты) [19, 24].

Арсенал лекарственных растений, применяемых в традиционной медицине для лечения заболеваний у мужчин, представлен в основном фитоадаптогенами (женьшень, родиола розовая, левзея сафлоровидная и др.) [2]. Однако, к сожалению, большинство из них имеют малый ресурсный потенциал на территории России [16]. В связи с этим актуальным является поиск лекарственных растений с достаточной сырьевой базой и имеющих потенциал к культивированию на территории нашей страны. В литературе описывается положительное воздействие лекарственных растений, и в частности ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.), на процессы сперматогенеза [1, 2, 4, 10, 22, 26, 34, 41]. Ярутка полевая имеет широкий ареал распространения на территории России, встречается повсеместно от Западной и Восточной Сибири до Дальнего Востока, на Кавказе на суходольных лугах, залежах, пустырях, на солонцах, является одним из наиболее часто встречаемых сорных растений [6, 13, 16, 28].

Ярутка полевая не является официнальным растением и используется только в народной медицине как мочегонное, противовоспалительное, потогонное, антигистаминное, гемостатическое, вяжущее средство, за рубежом как пищевое растение, масличная культура [8, 10, 13, 29]. Исследования показали, что ярутка обладает свойствами, повышающими фертильность у мужчин, антиоксидантной активностью, предотвращая образование свободных радикалов и перекисное окисление липидов, предупреждая повреждение сперматозоидов, усиливая активность гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси на разных уровнях, влияя на секрецию лютеинизирующего гормона и тестостерона [1, 2, 9, 18, 19, 25, 33, 35, 36]. Именно флавоноиды ярутки (апигенин, лютеолин-7-глюкозид, лютеолин и др.) являются мощными антиоксидантами, обусловливают противовоспалительные свойства за счет ингибирующего влияния на циклооксигеназу и липоксигеназу, подавляют выработку перекиси водорода и IgE, отвечающих за воспаление и аллергические реакции [21, 27, 30, 40, 42]. На основании обзора литературных данных следует отметить, что химический состав ярутки полевой изучен недостаточно. Однако известно, что трава ярутки содержит флавоноиды (гликозиды кверцетина, кемпферола, лютеолина, апигенина), тиогликозиды (синигрин, глюкокаппарин), витамин С, сапонины, изотиоцианаты, высокомолекулярные жирные кислоты (линолевая, линоленовая, олеиновая, пальмитиновая, стеариновая, тетракозановая, эйкозеновая, эруковая и др.), в семенах – жирное масло [6, 11, 13]. Таким образом, более подробное фармакогностическое изучение данного растения и его биологической активности является актуальной задачей.

Цель исследования – изучение влияния травы ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) на характеристики репродуктивной системы самцов крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали траву ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L), из которой готовили настой в соотношении 1:10, настаивали на кипящей водяной бане 15 мин, охлаждали 30 мин, процеживали и применяли полученный раствор для исследования.

Эксперименты проводили на крысах самцах линии *Wistar* в возрасте 1,5 года (средний вес – 300,0–400,0 г), содержавшихся в стандартных условиях вивария кафедры физиологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий» МО РФ. Крысы контрольных ($n = 6$) и опытных

($n = 6$) групп содержались при 12-часовом световом дне на стандартном рационе с брикетированным кормом, при свободном доступе к воде и пище. В проведении поведенческих тестов были использованы эстрирующие самки крысы линии *Wistar* в возрасте 6 месяцев. В течение 21 дня опытной группе животных вводили внутрижелудочно через зонд настой травы ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) в объеме 1 мл/крысу (в пересчете на массу воздушно-сухого сырья 300 мг/кг веса), животные контрольной группы получали воду. При работе с экспериментальными животными руководствовались решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Фармакологические исследования проводили согласно межгосударственному стандарту РФ ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)», положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Дизайн исследований одобрен биоэтической комиссией института.

Исследование полового поведения самцов крыс контрольной и опытной групп (в паре с интактными эстрирующими самками) проводилось в установке «открытое поле», модифицированной под «площадку зоосоциальных предпочтений» (ПЗП). Установка ПЗП представляла собой круглую арену с бортиками, разделенную непрозрачными пластиковыми перегородками на 4 отсека, соединяющихся в центре. В первом, втором и третьем отсеках были размещены соответственно: поилка, кормушка с зерном, пластиковый домик. Четвертый отсек установки был свободным, испытуемый самец был помещен в него за 20 мин до начала испытания. Позже испытуемая крыса-самка была помещена в центральную часть. Наблюдения за самцом после подсадки самки вели в течение 60 мин. Половое поведение изучали с помощью тестов, позволяющих количественно оценить выраженность половой мотивации и сексуальной активности самцов [15]. Половую мотивацию оценивали по показателям прекопуляторного поведения (поведенческие реакции, побуждающие партнера спариваться): латентному периоду первого «эмоционального» подхода самца к самке, обнюхивания, грумингу; количеству «эмоциональных» подходов к самке. При исследовании собственно полового поведения оценивали длительность половой активности (общий период времени, затраченного самцом на «ухаживание» за самкой, количество садок с интромиссиями) [5].

Оценку жизнеспособности сперматозоидов проводили в эякулятах крыс, которые получали, наркотизируя 5%-м раствором тиопентала натрия, вводимым внутримышечно. Затем животное фиксировали на плоской поверхности. Зрелые сперматозоиды получали из придатка семенника, изготавливая из него гомогенат на 5%-м растворе глюкозы (в объеме 1 мл), предварительно подогретом до температуры 37 °C. Затем в камере Горяева производился подсчет общего количество сперматозоидов (ОКС, млн), дегенеративных и неподвижных форм (%) [14].

Гистологическое исследование. Семенники крыс фиксировали в нейтральном 10%-м формалине по Лилли, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Готовили серию фронтальных срезов толщиной 10–12 мкм. Микроскопирование полученных гистологических препаратов проводилось при помощи светооптического микроскопа Микмед-5 (АО «ЛОМО», Россия). Фотографирование проводилось при помощи камеры Levenhuk C510 (5M pixels). Исследования структурных изменений семенников проводили в поле зрения микроскопа Микмед-5 (АО «ЛОМО», Россия) при увеличении в 100 (окуляр 10, объектив 10) и 400 раз (окуляр 10, объектив 40).

О генеративной функции извитых семенных канальцев судили на основании оценки диаметра поперечного сечения извитых семенных канальцев (мкм), а также индекса сперматогенеза (в 100 канальцах по 4-балльной системе фиксировали наличие в каждом канальце сперматогоний, сперматоцитов I и II порядков, сперматид и сперматозоидов) [5].

Для иммуноферментного определения концентрации тестостерона в сыворотке крови самцов крыс линии *Wistar* использовали набор реагентов «Тестостерон-ИФА-Бест» (АО «Вектор-Бест», Россия). Метод определения основан на одностадийном твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител к тестостерону. В лунках планшета при добавлении тестируемого образца происходит конкурентное связывание сывороточного тестостерона и тестостерона, конъюгированного с пероксидазой, моноклональными антителами к тестостерону, находящимися на внутренней поверхности лунок. Количество связавшегося конъюгата определяли по цветной реакции с использованием субстрата пероксидазы – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации тестостерона в анализируемом образце. Измерение оптической плотности проводилось с помощью анализатора иммуноферментных реакций АИФР-01 УНИПЛАН (Россия) при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием лицензионного пакета прикладных программ STATISTICA 10 for Windows. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро – Уилка. Сравнение данных, подчиняющихся закону нормального распределения, проводилось с помощью параметрических методов (t-критерий Стьюдента для независимых выборок).

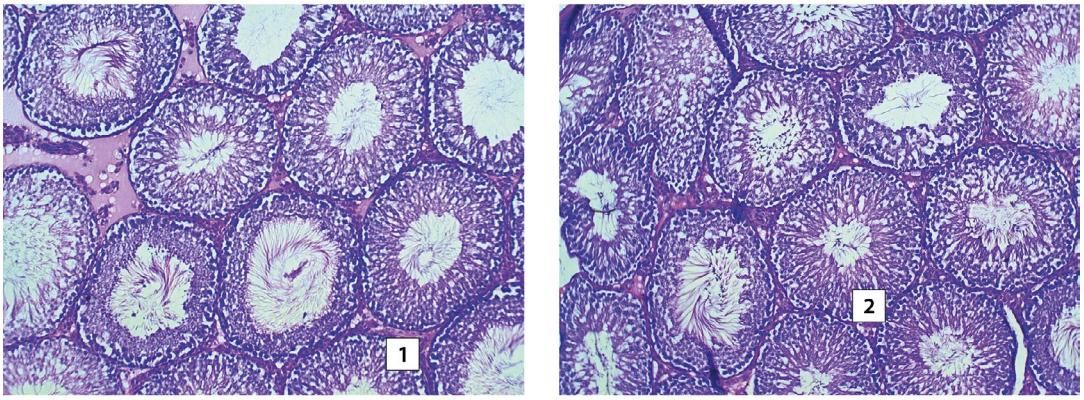
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования особенностей репродуктивного поведения животных на фоне курсового введения настоя травы ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) представлены в таблице 1. У крыс опытной группы наблюдалось повышение процептивных и рецептивных мотиваций. Так, у самцов на фоне применения ярутки полевой определялось уменьшение на 27,3 % латентного периода первого «эмоционального» подхода к интактной крысе-самке, увеличение количества «эмоциональных» подходов на 24,8 % и повышение длительности периода «ухаживания» за самками на 42,2 %. Исследование собственно полового поведения показало увеличение количества покрытий самок более чем в два раза.

На следующем этапе был проведен микроскопический анализ эякулята крыс (таблица 2). Установлено, что на фоне курсового 21-дневного курса введения настоя травы ярутки полевой у самцов опытной группы количество сперматозоидов было значительно выше, чем у крыс контрольной группы ($p < 0,05$). Одновременно с этим обнаружено значительное снижение числа патологических и неподвижных форм сперматозоидов на 38 % и 31 % соответственно.

При гистологическом исследовании выявлено, что структурная организация семенников крыс контрольной группы соответствовала типичной для этих животных. На гистологических препаратах четко визуализируются плотно расположенные извитые семенные канальцы округлой формы (рисунок 1 А).

Между петлями извитых семенных канальцев располагается интерстициальная ткань, в которой определяются гемокапилляры, обеспечивающие обмен веществ между кровью и сперматогенным эпителием, а также группы клеток Лейдига. Сперматo-



А
A

Б
B

Рисунок 1. Извитые семенные канальцы семенников крыс контрольной (А) и опытной (Б) групп животных. Окраска гематоксилином и эозином, ув. х100:

1 – интерстициальная ткань с клетками Лейдига, 2 – сперматогенный эпителий

Figure 1. Convoluted seminal tubules of testes of rats of control (A) and experimental (B) groups of animals. Hematoxylin-eosin staining, uv. x100:

1 – interstitial tissue with Leydig cells, 2 – spermatogenic epithelium

Таблица 1. Показатели половой мотивации и сексуальной активности самцов крыс на фоне введения настоя травы ярутки полевой в течение 21 суток (*M* ± *m*)

Table 1. Indicators of sexual motivation and sexual activity of male rats against the background of the introduction of an infusion of herba *Thlaspi arvense* L. for 21 days (*M* ± *m*)

Группа Group	Латентный период первого подхода к самке, с Latent period of the first approach to the female, s	Количество «эмоциональных» подходов к самке, шт The number of «emotional» approaches to the female, pcs	Общее время ухаживания, с Total courtship time, s	Количество садок, шт Number of cages, pcs
Контрольная Control	6,6 ± 1,8	24,2 ± 1,02	716,4 ± 90,3	0,8 ± 0,1
Опытная Experimental	4,8 ± 1,3	29,4 ± 1,3	1022,6 ± 174,4*	2,7 ± 0,2*

Примечание. * Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$.

Note. * Statistically significant differences compared to the control group at $p < 0.05$.

генный эпителий канальцев расположен на базальной мембране и образован сперматогенными клетками на разных стадиях сперматогенеза. В просвете канальцев часто определяются нормальные и зрелые сперматозоиды.

Таблица 2. Показатели спермограммы крыс до и после применения настоя травы ярутки полевой

Table 2. Spermogram indicators of rats before and after the application of the infusion of herba *Thlaspi arvense* L.

Группа Group	Общее число сперматозоидов, млн Total number of spermatozoa, mln	Патологические формы, % Pathological forms, %	Неподвижные формы, % Fixed forms, %
Контрольная Control	9,12 ± 2,6	25,8 ± 3,2	45,4 ± 8,9
Опытная Experimental	12,5 ± 2,4*	16,1 ± 2,0*	31,3 ± 5,4*

Примечание. * Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$.

Note. * Statistically significant differences compared to the control group at $p < 0.05$.

Морфологическая картина семенников крыс опытной группы (рисунок 1 Б) отличается значительной толщиной эпителиосперматогенного слоя, обусловленной наличием клеток всех стадий сперматогенеза (сперматогонии, первичные сперматоциты, сперматиды, спераматозоиды). Диаметр извитых семенных канальцев крыс опытной группы был шире.

Результаты проведенного морфометрического анализа семенников контрольной и опытной групп представлены в таблице 3. Морфометрические показатели (диаметр извитых семенных канальцев, высота сперматогенного эпителия, индекс сперматогенеза) на фоне курсового приема настоя травы ярутки полевой значительно отличаются от результатов контрольной группы исследования.

Толщина сперматогенного эпителия (таблица 3) у крыс экспериментальной группы на фоне внутрижелудочного введения настоя травы ярутки полевой увеличилась по сравнению с контрольной группой на 100 % ($p < 0,05$), а диаметр поперечного сечения извитых семенных канальцев – на 15 % ($p < 0,05$). В семенниках опытных крыс по сравнению с группой контроля увеличивается индекс сперматогенеза ($p < 0,05$). Этот показатель, отражающий количество генераций сперматогенных клеток в стенке извитых семенных канальцев, является важнейшим количественным показателем, характеризующим генеративную активность семенника.

Проведен иммуноферментный анализ по определению уровня тестостерона в сыворотке крови контрольной и опытной групп животных (таблица 4).

Таблица 3. Морфофизиологические показатели сперматогенеза крыс после курсового приема настоя травы ярутки полевой ($M \pm m$)

Table 3. Morphophysiological parameters of rat spermatogenesis after course administration of infusion of herba *Thlaspi arvense* L. ($M \pm m$)

Наименование показателя Parametrs	Контрольная группа Control group	Опытная группа Experimental group
Толщина сперматогенного эпителия (мкм) Thickness of spermatogenic epithelium (mcm)	41,79 ± 3,36	83,76 ± 8,6*
Диаметр поперечного сечения извитых семенных канальцев (мкм) Diameter of the cross-section of the convoluted seminal tubules (mcm)	149,51 ± 6,49	171,97 ± 6,5*
Индекс сперматогенеза (число) Spermatogenesis index (number)	3,25 ± 0,07	4,69 ± 0,06*

Примечание. * Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$.

Note. * Statistically significant differences compared to the control group at $p < 0.05$.

Таблица 4. Иммуноферментные показатели концентрации тестостерона в сыворотке крови животных на фоне введения настоя травы ярутки полевой

Table 4. Enzyme immunoassay indicators of testosterone concentration in the blood serum of animals against the background of the introduction of the infusion of herba *Thlaspi arvense* L.

Группа Group	Уровень тестостерона, нмоль/л Testosterone levels, nmol/l
Контрольная Control	3,96 ± 0,36
Опытная Experimental	4,89 ± 0,43*

Примечание. * Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$.

Note. * Statistically significant differences compared to the control group at $p < 0.05$.

Результаты анализа показали увеличение концентрации тестостерона в сыворотке крови опытной группы животных под влиянием настоя травы ярутки полевой, что имеет важное значение, так как уровень тестостерона, как наиболее важного андрогенного гормона, оказывает прямое влияние на деление стволовых клеток и дифференцировку сперматогенных клеток. Вероятно, биологически активные вещества ярутки полевой напрямую влияют на клетки Лейдига, стимулируя секрецию тестостерона. При этом исследования последних лет показали, что входящие в состав ярутки полевой флавоноиды, производные лютеолина, являются естествен-

ными ингибиторами ароматазы, которая способствует уменьшению объема преобразования мужского гормона в эстроген и, следовательно, способствует росту тестостерона [45].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные результаты позволяют сделать заключение о повышении фертильности крыс на фоне курсового введения настоя травы ярутки полевой, о чем свидетельствует увеличение содержания тестостерона в крови, улучшение показателей спермограммы и морфофизиологических характеристик сперматогенеза в семенниках крыс. Выявлено статистически значимое увеличение толщины сперматогенного эпителия, диаметра поперечного сечения извитых семенных канальцев и индекса сперматогенеза по сравнению с контрольной группой животных. Обобщая полученные результаты, можно отметить, что настой травы ярутки полевой оказывает положительное влияние на показатели половой мотивации и сексуальной активности самцов, протекторное действие на сперматогенез, механизм действия которого может заключаться в способности тормозить процессы перекисного окисления липидов и мембранодеструкции за счет прямого и опосредованного антиоксидантного и мембранопротекторного действия.

Таким образом, ярутка полевая является перспективным для изучения лекарственным растением, так как способна оказывать положительное влияние на либидо, количество и подвижность сперматозоидов, выработку половых гормонов, сперматогенез, а также на гипофизарно-гонадную ось, что связано с содержанием в ней комплекса биологически активных веществ. Поэтому целесообразным является более подробное изучение химического состава и биологической активности ярутки полевой с целью обоснования возможности применения ее в практической медицине и решения вопросов стандартизации лекарственного растительного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрияненков А. В. Изучение фармакологической эффективности густых экстрактов ярутки полевой и эспарцета песчаного на модели доброкачественной гиперплазии предстательной железы у крыс. *Scientific Journal «ScienceRise»*. 2015;10(4):46–51. DOI: 10.15587/2313-8416.2015.52263.
2. Барнаулов О. Д. Фитотерапия при импотенции: обзор лекарственных растений и их композиций, применяемых для профилактики и лечения нарушений репродуктивных функций у мужчин. СПб.: Изд-во Н.-Л.; 2012. 416 с.
3. Браузи М. Тренды фармакотерапии в урологии. Инновации и обращение к прошлому. В сб.: XI конгресс Профессиональной ассоциации андрологов России. *Эффективная фармакотерапия*. 2016;23:32–33.
4. Галимов Ш. Н., Громенко Д. С., Юлдашев В. Л. Фархутдинов Р. Г., Галимова Э. Ф. Азбука мужского здоровья. Уфа: ДизайнПолиграфСервис; 2009. 24 с.
5. Гетманенко А. Ю., Бугаева Л. И., Спасов А. А., Лебедева С. А., Кузубова Е. А., Мальцев М. С. Исследование полового поведения и сперматогенеза у крыс-самцов с экспериментальным дефицитом магния. *Вестник ВолгГМУ*. 2016;4(60):20–23.
6. Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомирова В. М. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные). М.: Товарищество научных изданий КМК; 2003. 328 с.
7. Зайченко А. В., Тацкий Ю. А., Коротков В. А., Коваленко Е. Н., Андрияненков А. В., Кухтенко А. С. Морфологическая оценка простатопротекторного действия свечей с масляным экстрактом маклюры в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2014;2:28-31.
8. Кирилюк А. А., Петрище Т. Л. Особенности влияния пищевых продуктов и их компонентов на фармакологическую активность лекарственных средств. *Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики*. 2017;1:51–64.
9. Наумов Н. П., Щеплев П. А., Полозов В. В. Роль антиоксидантов в профилактике мужского бесплодия. *Андрология и генитальная хирургия*. 2019;20(1):22–28. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-1-22-29.
10. Павлов В. Н., Кутлияров Л. М., Хайретдинов А. В., и др. Фитотерапия и мужское здоровье. Уфа: Травы Башкирии; 2008. 32 с.
11. Полухина Т. С., Шатрова М. С., Бешенцева А. В. Ярутка полевая (*Thlaspi arvence* L.) – перспективный источник биологически активных веществ. В сб.: III Международной научно-практической конференции «Инновационное развитие современной науки: проблемы, закономерности, перспективы». Пенза: Наука и Просвещение (ИП Гуляев Г. Ю.). 2017. С. 270–272.
12. Сивков А. В., Синюхин В. Н., Ощепков В. Н., Разумов С. В., Медведев А. А., Чирун Н. В. Роль цитокинов в диагностике хронического простатита. *Урология*. 2003;6:25–28.
13. Буданцев А. Л., ред. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 2. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae. СПб; М.: Товарищество научных изданий КМК; 2009. 129 с.
14. Хабриев Р. У., ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Изд-во Медицина; 2005. 832 с.
15. Субботина С. Н., Парфёнова А. А., Юдин М. А., Быкова А. Ф. Сравнительный анализ информативности методов оценки полового поведения самцов крыс. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2020;70(2):277–288. DOI: 10.31857/S0044467720020124.
16. Эбель Т. В., Михайлова С. И. Распространение ярутки полевой (*Thlaspi arvensis L.,* Brassicaceae) в агроценозах Сибирского Федерального округа и с подкарантинной продукцией. *Вестник КрасГАУ*. 2021;1:56–61. DOI: 10.36718/1819-4036-2021-1-56-61.
17. Alahmadi B. A. Effect of Herbal Medicine on Fertility Potential in Experimental Animals – an Update Review. *Materia Socio Medica*. 2020;32(2):140–147. DOI: 10.5455/msm.2020.32.140-147.
18. Allen J. A., Diemer T., Janus P., Hales K. H., Hales D. B. Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria. *Endocrine*. 2004;25(3):265–275. DOI: 10.1385/ENDO:25:3:265.
19. Aitken R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995;7(4):659–668. DOI: 10.1071/rd9950659.
20. Nguyen B. H., Hoang L., Cao T. N., Minh Q. P., Jannini E. A. Testosterone and aging male, a perspective from a developing country. *The Aging Male*. 2023;26(1):2223712. DOI: 10.1080/13685538.2023.2223712.
21. Bennett J. P., Gomperts B. D., Wollenweber E. Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. *Arzneimittelforschung*. 1981;31(3):433–437.
22. Boroujeni S. N., Bossaghzadeh F., Malamiri F. A., Esmaeili A., Moudi E. The most important medicinal plants affecting sperm and testosterone production: a systematic review. *JBRA Assisted Reproduction*. 2022;26(3):522–530. DOI: 10.5935/1518-0557.20210108.
23. Brody S. A. Мужское бесплодие и окислительный стресс: роль диеты, образа жизни и пищевых добавок. *Андрология и генитальная хирургия*. 2014;15(3):33–41. DOI: 10.17650/2070-9781-2014-3-33-41.
24. Gebreegziabher Y., Marcos E., McKinon W., Rogers G. Sperm characteristics of endurance trained cyclists. *International Journal of Sports Medicine*. 2004;25(4):247–251. DOI: 10.1055/s-2004-819933.

25. Geva E., Bartoov B., Zabludovsky N., Lessing J. B., Lerner-Geva L., Amit A. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility*. 1996;66(3):430–434. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)58514-8.
26. Razaq S., Ibraheem M. R., Hashim S. S. Effect of *Lepidium sativum* aqueous crude extract in some fertility parameters in mice. *International Journal of Science and Research*. 2015;6:260–266. DOI: 10.21275/ART20176549.
27. Kim H. P., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004;96(3):229–245. DOI: 10.1254/jphs.crj04003x.
28. Kubiak A., Wolna-Maruwka A., Niewiadomska A., Pilarska A. A. The Problem of Weed Infestation of Agricultural Plantations vs. the Assumptions of the European Biodiversity Strategy. *Agronomy*. 2022;12(8):1808. DOI: 10.3390/agronomy12081808.
29. Liu J., Chen M., Zhang Y., Zheng B. Analyses of the oil content, fatty acid composition, and antioxidant activity in seeds of *Thlaspi arvense* L. from different provenances and correlations with environmental factors. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2022;9:11. DOI: 10.1186/s40538-021-00276-x.
30. Mencherini T., Cau A., Bianco G., Della Loggia R., Aquino R. P., Autore G. An extract of *Apium graveolens* var. dulce leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007;59(6):891–897. DOI: 10.1211/jpp.59.6.0016.
31. Mathes M., Kastrick E., Sayles H., Gustin S. How low is too low? Postwash total motile sperm count effect on pregnancy outcomes in intrauterine insemination. *Human Fertility*. 2023;26(5):1108–1113. DOI: 10.1080/14647273.2022.2137858.
32. Modaresi M., Messripour M., Rajaei R. Effect of cinnamon extract on the number of spermatocyte and spermatozoa cells in mice. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 2010;26(1):83–90. DOI: 10.22092/ijmapr.2010.6983.
33. Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D. G. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Medicine*. 2009;6(7):e1000097. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000097.
34. Monageng E., Offor U., Takalani N. B., Mohlala K., Opuwari C. S. A Review on the Impact of Oxidative Stress and Medicinal Plants on Leydig Cells. *Antioxidants*. 2023;12(8):1559. DOI: 10.3390/antiox12081559.
35. Oi Y., Imafuku M., Shishido C., Iwai K., Kominato Yu., Nishimura S. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(8):2150–2156. DOI: 10.1093/jn/131.8.2150.
36. Ralebona N., Sewani-Rusike C., Nkeh-Chungag B. Effects of ethanolic extract of *Garcinia kola* on sexual behaviour and sperm parameters in male Wistar rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;6:1077–1082. DOI: 10.5897/AJPP11.652.
37. Kanabar R., Mazur A., Plum A., Schmied J. Correlates of testosterone change as men age. *The Aging Male*. 2022;25(1):29–40. DOI: 10.1080/13685538.2021.2023493.
38. Santangelo C., Varì R., Scazzocchio B., Di Benedetto R., Filesi C., Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2007;43(4):394–405.
39. Santos F. W., Graça D. L., Zeni G., Rocha J. B. T., Weis S. N., Favero A. M., Nogueira C. W. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. *Reproductive Toxicology*. 2006;22(3):546–550. DOI: 10.1016/j.reprotox.2005.12.009.
40. Silván A. M., Abad M. J., Bermejo P., Villar A. Effects of compounds extracted from Santolina oblongifolia on TXB_2 release in human platelets. *Inflammopharmacology*. 1998;6(3):255–263. DOI: 10.1007/s10787-998-0024-2.
41. Sokolik O. P., Prozorova G. O. Current view on the problem of treating fibrocystic breast disease in terms of herbal medicine. *Research Results in Pharmacology*. 2022;8(2):77–85. DOI: 10.3897/rrpharmacology.8.79286.
42. Sultana S., Ahmed S., Jahangir T., Sharma S. Inhibitory effect of celery seeds extract on chemically induced hepatocarcinogenesis: modulation of cell proliferation, metabolism and altered hepatic foci development. *Cancer Letters*. 2005;221(1):11–20. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.07.030.
43. Jang T. L., Schaeffer A. J. The role of cytokines in prostatitis. *World Journal of Urology*. 2003;21:95–99. DOI: 10.1007/s00345-003-0335-2.
44. Van Coppenolle F., Le Bourhis X., Carpentier F., Delaby G., Cousse H., Raynaud J.-P., Dupouy J.-P., Prevarskaya N. Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: Comparison with finasteride. *The Prostate*. 2000;43(1):49–58. DOI: 10.1002/(sici)1097-0045(20000401)43:1<49::aid-pros7>3.0.co;2-j.
45. Yahyazadeh A., Altunkaynak B. Z. Protective effects of luteolin on rat testis following exposure to 900 MHz electromagnetic field. *Biotechnic & Histochemistry*. 2019;94(4):298–307. DOI: 10.1080/10520295.2019.1566568.
46. Zou Y., Sun Q., Li J., Yang C., Yang J., Zhang L. Effects of E/Z isomers of lycopene on experimental prostatic hyperplasia in mice. *Fitoterapia*. 2014;99:211–217. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.09.013.

REFERENS

1. Andriyanenkov A. V. Study of the pharmacological efficacy of thick extracts of field yarutka and sandy esparcet on a model of benign prostatic hyperplasia in rats. *Scientific Journal "ScienceRise"*. 2015;10(4):46–51. (In Russ.) DOI: 10.15587/2313-8416.2015.52263.
2. Barnaulov O. D. Phytotherapy for impotence: a review of medicinal plants and their compositions used for the prevention and treatment of reproductive disorders in men. St. Petersburg: Publishing House N.-L.; 2012. 416 p. (In Russ.)
3. Brauzi M. Trends of pharmacotherapy in urology. Innovation and turning to the past. In: XI Congress of the Professional Association of Andrologists of Russia. *Effective pharmacotherapy*. 2016;23:32–33. (In Russ.)
4. Galimov Sh. N., Gromenko D. S., Yuldashev V. L., Farkhutdinov R. G., Galimova E. F. The ABC of men's health. Ufa: DizainPoligrafServis; 2009. 24 p. (In Russ.)
5. Getmanenko A. Yu., Bugaeva L. I., Spasov A. A., Lebedeva S. A., Kuzubova E. A., Maltsev M. S. Study of of sexual behavior and spermatogenesis in male rats with experimental magnesium deficiency. *Journal of VolgSMU*. 2016;4(60):20–23. (In Russ.)
6. Gubanov I. A., Kiseleva K. V., Novikov V. S., Tikhomirova V. M. Illustrated determinant of plants of Central Russia. Volume 2. Angiosperms (dicotyledons: deciduous). Moscow: KMK Scientific Press Ltd.; 2003. 328 p. (In Russ.)
7. Zaichenko A. V., Tatsky Yu. A., Korotkov V. A., Kovalenko E. N., Andriyanenkov A. V., Kukhtenko A. S. Morphological assessment of prostate protective activity of suppositories with maclura pomifera oil extract. *Experimental and clinical urology*. 2014;2:28–31. (In Russ.)
8. Kirilyuk A. A., Petrishche T. L. Peculiarities of the influence of food products and their components on the pharmacological activity of medicines. Current problems of *health care and medical statistics*. 2017;1:51–64. (In Russ.)
9. Naumov N. P., Shcheplev P. A., Polozov V. V. The role of antioxidants in the prevention of male infertility. *Andrology and Genital Surgery*. 2019;20(1):22–28. (In Russ.) DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-1-22-29.
10. Pavlov V. N., Kutliyarov L. M., Khayretdinov A. V., et al. Phytotherapy and men's health. Ufa: Travy Bashkirii; 2008. 32 p. (In Russ.)
11. Polukhina T. S., Shatrova M. S., Beshentseva A. V. Yarutka polevaya (*Thlaspi arvence* L.) is a promising source of biologically active substances. In: III International Scientific and Practical Conference "Innovative development of modern science: problems, patterns, prospects". Penza: Nauka i Prosveshchenie (IP Gulyaev G. Yu.). 2017. P. 270–272. (In Russ.)
12. Sivkov A. V., Sinyukhin V. N., Oshchepkov V. N., Razumov S. V., Medvedev A. A., Chirun N. V. The role of cytokines in the diagnosis of chronic prostatitis. *Urologiia*. 2003;6:25–28. (In Russ.)
13. Budantsev A. L., editor. Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. Volume 2. Families Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae. St. Petersburg; Moscow: KMK Scientific Press Ltd.; 2009. 129 p. (In Russ.)

14. Khabriev R. U., editor. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow: Izd-vo Meditsina; 2005. 832 p. (In Russ.)
15. Subbotina S. N., Parfenova A. A., Yudin M. A., Bykova A. F. Comparative analysis of the informativeness of methodsfor assessing the sexual behavior of male rats. *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2020;70(2):277–288. (In Russ.) DOI: 10.31857/S0044467720020124.
16. Ebel T. V., Mikhaylova S. I. The distribution of field pennycress (*Thlaspi arvense* L., Brassicaceae)in the agrocenosis of Siberian Federal district and with quarantined products. *The Bulletin of KrasGAU*. 2021;1:56–61. (In Russ.) DOI: 10.36718/1819-4036-2021-1-56-61.
17. Alahmadi B. A. Effect of Herbal Medicine on Fertility Potential in Experimental Animals – an Update Review. *Materia Socio Medica*. 2020;32(2):140–147. DOI: 10.5455/msm.2020.32.140-147.
18. Allen J. A., Diemer T., Janus P., Hales K. H., Hales D. B. Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria. *Endocrine*. 2004;25(3):265–275. DOI: 10.1385/ENDO:25:3:265.
19. Aitken R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*. 1995;7(4):659–668. DOI: 10.1071/rd9950659.
20. Nguyen B. H., Hoang L., Cao T. N., Minh Q. P., Jannini E. A. Testosterone and aging male, a perspective from a developing country. *The Aging Male*. 2023;26(1):2223712. DOI: 10.1080/13685538.2023.2223712.
21. Bennett J. P., Gomperts B. D., Wollenweber E. Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. *Arzneimittelforschung*. 1981;31(3):433–437.
22. Boroujeni S. N., Bossaghzadeh F., Malamiri F. A., Esmaeili A., Moudi E. The most important medicinal plants affecting sperm and testosterone production: a systematic review. *JBRA Assisted Reproduction*. 2022;26(3):522–530. DOI: 10.5935/1518-0557.20210108.
23. Brody S. A. Male factor infertility and oxidative stress: role of diet, lifestyle and nutritional supplements. *Andrology and Genital Surgery*. 2014;15(3):33–41. (In Russ.) DOI: 10.17650/2070-9781-2014-3-33-41.
24. Gebreegziabher Y., Marcos E., McKinon W., Rogers G. Sperm characteristics of endurance trained cyclists. *International Journal of Sports Medicine*. 2004;25(4):247–251. DOI: 10.1055/s-2004-819933.
25. Geva E., Bartoov B., Zabludovsky N., Lessing J. B., Lerner-Geva L., Amit A. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility*. 1996;66(3):430–434. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)58514-8.
26. Razaq S., Ibraheem M. R., Hashim S. S. Effect of *Lepidium sativum* aqueous crude extract in some fertility parameters in mice. *International Journal of Science and Research*. 2015;6:260–266. DOI: 10.21275/ART20176549.
27. Kim H. P., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004;96(3):229–245. DOI: 10.1254/jphs.crj04003x.
28. Kubiak A., Wolna-Maruwka A., Niewiadomska A., Pilarska A. A. The Problem of Weed Infestation of Agricultural Plantations vs. the Assumptions of the European Biodiversity Strategy. *Agronomy*. 2022;12(8):1808. DOI: 10.3390/agronomy12081808.
29. Liu J., Chen M., Zhang Y., Zheng B. Analyses of the oil content, fatty acid composition, and antioxidant activity in seeds of *Thlaspi arvense* L. from different provenances and correlations with environmental factors. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2022;9:11. DOI: 10.1186/s40538-021-00276-x.
30. Mencherini T., Cau A., Bianco G., Della Loggia R., Aquino R. P., Autore G. An extract of *Apium graveolens* var. dulce leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007;59(6):891–897. DOI: 10.1211/jpp.59.6.0016.
31. Mathes M., Kastrick E., Sayles H., Gustin S. How low is too low? Postwash total motile sperm count effect on pregnancy outcomes in intrauterine insemination. *Human Fertility*. 2023;26(5):1108–1113. DOI: 10.1080/14647273.2022.2137858.
32. Modaresi M., Messripour M., Rajaei R. Effect of cinnamon extract on the number of spermatocyte and spermatozoa cells in mice. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*. 2010;26(1):83–90. DOI: 10.22092/ijmapr.2010.6983.
33. Moher D., Liberati A., Tetzlaff J., Altman D. G. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Medicine*. 2009;6(7):e1000097. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000097.
34. Monageng E., Offor U., Takalani N. B., Mohlala K., Opuwari C. S. A Review on the Impact of Oxidative Stress and Medicinal Plants on Leydig Cells. *Antioxidants*. 2023;12(8):1559. DOI: 10.3390/antiox12081559.
35. Oi Y., Imafuku M., Shishido C., Iwai K., Kominato Yu., Nishimura S. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(8):2150–2156. DOI: 10.1093/jn/131.8.2150.
36. Ralebona N., Sewani-Rusike C., Nkeh-Chungag B. Effects of ethanolic extract of *Garcinia kola* on sexual behaviour and sperm parameters in male Wistar rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;6:1077–1082. DOI: 10.5897/AJPP11.652.
37. Kanabar R., Mazur A., Plum A., Schmied J. Correlates of testosterone change as men age. *The Aging Male*. 2022;25(1):29–40. DOI: 10.1080/13685538.2021.2023493.
38. Santangelo C., Varì R., Scazzocchio B., Di Benedetto R., Filesi C., Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2007;43(4):394–405.
39. Santos F. W., Graça D. L., Zeni G., Rocha J. B. T., Weis S. N., Favero A. M., Nogueira C. W. Sub-chronic administration of diphenyl diselenide potentiates cadmium-induced testicular damage in mice. *Reproductive Toxicology*. 2006;22(3):546–550. DOI: 10.1016/j.reprotox.2005.12.009.
40. Silván A. M., Abad M. J., Bermejo P., Villar A. Effects of compounds extracted from Santolina oblongifolia on TXB_2 release in human platelets. *Inflammopharmacology*. 1998;6(3):255–263. DOI: 10.1007/s10787-998-0024-2.
41. Sokolik O. P., Prozorova G. O. Current view on the problem of treating fibrocystic breast disease in terms of herbal medicine. *Research Results in Pharmacology*. 2022;8(2):77–85. DOI: 10.3897/rrpharmacology.8.79286.
42. Sultana S., Ahmed S., Jahangir T., Sharma S. Inhibitory effect of celery seeds extract on chemically induced hepatocarcinogenesis: modulation of cell proliferation, metabolism and altered hepatic foci development. *Cancer Letters*. 2005;221(1):11–20. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.07.030.
43. Jang T. L., Schaeffer A. J. The role of cytokines in prostatitis. *World Journal of Urology*. 2003;21:95–99. DOI: 10.1007/s00345-003-0335-2.
44. Van Coppenolle F., Le Bourhis X., Carpentier F., Delaby G., Cousse H., Raynaud J.-P., Dupouy J.-P., Prevarskaya N. Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: Comparison with finasteride. *The Prostate*. 2000;43(1):49–58. DOI: 10.1002/(sici)1097-0045(20000401)43:1<49::aid-pros7>3.0.co;2-j.
45. Yahyazadeh A., Altunkaynak B. Z. Protective effects of luteolin on rat testis following exposure to 900 MHz electromagnetic field. *Biotechnic & Histochemistry*. 2019;94(4):298–307. DOI: 10.1080/10520295.2019.1566568.
46. Zou Y., Sun Q., Li J., Yang C., Yang J., Zhang L. Effects of E/Z isomers of lycopene on experimental prostatic hyperplasia in mice. *Fitoterapia*. 2014;99:211–217. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.09.013.

Оригинальная статья / Research article

УДК 54.062; 615.21/26; 615.07

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1669

Check for updates

CC BY 4.0

Влияние *in vitro* на параметры фибринолиза водных экстрактов грибов, произрастающих на древесных растениях

Н. М. Фаустова[1]✉, Д. Н. Ведерников[2], В. В. Баканов[2], Е. Н. Павлова[3], Е. Н. Власова[3], Ю. А. Скорик[3]

[1] Акционерное Общество «Научно-производственное Объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ». 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмоловский, Заводская ул., д. 3-245

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С. М. Кирова». 194021, Россия, г. Санкт-Петербург, Институтский пер., д. 5, литер У

[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук (ИВС РАН). 199004, Россия, г. Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского острова, д. 31

✉ **Контактное лицо:** Фаустова Наталья Михайловна. **E-mail:** faustova.nm@doclinika.ru

ORCID: Н. М. Фаустова – https://orcid.org/0000-0002-5557-1287; Д. Н. Ведерников – http://orcid.org/0000-0001-9996-2100; В. В. Баканов – http://orcid.org/0009-0003-0478-1836; Е. Н. Павлова – http://orcid.org/0000-0003-3766-1729; Е. Н. Власова – http://orcid.org/0000-0002-4644-0445; Ю. А. Скорик – https://orcid.org/0000-0002-9731-6399.

Статья поступила: 01.12.2023 **Статья принята в печать:** 27.05.2024 **Статья опубликована:** 27.05.2024

Резюме

Введение. В составе экстрактов грибов присутствуют соединения, представляющие интерес как источник новых активных фармацевтических субстанций, обладающих антитромботическим действием.

Цель. Цель работы – определение потенциальной антитромботической активности *in vitro* водных экстрактов грибов, произрастающих на древесных растениях: шиитаке (*Lentinula edodes*); чешуйчатки обыкновенной (*Pholiota squarrosa*); опят различных видов – зимних (*Flammulina velutipes* (Curtis) Signer), летних (*Kuehneromyces mutabilis*), луковичноногих (*Armillaria cepistipes*), северных (*Armillaria borealis*), серопластинчатых (*Hypholoma capnoides*); лентинеллуса уховидного (*Lentinellus cochleatus*), вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*).

Материалы и методы. Изучение плазминоген-активаторных свойств тестируемых экстрактов, оценку их влияния на активность фермента системы фибринолиза альфа-2-антиплазмина, фибринолитическую активность плазмы крови, а также на концентрацию фибриногена проводили с использованием наборов реагентов НПО «РЕНАМ» и ООО Фирма «Технология-Стандарт» (Россия).

Результаты и обсуждение. Водный экстракт *L. edodes* и его фракции (водная, солевая и щелочерастворимая), выделенные с использованием сорбента диэтиламиноэтилцеллюлозы, демонстрируют выраженную антитромботическую активность, оказывая влияние в разной степени на все изученные параметры фибринолиза. Водные экстракты шляпок и ножек *P. squarrosa, K. mutabilis* и *F. velutipes* и фракции из этих экстрактов также проявляют антитромботическую (фибринолитическую) активность *in vitro*, оказывая статистически значимое влияние на различные параметры фибринолиза. Для водного экстракта *L. cochleatus* отмечено менее выраженное действие на параметры фибринолиза по сравнению с вышеперечисленными образцами. Экстракты плодовых тел *A. cepistipes*, *A. borealis*, *H. capnoides*, *P. ostreatus* не оказывают влияния на параметры фибринолиза и концентрацию фибриногена.

Заключение. Полученные данные позволяют рекомендовать экстракты из грибов *L. edodes, P. squarrosa, K. mutabilis u F. velutipes* для дальнейшего изучения с целью разработки функциональных пищевых добавок для коррекции сердечно-сосудистых заболеваний или для создания антитромботических лекарственных средств.

Ключевые слова: водные экстракты ксилотрофных грибов, фибринолитическая активность, плазминоген, альфа-2-антиплазмин, фибриноген

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

Вклад авторов. Н. М. Фаустова и Д. Н. Ведерников придумали и разработали эксперимент. Д. Н. Ведерников, В. В. Баканов, Е. Н. Павлова, Е. Н. Власова и Ю. А. Скорик получили объекты исследования и выполнили оценку общего химического состава методом инфракрасной спектроскопии. Н. М. Фаустова выполняла оценку влияния объектов исследования на параметры фибринолиза, обработку экспериментальных данных и написание текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-26-00345) «Исследование состава экстрактивных веществ плодовых тел грибов, произрастающих на деревьях. Биологическая активность экстрактов. Содержание тяжелых металлов».

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам АО «НПО «Дом фармации» Т. Н. Барыбиной, А. Ю. Романенко и П. В. Саковичу за помощь в определении фибринолитической активности объектов исследования и концентрации фибриногена.

Для цитирования: Фаустова Н. М., Ведерников Д. Н., Баканов В. В., Павлова Е. Н., Власова Е. Н., Скорик Ю. А. Влияние *in vitro* на параметры фибринолиза водных экстрактов грибов, произрастающих на древесных растениях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):217–232. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1669

© Фаустова Н. М., Ведерников Д. Н., Баканов В. В., Павлова Е. Н., Власова Е. Н., Скорик Ю. А., 2024
© Faustova N. M., Vedernikov D. N., Bakanov V. V., Pavlova E. N., Vlasova E. N., Skorik Yu. A., 2024

In vitro influence on fibrinolysis parameters of aqueous extracts of mushrooms growing on woody plants

Natalia M. Faustova[1]✉, Dmitriy N. Vedernikov[2], Vyacheslav V. Bakanov[2], Ekaterina N. Pavlova[3], Elena N. Vlasova[3], Yury A. Skorik[3]

[1] RMC «HOME OF PHARMACY». 3-245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia
[2] Saint-Petersburg State Forest Technical University. 5U, Institutsky lane, Saint-Petersburg, 194021, Russia
[3] Institute of Macromolecular Compounds of RAS. 31, Bolshoi avenue of Vasilevskogo Island, Saint-Petersburg, 199004 Russia

✉ **Corresponding author:** Natalia M. Faustova. **E-mail:** faustova.nm@doclinika.ru

ORCID: Natalia M. Faustova – https://orcid.org/0000-0002-5557-1287; Dmitriy N. Vedernikov – http://orcid.org/0000-0001-9996-2100; Vyacheslav V. Bakanov – http://orcid.org/0009-0003-0478-1836; Ekaterina N. Pavlova – http://orcid.org/0000-0003-3766-1729; Elena N. Vlasova – http://orcid.org/0000-0002-4644-0445; Yury A. Skorik – https://orcid.org/0000-0002-9731-6399.

Received: 01.12.2023 **Accepted:** 27.05.2024 **Published:** 27.05.2024

Abstract

Introduction. Various compounds of mushroom extracts are of interest as a source of new active pharmaceutical substances with antithrombotic activity.

Aim. The aim of the work is to determine the potential antithrombotic activity in vitro of aqueous extracts of xylotrophic mushrooms: *Lentinula edodes, Pholiota squarrosa, Flammulina velutipes* (Curtis) Signer, *Kuehneromyces mutabilis, Armillaria cepistipes, Armillaria borealis, Hypholoma capnoides, Lentinellus cochleatus, Léccinum aurantíacum, Pleurotus ostreatus.*

Materials and methods. The study of fibrinolytic activity of water extracts of mushrooms *in vitro* was carried out. The effect of test objects on plasminogen activation, on the activity of enzyms of the fibrinolysis system α2-antiplasmin, on the time of euglobulin clot lysis and on the concentration of fibrinogen was evaluated. For the analysis we used reagent kits of SPD «RENAM» and LLC Company «Technology-Standard» (Russia).

Results and discussion. Pronounced antithrombotic activity is demonstrated by an aqueous extract of *L. edodes* and fractions of aqueous extract. Extracts of *L. edodes* affect all studied parameters of fibrinolysis to varying degrees. Caps and stems of *P. squarrosa, K. mutabilis*, and *F. velutipes* aqueous extracts and fractions of aqueous extracts also demonstrate antithrombotic (fibrinolytic) activity *in vitro*, having a statistically significant effect on various parameters of fibrinolysis. A less pronounced effect on fibrinolysis parameters in comparison with the above samples is observed when using an aqueous extract of *L. cochleatus* marked. *A. cepistipes, A. borealis, H. capnoides, L. aurantiacum, P. ostreatus* fruiting bodies aqueous extracts do not affect the studied parameters of fibrinolysis and the concentration of fibrinogen.

Conclusion. The data obtained make it possible to recommend extracts from *L. edodes, F. velutipes, P. squarrosa* and *K. mutabilis* for further study, for example, in order to develop functional food products for cardiovascular diseases or to create antithrombotic drugs.

Keywords: xylotrophic mushrooms, aqueous extract, fibrinolytic activity, plasminogen, α2-antiplasmin

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

Contribution of the authors. Natalia M. Faustova and Dmitriy N. Vedernikov conceived of the presented idea. Dmitriy N. Vedernikov, Vyacheslav V. Bakanov, Ekaterina N. Pavlova, Elena N. Vlasova and Yury A. Skorik received study objects and assessed the general chemical composition by infrared spectroscopy. Natalia M. Faustova assessed the influence of study objects on fibrinolysis parameters, processed the experimental data and wrote the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-26-00345) "Study of the composition of extractive substances of the fruiting bodies of fungi growing on trees. Biological activity of extracts. Content heavy metals".

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the employees of JSC “NPO "Dom Pharmacy" T. N. Barybina, A. Yu. Romanenko and P. V. Sakovich for their assistance in determining the fibrinolytic activity of the study objects and fibrinogen concentration.

For citation: Faustova N. M., Vedernikov D. N., Bakanov V. V., Pavlova E. N., Vlasova E. N., Skorik Yu. A. *In vitro* influence on fibrinolysis parameters of aqueous extracts of mushrooms growing on woody plants. *Drug development & registration*. 2024;13(2):217–232. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1669

ВВЕДЕНИЕ

Нормальное функционирование системы гемостаза зависит от взаимодействия его звеньев: свертывающего и противосвертывающего, обеспечивающих гемостатический потенциал крови. Нарушения в работе системы гемостаза приводят к различным заболеваниям, в том числе и к угрожающим жизни состояниям – тромбозам и неконтролируемым кровотечениям [1]. Фибринолиз – важный биохимический процесс, направленный на разрушение фибриновых сгустков, образующихся при участии каскада ферментов системы свертывания крови [1–3].

К настоящему времени разработаны различные лекарственные средства, способствующие растворению тромбов и препятствующие их образованию: тромболитические (фибринолитические) средства (альтеплаза, тенектеплаза, урокиназа, плазминоген и другие) и различные антикоагулянты (гепарины, низкомолекулярные гепарины и их аналоги). Применение

этих препаратов сопряжено с рядом негативных побочных эффектов, включая развитие иммуногенности, системного фибринолиза [1, 3, 4]. Поиск альтернативных препаратов, в том числе среди экстрактов растительного происхождения, обладающих антикоагулянтным, антитромботическим действием, не теряет своей актуальности.

Согласно опубликованным данным, экстракты грибов содержат металлопротеиназы, проявляющие достаточную активность в кровотоке, способные расщеплять тромбы, фибрин и фибриноген. [5–10]. Также была отмечена способность полисахаридов, выделенных из водных экстрактов грибов, влиять на активность альфа-2-антиплазмина и плазминогена [9]. Отсюда можно предположить, что грибы могут иметь применение, например, в качестве активных фармацевтических субстанций (АФС) для создания лекарственных средств для лечения тромбоза или для разработки функциональных пищевых добавок при сердечно-сосудистых заболеваниях.

В первую очередь в качестве источников АФС были исследованы микромицеты [5, 11, 12], выделяющие при культивировании протеолитические ферменты. Например, были разработаны фибринолитические препараты «Террилитин» на основе фермента, продуцированного почвенным микромицетом *Aspergillus terricola* [13, 14], и его модификация «Терридеказа»[1], ферментный препарат тромболитического и фибринолитического действия из базидиального гриба рода *Coprinus* [15].

При применении тромболитических препаратов, полученных с помощью микробного синтеза микромицетов, у пациентов развивается ряд серьезных побочных эффектов, связанных с высоким уровнем общего неспецифического протеолиза. В связи с этим перспективным является изучение компонентов плодовых тел различных видов грибов-макромицетов с целью поиска веществ, обладающих более высокой специфичностью в отношении фибринолитической активности и антитромботическим действием. По литературным данным, ферменты, выделенные из *Flamulina velutipes, Armillaria mellea, Léccinum varikolor*, обладают тромболитической, а выделенные из *Pleurotus ostreatus*, – фибринолитической активностью [5].

Целью настоящей работы является определение *in vitro* потенциальной антитромботической активности водных экстрактов грибов:

1) шиитаке (*Lentinula edodes*);
2) чешуйчатки обыкновенной (*Pholiota squarrosa*);
3) опенка зимнего (*Flammulina velutipes*);
4) опенка летнего (*Kuehneromyces mutabilis*);
5) лентинеллуса уховидного (*Lentinellus cochleatus*);
6) опенка луковичноногого (*Armillaria cepistipes*);
7) опенка северного (*Armillaria borealis*);
8) опенка серопластинчатого (*Hypholoma capnoides*).

Для сравнения фармакологической активности полученных экстрактов *in vitro* были выбраны следующие показатели фибринолиза [1, 2, 4]:

1) активация плазминогена;
2) активность альфа-2-антиплазмина;
3) фибринолитическая активность плазмы крови (время лизиса эуглобулиновых сгустков);
4) концентрация фибриногена.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Объекты исследования представляют собой водные экстракты, полученные из шляпок и ножек ксилотрофных грибов следующих видов:

1) шиитаке (*L. edodes*);
2) чешуйчатки обыкновенной (*P. squarrosa*);
3) опенка зимнего (*F. velutipes* (Curtis) Signer);
4) опенка летнего (*K. mutábilis*);
5) лентинеллуса уховидного (*L. cochleatus*);
6) опенка луковичноногого (*A. cepistipes*);
7) опенка северного (*A. borealis*);
8) опенка серопластинчатого (*H. capnoides*).

Образцы грибов были собраны в лесах Ленинградской области в период с июня по август 2020 и 2021 года, кроме опят зимних, которые были собраны в ноябре 2021 года.

Методика получения водных экстрактов грибов

Для получения экстрактов плодовые тела были разделены на шляпки и ножки, промыты водой дистиллированной, а затем высушены в течение 14 часов при 40 °С до остаточной влажности 10–15 % и измельчены до размера частиц не более 2,5 мм. Затем образцы шляпок и ножек грибов последовательно экстрагировались изопропиловым спиртом («х.ч.», АО «ВЕКТОН», Росссия), а затем водой дистиллированной. Водные экстракты грибов замораживали при температуре не выше –18 °С и лиофильно высушивали. Лиофилизаты водных экстрактов грибов представляли собой порошкообразную массу желто-коричневого цвета различной интенсивности. Объекты исследования хранили при температуре 2–8 °С.

Методика фракционирования водных экстрактов грибов

Из водных экстрактов плодовых тел шиитаке, ножек и шляпок чешуйчатки обыкновенной, опят зимних и летних были получены три фракции – водная (№ 1), солевая (№ 2) и щелочная (№ 3) – с использованием сорбента диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭЦ) (Reanal, Венгрия) с номинальной емкостью 0,6–0,8 ммоль-экв/г и фактором набухаемости 9,0 мл/г.

[1] Терридеказа® (Terridecase). Доступно по: https://www.rlsnet.ru/drugs/terridekaza-5315. Ссылка активна на 01.12.2023.

Для подготовки сорбента сухую ДЭАЭЦ заливали дистиллированной водой и оставляли набухать в течение 2 суток с периодическим перемешиванием и заменой воды. Для перевода сорбента в ОН-форму его сначала заливали 0,5 М раствором HCl на 1 ч при периодическом перемешивании, отмывали дистиллированной водой до нейтрального pH, затем заливали 0,5 М раствором NaOH на 1 ч при периодическом перемешивании и отмывали дистиллированной водой до нейтрального pH.

Для получения водной фракции лиофильно высушенные образцы экстрактов растворяли в дистиллированной воде (200 мг на 100 мл воды) и смешивали с сорбентом. Сорбент отделяли центрифугированием, в раствор добавляли свежую порцию ДЭАЭЦ. Этап повторяли 2–3 раза до полного обесцвечивания раствора. Полученный раствор упаривали на роторном испарителе RV 06-ML (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Германия) при температуре не выше 100 °C и скорости вращения ротора не более 50 об/мин до 20–50 мл и сушили лиофильно.

Для получения солевой фракции к сорбенту ДЭАЭЦ, оставшемуся после отделения водной фракции, добавляли 200 мл 1 М раствора NaCl и периодически перемешивали в течение 1 ч, сорбент отделяли центрифугированием. Этап повторяли 3–5 раз, полученные растворы объединяли, упаривали на роторном испарителе до 20–50 мл, диализовали (диализный мешок Zellu Trans Dialysis Tube T2, молекулярная масса отсечения 3,5 КДа) в течение 3 суток против дистиллированной воды и сушили лиофильно.

Для получения щелочной фракции к сорбенту ДЭАЭЦ, оставшемуся после отделения солевой фракции, добавляли 200 мл раствора 0.1 М NaOH / 0,5 М NaCl и периодически перемешивали в течение 1 ч, сорбент отделяли центрифугированием. Этап повторяли 2–3 раза, полученные растворы объединяли, упаривали на роторном испарителе до 20–50 мл, диализовали в течение 3 суток против дистиллированной воды и сушили лиофильно.

Инфракрасная (ИК) спектроскопия

ИК-спектры полученных экстрактов регистрировали на ИК-фурье-спектрометре VERTEX 70 (Bruker Corporation, США) с разрешением 4 $см^{-1}$, число сканов 60. Для регистрации спектров использовали микроприставку однократного нарушенного полного внутреннего отражения Pike с рабочим элементом из ZnSe. При регистрации спектров вводили поправку, учитывающую глубину проникновения в зависимости от длины волны.

Методики оценки параметров фибринолиза in vitro

Для оценки влияния объектов на параметры фибринолиза *in vitro* была использована коммерчески доступная референтная нормальная пулированная плазма крови человека (РНП-плазма):

1) РНП-плазма, № 717 (ООО Фирма «Технология-Стандарт», Россия);
2) плазма контрольная, № КМ-2 (НПО «РЕНАМ», Россия).

Для получения модельных смесей использовали плазму крови человека с параметрами гемостаза в пределах нормы.

Приготовление сток-растворов и модельных смесей тестируемых объектов

Навеску тестируемых объектов, взвешенную с точностью до 0,00001 г, растворяли в воде очищенной из расчета 100 мкл раствора на 1 мг вещества, в результате получали сток-растворы № 1 с концентрацией тестируемого объекта 10 мг/мл. Далее с помощью серии последовательных разведений в 5 раз в воде очищенной готовили сток-растворы № 2–6 с концентрациями 0,0016–1,0 мг/мл.

Для получения модельных смесей к 270 мкл РНП-плазмы прибавляли 30 мкл сток-растворов № 1–6, затем смеси интенсивно перемешивали при 2000 об/мин в течение 30–40 с и инкубировали при 650 об/мин при 37 °C в течение 15 мин. Концентрация тестируемых объектов в модельных смесях МС1 – МС6 составила 0,16–1000 мкг/мл. Для получения модельной смеси с концентрацией объектов 0 мкг/мл (К(-), отрицательный контроль) к 270 мкл плазмы крови прибавляли 30 мкл воды очищенной.

Модельные смеси объектов с РНП-плазмой крови использовали для дальнейшего анализа с целью определения параметров фибринолиза.

Для проведения исследования использовали следующие наборы реагентов:

1) «Реахром-плазминоген» (№ ФА-2, НПО «РЕНАМ», Россия) для определения плазминоген-активаторных свойств объектов исследования;
2) «Реахром-антиплазмин» (№ ФА-3, НПО «РЕНАМ», Россия) для оценки влияния на активность альфа-2-антиплазмина;
3) «Тех-Фибриноген-тест» (№ 94, ООО Фирма «Технология-Стандарт», Россия) для оценки влияния объектов исследования на концентрацию фибриногена (время формирования фибринового сгустка) по методу Клаусса;
4) «XIIa-зависимый фибринолиз» (№ ФА-1, НПО «РЕНАМ», Россия) для оценки влияния на фибринолитическую активность плазмы крови.

В работе использовано следующее оборудование: микропланшетный анализатор CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия), коагулометр АПГ4-02-П (ООО «ЭМКО», Россия), весы лабораторные электронные AUW-220D (Shimadzu Corporation, Япония), система очистки воды Simplicity® Water Purification System (Millipore Corporation, США).

Описание принципов методов анализа представлено на основании литературных данных [16, 17] и инструкций к наборам реагентов.

Определение активации плазминогена. Метод оценивает способность плазминогена образовывать комплекс со стрептокиназой, гидролизующий пептидный хромогенный субстрат.

1. Плазминоген + Стрептокиназа (избыток) ⇒ Комплекс.
2. Комплекс + Пептид-pNA ⇒ Пептид + pNA (желтый).

Линейный диапазон методики: 11,5–130 % активности плазминогена.

Перед началом анализа модельные смеси с тестируемыми образцами разбавляли в 30 раз рабочим буферным раствором, входящим в состав набора (трис-HCl, pH = 7,4 ± 0,5). Далее анализ активности плазминогена в модельных смесях выполняли в соответствии с инструкцией производителя.

Определение активности альфа-2-антиплазмина. Метод основан на способности α2-антиплазмина ингибировать активность плазмина. В плазму / модельную смесь добавляют избыток плазмина, оставшееся количество последнего катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата.

1. α2-АП (биоматериал) + плазмин (избыток) → (α2-АП-плазмин) + плазмин (остаток).
2. Субстрат-pNA + плазмин (остаток) → Пептид + pNA.

Линейный диапазон методики: 10–150 % активности альфа-2-антиплазмина. Описание процедуры анализа представлено в соответствии с инструкцией к набору в модификации авторов.

Перед началом анализа модельные смеси разбавляли в 3–5 раз рабочим буферным раствором (100 мМ фосфатный буферный раствор, pH = 7,5 ± 0,05). Для проведения реакции в лунки 96-луночного полистиролового планшета, предварительно прогретого до температуры инкубации (37 °С), вносили по 50 мкл рабочего буферного раствора, 50 мкл рабочего раствора плазмина, инкубировали 5 мин при 37 °С при 650 об/мин, затем вносили по 10 мкл калибровочных растворов / контрольных плазм / модельных смесей с тестируемыми объектами, инкубировали 3 мин. По окончании инкубации вносили по 20 мкл раствора хромогенного субстрата, инкубировали 2 мин, реакцию останавливали 70 мкл 20 % раствора уксусной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм (основная длина волны) и 650 нм (референсная длина волны).

Построение калибровочных зависимостей и расчет активности альфа-2-антиплазмина и плазминогена выполняли с помощью программного обеспечения (ПО) Mars 4.01 R2 (BMG LABTECH, Германия).

Определение концентрации фибриногена. Функциональный анализ определения концентрации фибриногена (по методу Клаусса) основан на времени формирования фибринового сгустка: измеряется время свертывания разбавленной цитратной плазмы крови при добавлении избытка тромбина [использовали полуавтоматический коагулометр АПГ4-02-П (ООО «ЭМКО», Россия)].

Оценка фибринолитической активности плазмы крови (XIIa-зависимый фибринолиз): измеряют время полного лизиса эуглобулинового сгустка, полученного из плазмы крови при осаждении в кислой среде (содержит факторы свертывания крови и фибринолиза и не содержит ингибиторов фибринолиза). В качестве испытуемых растворов использовали сток-растворы № 1–6 с концентрациями тестируемых объектов 0,0016–10 мг/мл.

Для водных экстрактов из шиитаке, чешуйчатки и зимних опят было дополнительно оценено влияние на такие параметры гемостаза, как протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), с использованием наборов реагентов «Техпластин-тест» для ПВ (№ 131, ООО Фирма «Технология-Стандарт», Россия) и «АЧТВ-тест» (№ 649, ООО Фирма «Технология-Стандарт», Россия).

Обработка данных

Для всех данных была применена описательная статистика: рассчитаны средние арифметические значения (M), соответствующие им стандартные отклонения (SD); *n* – количество повторностей. Обработка данных была проведена с использованием программы Excel 2007. Статистический анализ проводили с использованием программ Excel 2007 и STATISTICA 10 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании литературных данных мы предположили, что экстракты содержат нейтральные и анионные полисахариды, белки и пептиды, меланины [18, 19]. Фракционирование полученных экстрактов грибов с использованием ионного обмена на катионном сорбенте ДЭАЭЦ в Н-форме позволило получить три фракции, получившие в зависимости от использованного элюента следующие названия:

1) водная фракция (ВФр-1);
2) солевая фракция (СФр-2);
3) щелочная фракция (ЩФр-3).

Для общей характеристики химического состава фракции анализировали методом ИК-спектроскопии. На рисунке 1 приведены типичные ИК-спектры фракций на примере опенка зимнего.

В ИК-спектре водной фракции (рисунок 1, кривая 1) наблюдаются следующие полосы поглощения: широкая полоса 3500–3200 $см^{-1}$ (валентные колебания первичных и вторичных ОН-групп), плечо при 3285 $см^{-1}$ (валентные колебания N—H вторичного амида), 2920 $см^{-1}$ (валентные колебания C—H), плечо при 1660 $см^{-1}$ (валентные колебания C=O вторичного амида, полоса амид I), полоса 1530 $см^{-1}$ (деформационные колебания N—H вторичного амида, полоса амид II), полосы 1608 $см^{-1}$ и 1400 $см^{-1}$ (антисимметричные и симметричные колебания карбоксилатных групп), интенсивные полосы в области 1070–

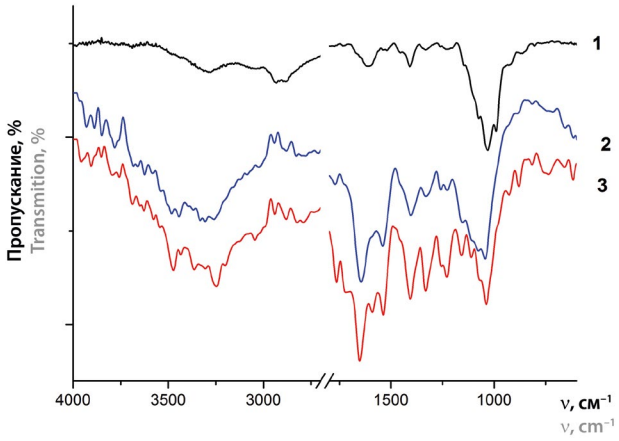


Рисунок 1. Инфракрасные спектры водной (1), солевой (2) и щелочной (3) фракций экстракта *F. velutipes*

Figure 1. Infrared spectra of water-soluble fraction (1), salt fraction (2) and alkali fraction (3) from extract of *F. velutipes*

990 см$^{-1}$ (скелетные колебания С—О—Н глюкопиранозного кольца). С учетом относительной интенсивности полос поглощения можно предположить, что в водной фракции основными компонентами являются полисахариды с небольшими примесями белков и/или пептидов.

В ИК-спектре солевой фракции (рисунок 1, кривая 2) имеются те же полосы поглощения, что и в водной фракции, однако относительная интенсивность полисахаридных полос (3500–3200 см$^{-1}$, 1100–1040 см$^{-1}$) существенно ниже полос вторичных амидов (3285, 1640, 1535 см$^{-1}$). То есть в солевой фракции мажорным компонентом являются белки, а полисахариды – минорным.

В ИК-спектре щелочной фракции (рисунок 1, кривая 3), кроме уже описанных полос полисахаридов и белков, наблюдаются достаточно интенсивные полосы поглощения в области 1760–1700 см$^{-1}$, которые можно отнести к валентным колебаниям С=О кетонов и хинонов в структуре меланина. Относительная интенсивность полос поглощения в ИК-спектре говорит о том, что основными компонентами этой фракции являются меланины и белки, а примесными – полисахариды. Отсутствие полос поглощения меланина в водной и солевой фракциях говорит об эффективной очистке этих фракций от меланина с использованием сорбента ДЭАЭЦ.

Для ряда полисахаридов и веществ белковой природы, содержащихся в растительном сырье, известны антикоагулянтное и антитромботическое действие, фибринолитическая активность [20–22], что позволило нам предположить наличие влияния на свертывающую систему крови человека изучаемых водных экстрактов грибов.

Свертывание крови и фибринолиз являются многоступенчатыми процессами [1–3]. В ходе исследования *in vitro* оценивали влияние экстрактов на ряд параметров, характеризующих процесс фибринолиза (рисунок 2): активацию плазминогена, активность альфа-2-антиплазмина, фибринолитическую активность плазмы крови (XIIa-зависимый фибринолиз) и концентрацию фибриногена.

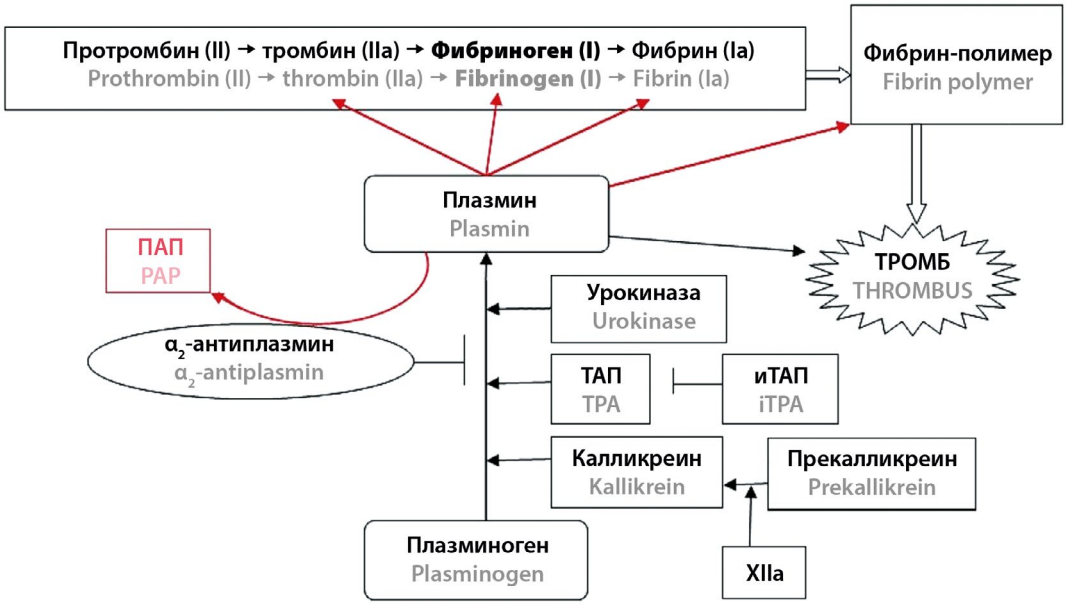


Рисунок 2. Фрагмент схемы свертывания крови с активацией системы фибринолиза [23]:

ТАП – тканевый активатор плазминогена; иТАП – ингибитор тканевого активатора плазминогена; ПАП – плазмин-антиплазминовый комплекс

Figure 2. Part of the blood coagulation scheme with activation of the fibrinolysis system [23]:

tPA – tissue plasminogen activator; iTAP – tissue plasminogen activator inhibitor; PAP – plasmin-antiplasmin complex

В ходе первичного скринингового анализа оценивали биологическую активность суммарных водных экстрактов из шляпок и ножек ксилотрофных грибов. Затем были проанализированы фракции, выделенные из водных экстрактов, оказавших влияние на параметры фибринолиза.

На основании результатов анализа было установлено влияние на различные стадии фибринолиза водных экстрактов из грибов следующих видов (таблица 1, рисунок 3):

1) шиитаке;
2) чешуйчатки обыкновенной;
3) опят зимних;
4) опят летних;
5) лентинеллуса уховидного.

Водные экстракты из остальных видов грибов: опят луковичноногих, опят северных, опят сероластинчатых, – не оказывали *in vitro* влияния на указанные параметры фибринолиза ни в одной из исследованных концентраций (0,16–1000 мкг/мл).

Необходимо отметить, что не было найдено значительных различий по характеру влияния на параметры фибринолиза между экстрактами, полученными из шляпок и ножек исследуемых видов грибов.

Для экстрактов из грибов шиитаке и чешуйчатки характерно «куполообразное» изменение активности α2-антиплазмина в зависимости от их концентрации (рисунок 3), причем экстракт из грибов шиитаке является наиболее эффективным ингибитором этого фермента системы фибринолиза из исследованных типов грибов (см. таблица 1).

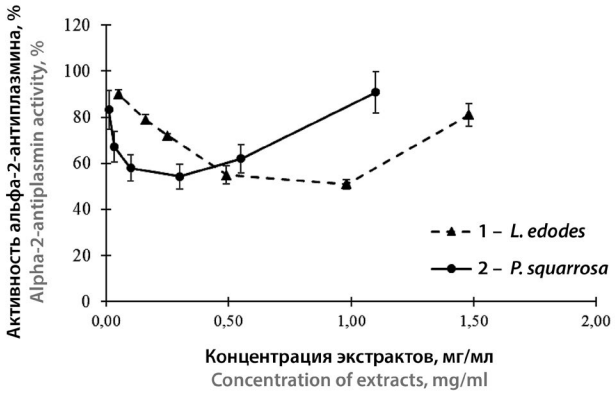


Рисунок 3. Влияние суммарных водных экстрактов из *L. edodes* и *P. squarrosa* на активность альфа-2-антиплазмина (M ± SD, *n* = 3)

Figure 3. The inhibitory effects of mushroom extracts from *L. edodes* and *P. squarrosa*) on the alpha-2-antiplasmin activity (M ± SD, *n* = 3)

Компоненты водных экстрактов грибов шиитаке, чешуйчатки и зимних опят *in vitro* в диапазоне концентраций 0,05–100 мкг/мл не вызывают изменения таких параметров гемостаза, как АЧТВ и ПВ,

Таблица 1. Результаты оценки влияния водных экстрактов изучаемых видов грибов на параметры фибринолиза

Table 1. Effects of water extracts from researched types of mushrooms on fibrinolysis parameters

Вид грибов Types of mushrooms	**Характер действия на параметры фибринолиза** Effects on fibrinolysis parameters		
	Активация плазминогена, % Plasminogen activation, %	**Активность α2-антиплазмина, %** α2-Antiplasmin activity, %	**Концентрация фибриногена, г/л** Concentration of the fibrinogen, g/l
L. edodes	Активация на 20–47 % (*C* = 0,16–100 мкг/мл) Activation by 20–47 % at *C* = 0,16–100 μg/ml	Ингибирование на 21–49 % (*C* = 0,05–0,98 мкг/мл) Activity inhibition by 21–49 % at C = 0,05–0,98 μg/ml	Снижение концентрации на 17–82 % (*C* = 0,16–10,0 мкг/мл) The decrease of the concentration by 17–82 % at *C* = 0,16–10,0 μg/ml
P. sqarrosa	Активация на 20–35 % (*C* = 0,80–100 мкг/мл) Activation by 20–35 % at *C* = 0,80–100 μg/ml	Ингибирование на 20–42 % (*C* = 0,3–3,0 мкг/мл) Activity inhibition by 20–42 % at C = 0.3–3.0 μg/ml	Влияние отсутствует No effects
F. velutipes	Влияние отсутствует No effects	Ингибирование на 25–50 % (*C* = 0,80–20 мкг/мл) Activity inhibition by 25–50 % at *C* = 0,80–20 μg/ml	Снижение концентрации на 20–50 % (*C* = 0,80–20,0 мкг/мл) The decrease of the concentration by 20–50 % at *C* = 0,16–10,0 μg/ml
K. mutabilis	Активация на 19–37 % (*C* = 0,15–4,1 мкг/мл) Activation by 19–37% at *C* = 0,15–4,1 μg/ml	Влияние отсутствует No effects	Снижение концентрации на 10–52 % (*C* = 0,40–4,9 мкг/мл) The decrease of the concentration by 10–52 % at *C* = 0,4–4,9 μg/ml
L. cochleatus	Активация на 14–27 % (*C* = 0,06–0,15 мкг/мл) Activation by 14–27 % at *C* = 0,06–0,15 μg/ml	Повышение активности на 13–32 % (*C* = 4,0–20,0 мкг/мл) The increase of enzyme activities by 13–32 % at *C* = 4,0–20 μg/ml	Снижение концентрации на 15–61 % (*C* = 0,12–15 мкг/мл) The decrease of the concentration by 15–61 % at *C* = 0,12–15.0 μg/ml

Примечание. *C* – концентрация экстрактов в модельной смеси, мкг/мл.

Note. *C* – the concentration of water extract, μg/ml.

т. е. не оказывают влияния на внешний и внутренний пути свертывания крови.

На основании литературных данных необходимо отметить, что исследования, посвященные фибринолитической и тромболитической активности экстрактов из плодовых тел грибов, были направлены в первую очередь на выделение и характеристику водорастворимых белковых комплексов, содержащих различные протеолитические ферменты [5–8]. Тогда как роль полисахаридных комплексов грибов как антикоагулянтов и антиагрегантов изучена в меньшей степени. Содержание белков в экстрактах, определенное биуретовым методом, составляет в среднем 18–25 %. Выявленная биологическая активность может быть обусловлена не только наличием ферментов, но и действием полисахаридов.

По итогам первого этапа работы для дальнейшего изучения были выбраны 4 вида фракций, полученные из экстрактов 5 видов грибов: шиитаке, чешуйчатки обыкновенной, зимних и летних опят.

Плазминоген-активаторные свойства фракций, выделенных из водных экстрактов грибов

При участии плазмина, основного белка системы фибринолиза, образующегося из предшественника плазминогена под действием активаторов, расщепляющих пептидную связь Арг561 – Вал562, происходит гидролиз нитей фибрина [24, 25]. Кроме лизиса сгустков, плазминоген участвует в заживлении повреждений тканей и слизистых оболочек.

Активирующее влияние на плазминоген проявляют компоненты водных фракций из экстрактов шиитаке и шляпок чешуйчатки обыкновенной (рисунок 4, таблица 2).

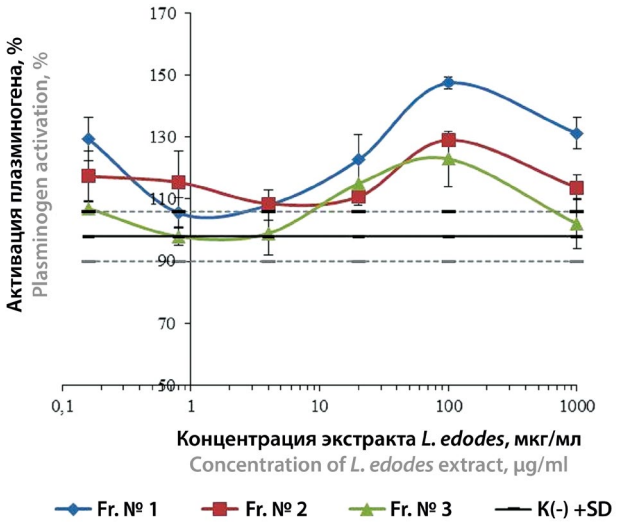


Рисунок 4. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов шиитаке (*L. edodes*), на активацию плазминогена (M ± SD, %, *n* = 3)

Figure 4. Effects of fractions from the water extract of *L. edodes* on plasminogen activation (M ± SD, %, *n* = 3)

Фракции, выделенные из водных экстрактов шляпок и ножек опят летних и зимних, не оказывают статистически значимого влияния на активацию плазминогена ($p > 0,05$, критерий Стьюдента; данные не приводятся).

Фракция № 1, выделенная из водного экстракта шиитаке (*L. edodes*), проявляет *in vitro* плазминоген-активаторные свойства и статистически значимо повышает активность плазминогена в модельной смеси с плазмой крови на 23–47 % ($p < 0,05$, критерий Стьюдента) в диапазоне концентраций 20–1000 мкг/мл (рисунок 4). Фракции № 2 и № 3 из этого вида гриба

Таблица 2. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов чешуйчатки обыкновенной (*Ph. squarrosa*), на активацию плазминогена (M ± SD, %, *n* = 3)

Table 2. Effects of fractions from the water extract of *Ph. Squarrosa* on plasminogen activation (M ± SD, %, *n* = 3)

Концентрация,мкг/мл Concentration, μg/ml	Активация плазминогена, % Plasminogen activation, %					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр. № 1 Fr. № 1	СФр. № 2 Fr. № 2	ЩФр. № 3 Fr. № 3	ВФр. № 1 Fr. № 1	СФр. № 2 Fr. № 2	ЩФр. № 3 Fr. № 3
100	194 ± 24#	123 ± 1	105 ± 1	124 ± 4#	129 ± 2#	90 ± 2#
20,0	166 ± 6#	126 ± 3#	94 ± 9	118 ± 4	121 ± 2#	100 ± 2
4,0	124 ± 7	120 ± 1	105 ± 4	126 ± 3#	136 ± 1#	101 ± 3
0,80	122 ± 3	125 ± 2#	94 ± 3	118 ± 4	128 ± 2#	100 ± 3
0,16	131 ± 2	120 ± 1	108 ± 4	123 ± 5	131 ± 2#	96 ± 2
0,05	71 ± 2#	70 ± 2#	103 ± 2	67 ± 4#	66 ± 3#	111 ± 2
0,00	115 ± 4	115 ± 4	99 ± 4	115 ± 4	99 ± 4	99 ± 4

Примечание. # Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (значения вероятности, соответствующие парному критерию Стьюдента, с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Note. # Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

приводят к активации плазминогена на 25–30 % только при действии растворов достаточно высокой концентрации – более 100 мкг/мл.

Концентрационно зависимое плазминоген-активирующее действие оказывают растворы фракции № 1, выделенной из шляпок чешуйчатки (20–100 мкг/мл) (см. таблица 2). Необходимо отметить, что при тестировании растворов водной (№ 1) и солевой (№ 2) фракций, выделенных из шляпок и ножек, этого вида грибов концентрацией 0,05 мкг/мл наблюдали статистически значимое снижение активации плазминогена в 1,5–1,7 раз. Фракции № 3 из ножек и шляпок этого вида гриба не оказывают влияния на активацию этого профермента.

Таким образом, плазминоген-активирующие свойства проявили водная и солевая фракции из экстрактов шиитаке и чешуйчатки.

Влияние водных экстрактов грибов на активность альфа-2-антиплазмина

Альфа-2-антиплазмин, являющийся основным ингибитором плазмина в организме, характеризуется следующими свойствами: быстрым ингибированием активности плазмина; затруднением присоединения плазминогена к фибрину; образованием перекрестных связей с альфа-цепями фибрина во время фибринообразования, что резко замедляет фибринолиз [2, 27]. Инактивация альфа-2-антиплазмина приводит к увеличению скорости фибринолиза.

На основании полученных данных (рисунок 5) необходимо отметить, что растворы фракций № 1 и № 2 из грибов шиитаке в диапазоне концентраций 4,0–20 мкг/мл статистически значимо повышают активность альфа-2-антиплазмина на 25–30 % по сравнению с растворами отрицательного контроля ($p < 0,05$, критерий Стьюдента). Фракция № 3 не оказывает влияния на этот показатель.

Фракции № 1–3, выделенные из шляпок водных экстрактов опят зимних (рисунок 6), ингибируют активность альфа-2-антиплазмина. В наибольшей степени (до 51,4 %) ингибирует активность этого фермента фракция № 3, выделенная из шляпок опят зимних: статистически значимое ингибирование активности фермента (критерий Стьюдента, $p < 0,05$) получено для диапазона концентраций 0,16–100 мкг/мл.

Интересно отметить тот факт, что фракции, полученные из ножек и шляпок опят зимних, оказывают разнонаправленный эффект на активность альфа-2-антиплазмина: водные экстракты из шляпок *in vitro* ингибируют активность этого фермента, а фракции № 1–3 из ножек (0,8–0,16 мкг/мл), наоборот, приводят к увеличению его активности. Получены зависимости куполообразной формы (см. рисунок 6).

Полученные эффекты для экстрактов грибов можно сопоставить с действием тканевого активатора

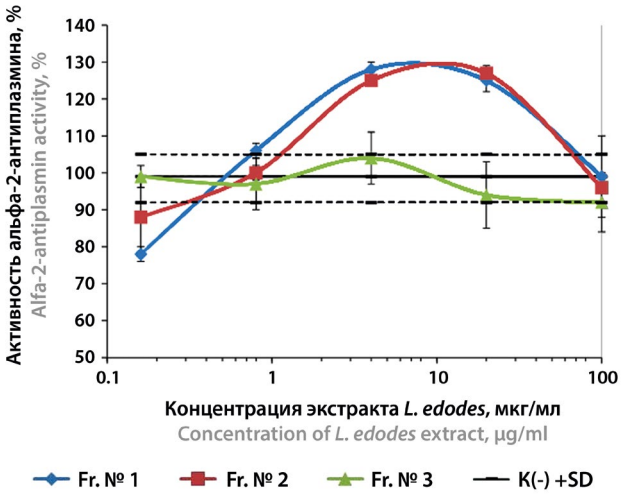


Рисунок 5. Влияние фракций, выделенных из водного экстракта шиитаке (*L. edodes*), на активность альфа-2-антиплазмина (M ± SD, %, *n* = 3)

Figure 5. Effects of fractions from the water extract of *L. edodes* on alfa-2-antiplasmin activity (M ± SD, %, *n* = 3)

плазминогена – тенектеплазы. Тенектеплаза, являющаяся активным действующим веществом препарата Метализе® (Metalyse®, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, 10 000 ЕД (50 мг), «Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ», Германия, серия 010220, срок годности до 10.2021), при тестировании *in vitro* оказывает плазминоген- и альфа-2-антиплазмин-активирующие свойства. Полученные *in vitro* зависимости изменения активности параметров фибринолиза от концентрации тестируемого препарата имеют куполообразный характер (рисунок 7). При этом *in vivo* после введения под действием снижается уровень плазминогена, фибриногена и увеличивается потребление альфа-2-антиплазмина [28].

Диапазон концентраций, для которого отмечено *in vitro* проявление биологического действия для водных экстрактов грибов и выделенных из них фракций, в целом сопоставим с тенектеплазой, хотя является менее выраженным.

Фракции, выделенные из водных экстрактов шляпок и ножек опят летних, как и суммарные экстракты, не влияют на активность альфа-2-антиплазмина. Необходимо отметить, что в отличие от суммарного водного экстракта чещуйчатки (см. таблица 1) выделенные из него фракции не оказали влияния на активность альфа-2-антиплазмина: полученные значения активности этого фермента для проб с тестируемыми объектами не имеют статистических отличий от значений отрицательного контроля (критерий Стьюдента, $p > 0,05$; данные не приводятся).

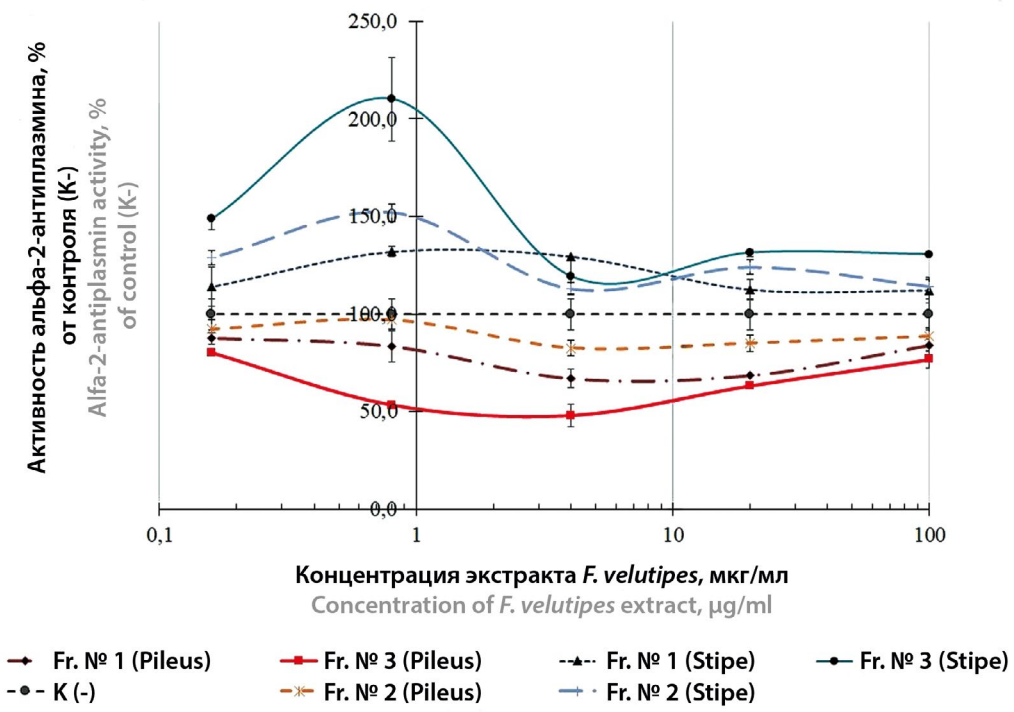


Рисунок 6. **Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов опят зимних на активность альфа-2-антилазмина (M ± SD, %, *n* = 3):**

1 – условное обозначение проб включает обозначение части плодового тела гриба (pileus – «шляпка», stipe – «ножка») и номер фракции (Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3); 2 – K (-) – отрицательный контроль; 3 – на оси ординат приведена относительная активность альфа-2-антиплазмина, % от отрицательного контроля

Figure 6. **Effects of fractions from water extract of F. velutipes (Curtis) Signer on alfa-2-antiplasmin activity (M ± SD, %, *n* = 3):**

1 – the designation of the samples includes the fraction number (Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3), the part of the mushroom (Pileus, Stipe); 2 – K (-) – negative control; 3 – on the ordinate axis the relative activity of alpha-2-antylasmin, % of the negative control is given

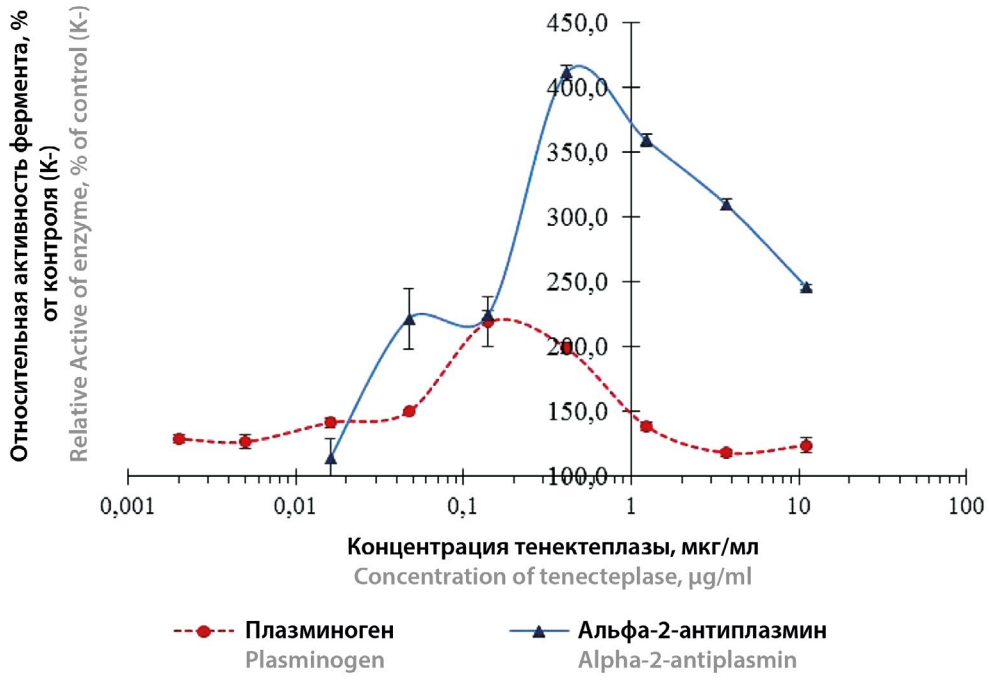


Рисунок 7. **Влияние тенектеплазы (мгк/мл) на активность альфа-2-антиплазмина и активацию плазминогена (M ± SD, *n* = 3)**

Figure 7. **Effect of tenecteplase (µg/ml) on alpha-2-antiplasmin activity and plasminogen activation (M ± SD, *n* = 3)**

Таким образом, из всех изученных экстрактов грибов на активность альфа-2-антиплазмина статистически значимое влияние оказывают фракции, выделенные из экстрактов грибов шиитаке и опят зимних.

Оценка влияния тестируемых объектов на концентрацию фибриногена

Фибриноген, циркулирующий в кровотоке, является единственным субстратом для образования фибринового сгустка крови (тромба) [1–3]. В *in vitro* исследованиях снижение концентрации этого белка в модельных смесях с плазмой крови и, соответственно, увеличение времени формирования сгустка может быть связано не только с фибринолитическими свойствам тестируемых соединений, но и антитромботическим действием, обусловленным предположительно свойствами полисахаридов.

Компоненты водной фракции № 1 из грибов шиитаке *in vitro* оказывают незначительное влияние на время формирования фибринового сгустка и снижают концентрацию фибриногена в плазме крови только на 12–20 % в диапазоне концентраций 4–100 мкг/мл (таблица 3). Более выраженное действие на данный параметр оказывают солевая (№ 2) и щелочная (№ 3) фракции, выделенные из шляпок опят летних, в диапазоне концентраций 0,8–100 мкг/мл: статистически значимо снижают концентрацию фибриногена в плазме крови, следовательно, увеличивают время образования фибринового сгустка в среднем на 30–45 % (таблица 4).

Фракции, выделенные из водных экстрактов чешуйчайтки обыкновенной и опят зимних, не оказывают статистически значимого влияния на концентрацию фибрининогена в плазме крови и не вызывают изменения времени образования сгустка фибрина (данные не приводятся).

Таблица 3. Влияние фракций, выделенных из водного экстракта шиитаке (*L. edodes*), на концентрацию фибриногена в плазме крови *in vitro*, г/л (M ± SD)

Table 3. Effects of fractions from the water extract of *L. edodes* on the concentration of fibrinogen in blood plasma *in vitro*, g/l (M ± SD)

Концентрация экстрактов, мкг/мл Concentration, μg/ml	Концентрация фибриногена, г/л The concentration of fibrinogen, g/l		
	ВФр № 1 (*n* = 4) Fr. № 1 (*n* = 4)	СФр № 2 (*n* = 2) Fr. № 2 (*n* = 2)	ЩФр № 3 (*n* = 2) Fr. № 3 (*n* = 2)
100	1,83 ± 0,03#	1,72 ± 0,02#	1,93 ± 0,08
20	1,78 ± 0,06#	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,3
4,0	1,94 ± 0,06#	1,9 ± 0,2	2,15 ± 0,08
0,8	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,0 ± 0,1
0,16	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,3	1,96 ± 0,06
0,00	2,2 ± 0,07		

Примечание. # Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Note. # Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

Оценка влияния тестируемых объектов на фибринолитическую активность плазмы крови человека (время полного лизиса эуглобулиновой фракции)

Тест эуглобулинового времени лизиса сгустка (XIIa-зависимый фибринолиз) оценивает способность системы лизировать сгусток, получаемый из эуглобулиновой фракции плазмы крови при добавлении к ней раствора хлорида кальция. С помощью данного теста можно оценить общее изменение активности системы лизиса без детализации механизма этого влияния, так как получаемый в ходе реакции эугло-

Таблица 4. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов опят летних (*K. mutábilis*), на концентрацию фибриногена в плазме крови *in vitro*, г/л (M ± SD, *n* = 4)

Table 4. Effects of fractions from the water extract of *K. mutábilis* on the concentration of fibrinogen in blood plasma *in vitro*, g/l (M ± SD, *n* = 4)

Концентрация, мкг/мл Concentration, μg/ml	Концентрация фибриногена, г/л The concentration of fibrinogen, g/l					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ЩФр № 3 Fr. № 3	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ЩФр № 3 Fr. № 3
100	1,92 ± 0,1	1,0 ± 0,2#	0,90 ± 0,01#	1,41 ± 0,07	1,52 ± 0,14	1,48 ± 0,02
20	1,66 ± 0,01	1,17 ± 0,03#	1,0 ± 0,2	1,37 ± 0,02#	1,41 ± 0,06	1,51 ± 0,00
4,0	1,92 ± 0,00	1,2 ± 0,1	0,90 ± 0,01#	1,36 ± 0,06#	1,7 ± 0,3	1,41 ± 0,00
0,8	1,85 ± 0,14	1,14 ± 0,01#	1,39 ± 0,02#	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1
0,16	1,85 ± 0,04	1,51 ± 0,02	1,51 ± 0,01	…	1,56 ± 0,04	1,41 ± 0,06
0,00	1,66 ± 0,05					

Примечание. # Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$); «…» – анализ не проводили.

Note. # Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$); «…» – analysis has not been done.

булиновый сгусток не содержит ингибиторов фибринолиза [1, 29].

Фибринолитическая активность плазмы крови человека с нормальными параметрами гемостаза составила 8,7 ± 0,6 мин, для плазмы крови со сниженными параметрами гемостаза – 11,9 ± 0,9 мин, что соответствует допустимым значениям для контрольных плазм в соответствии с паспортом к набору (7,0 ± 2,0 мин и 10,0 ± 2,0 мин соответственно).

Добавки испытуемых растворов фракций, выделенных из грибов шиитаке, вызывают концентрационно зависимое повышение фибринолитической активности плазмы крови и статистически значимо снижают время полного лизиса эуглобулинового сгустка в 2–2,8 раза: фракция № 1 в диапазоне концентраций 0,5–5,0 мкг/мл, фракции № 2 и № 3 – 0,004–5,0 мг/мл (таблица 5).

Водные фракции № 1, выделенные из шляпок и ножек грибов чешуйчатки обыкновенной, а также солевая фракция № 2 из шляпок этого вида грибов не оказывают влияния на изучаемый показатель (таблица 6). Для растворов фракции № 3 из шляпок с концентрациями 0,02–5,0 мг/мл отмечено небольшое снижение времени лизиса эуглобулинового сгустка на 13–24 %. Солевая (№ 2) и щелочная (№ 3) фракции, выделенные из ножек грибов чешуйчатки обыкновенной, в диапазоне концентраций 0,02–5,0 мг/мл вызывают повышение фибринолитической активности плазмы, вызывая дозозависимое снижение времени полного лизиса эуглобулинового сгустка в среднем на 15–34 %, однако в меньшей степени, чем экстракты из грибов шиитаке.

Наиболее выраженным фибринолитическим действием обладают солевая и щелочная фракции, выделенные из опят зимних и опят летних (таблицы 7, 8).

Таблица 5. Влияние фракций, выделенных из водного экстракта шиитаке (*L. edodes*), на фибринолитическую активность плазмы крови (M ± SD, мин, *n* = 3)

Table 5. Effects of fractions from the water extract of *L. edodes* on the fibrinolytic activity of blood plasma (M ± SD, min, *n* = 3)

Концентрация, кг/мл* Concentration, μg/ml*	Время полного лизиса эуглобулинового сгустка, мин Euglobulin clot lysis time, min		
	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ЩФр № 3 Fr. № 3
5000	4,6 ± 0,4#	3,4 ± 0,3#	3,2 ± 0,4#
1250	5,1 ± 0,1#	4,4 ± 0,4#	3,6 ± 0,4#
500	5,5 ± 0,4#	4,2 ± 0,3#	4,4 ± 0,4#
100	7,1 ± 0,5	5,5 ± 0,3#	7,4 ± 0,4
20,0	8,5 ± 0,3	6,5 ± 0,3#	7,7 ± 0,4
4,00	8,7 ± 0,5	6,6 ± 0,2#	7,9 ± 0,4
0,80	8,8 ± 0,2	8,1 ± 0,2	8,3 ± 0,8
0,00	8,8 ± 0,3		

Примечания. 1. * Здесь и далее концентрация тестируемых объектов приведена с учетом разбавления проб в реакционной смеси (*k* = 2).

2. # Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Notes. 1. * Hereinafter, the concentration of the tested objects is given taking into account the dilution in the reaction mixture by 2 times.

2. # Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

Фракции № 2 и № 3, выделенные из шляпок опят зимних, и фракция № 3, выделенная из ножек этого вида грибов, статистически значимо снижают время лизиса эуглобулинового сгустка в широком диапазоне концентраций 0,004–5,0 мг/мл на 15–40 %.

Фракции № 2 и № 3, выделенные из водных экстрактов шляпок и ножек опят летних, проявляют выраженное фибринолитическое действие в широком

Таблица 6. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов чешуйчатки обыкновенной (*Ph. squarrosa*), на фибринолитическую активность плазмы крови (M ± SD, мин, *n* = 3)

Table 6. Effects of fractions from the water extract of *Ph. squarrosa* on the fibrinolytic activity of blood plasma (M ± SD, min, *n* = 3)

Концентрация, мг/мл Concentration, μg/ml	Время полного лизиса эуглобулинового сгустка, мин Euglobulin clot lysis time, min					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2
5000	7,5 ± 0,4	7,4 ± 0,3	6,4 ± 0,5#	7,3 ± 0,3	5,9 ± 0,4#	5,6 ± 0,3#
1250	8,2 ± 0,0	7,9 ± 0,4	6,8 ± 0,2#	7,5 ± 0,1	6,2 ± 0,7#	6,2 ± 0,6#
500	8,0 ± 0,3	8,1 ± 0,5	7,3 ± 0,2#	7,4 ± 0,5	6,8 ± 0,7#	6,6 ± 0,5#
100	8,8 ± 0,3	7,7 ± 0,4	7,3 ± 0,4	7,7 ± 0,2	7,1 ± 0,3#	7,2 ± 0,2#
20,0	8,5 ± 0,0	8,3 ± 0,4	8,4 ± 0,3	8,2 ± 0,4	7,4 ± 0,2	7,6 ± 0,3
4,00	9,0 ± 0,2	8,8 ± 0,3	8,3 ± 0,6	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,3	8,2 ± 0,7
0,0	8,4 ± 0,5					

Примечание. # Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0.05$).

Note. # Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0.05$).

Таблица 7. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов опят зимних (*F. velutipes*), на фибринолитическую активность плазмы крови (M ± SD, мин)

Table 7. Effects of fractions from the water extract of *F. velutipes* on the fibrinolytic activity of blood plasma (M ± SD, min)

Концентрация, мг/мл Concentration, μg/ml	Время полного лизиса эуглобулинового сгустка, мин Euglobulin clot lysis time, min					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр № 1 (*n* = 2) Fr. № 1 (*n* = 2)	СФр № 2 (*n* = 3) Fr. № 2 (*n* = 3)	ЩФр № 3 (*n* = 3) Fr. № 3 (*n* = 3)	ВФр № 1 (*n* = 2) Fr. № 1 (*n* = 2)	СФр № 2 (*n* = 3) Fr. № 2 (*n* = 3)	ЩФр № 3 (*n* = 3) Fr. № 3 (*n* = 3)
5000	8,5 ± 0,1	5,2 ± 0,4#	…	8,6 ± 0,2	7,3 ± 0,3#	5,9 ± 0,1#
500	8,2 ± 0,2	6,0 ± 0,2#	5,7 ± 0,3#	8,4 ± 0,5	8,3 ± 0,2	6,4 ± 0,2#
100	7,9 ± 0,1	6,7 ± 0,2#	6,4 ± 0,6#	8,8 ± 0,5	8,3 ± 0,3	6,5 ± 0,3#
20,0	8,0 ± 0,2	7,3 ± 0,3#	7,3 ± 0,5#	9,1 ± 0,1	8,2 ± 0,5	6,6 ± 0,4#
4,00	8,0 ± 0,3	7,2 ± 0,1#	7,6 ± 0,6#	9,1 ± 0,5	7,9 ± 0,5	7,0 ± 0,5#
0,80	8,6 ± 0,6	8,1 ± 0,3	8,2 ± 0,4	8,8 ± 0,3	8,5 ± 0,2	7,8 ± 0,4
0,0	8,8 ± 0,4					

Примечания. 1. # Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением, $p < 0,05$).

2) «…» – анализ не проводили.

Notes. 1. # Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

2. «…» – analysis has not been done.

Таблица 8. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов опят летних (*K. mutábilis*), на фибринолитическую активность плазмы крови (M ± SD, мин)

Table 8. Effects of fractions from the water extract of *K. mutábilis* on the fibrinolytic activity of blood plasma (M ± SD, min)

Концентрация, мг/мл Concentration, μg/ml	Время полного лизиса эуглобулиновой фракции, мин Euglobulin clot lysis time, min					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр № 1 (*n* = 2) Fr. № 1 (*n* = 2)	СФр № 2 (*n* = 3) Fr. № 2 (*n* = 3)	ЩФр № 3 (*n* = 3) Fr. № 3 (*n* = 3)	ВФр № 1 (*n* = 3) Fr. № 1 (*n* = 3)	СФр № 2 (*n* = 3) Fr. № 2 (*n* = 3)	ЩФр № 3 (*n* = 3) Fr. № 3 (*n* = 3)
5000	7,1 ± 0,2#	3,6 ± 0,4#	4,5 ± 0,4#	7,9 ± 0,3	5,6 ± 0,1#	4,4 ± 0,3#
500	7,8 ± 0,4	3,5 ± 0,5#	4,4 ± 0,5#	7,5 ± 0,3#	4,2 ± 0,3#	5,0 ± 0,7#
100	8,1 ± 0,3	2,4 ± 0,3#	4,9 ± 0,7#	6,5 ± 0,4#	5,0 ± 0,5#	5,4 ± 0,8#
20,0	9,3 ± 0,3	2,9 ± 0,3#	6,8 ± 0,7#	6,3 ± 0,3#	6,4 ± 0,2#	6,4 ± 0,2#
4,00	9,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1#	7,1 ± 0,4#	6,5 ± 0,2#	6,3 ± 0,3#	6,3 ± 0,2#
0,08	8,7 ± 0,2	7,6 ± 0,6	8,2 ± 0,8	7,4 ± 0,5	8,1 ± 0,7	8,6 ± 0,6
0,0	8,4 ± 0,6					

Примечание. # Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Note. # Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

диапазоне концентраций 0,004–5,0 мг/мл, дозозависимо снижая время лизиса эуглобулинового сгустка на 25–50 %.

Водные экстракты из шляпок и ножек лентинеллуса уховидого, опят луковичноногих, северных и серопластинчатых не оказывают влияния на фибринолитическую активность плазмы крови: время лизиса эуглобулиновых сгустков при действии испытуемых растворов этих экстрактов не имеет статистически значимых отличий от растворов отрицательного контроля.

При сопоставлении полученных эффектов для различных фракций (таблица 9) необходимо отметить, что выраженное влияние на активность плазминогена и альфа-2-антиплазмина *in vitro* оказывают полисахаридные компоненты, содержащиеся преимущественно в водной фракции № 1 и частично в солевой фракции № 2, за исключением этих фракций, выделенных из *K. mutábilis*, при этом водная фракция практически не проявляет фибринолитического действия и не влияет на время лизиса эуглобулинового сгустка и концентрацию фибриногена в отличие от фракций № 2 и № 3, содержащих белки. Фракции № 2 и № 3, выделенные из 4 видов грибов, проявляют выраженную фибринолитическую активность и снижают время полного лизиса эуглобулинового сгустка и концентрацию фибриногена (фракции из *K. mutábilis*), что может быть обусловлено действием ряда протеолитически активных белков (ферментов), присутствующих в составе этих фракций.

Таблица 9. **Сводные данные оценки влияния фракций, выделенных из экстрактов изучаемых видов грибов на параметры фибринолиза**

Table 9. **The summary data on the effect of fractions isolated from water extracts of the mushrooms on Fibrinolysis Parameters**

Вид гриба Types of mushrooms	**Фракции** Fraction	**Характер действия на параметры фибринолиза** Effects on fibrinolysis parameters			
		Активация плазминогена, % Plasminogen activation, %	**Активность альфа-2-антиплазмина, %** Alfa-2-antiplasmin activity, %	**Фибриноген** Concentration of the fibrinogen	**Фибрино-литическая активность** Fibrinolytic activity
L. edodes	№ 1 Водная Water-soluble Fr. № 1	↑ на 25–50 % (*C* = 20–1000) ↑ by 25–50 % (*C* = 20–1000)	↑ на 25–28 % (*C* = 4,0–20) ↑ by 25–28 % (*C* = 4.0–20)	Незначительное влияние Slight effect	↑ на 37–47 % (*C* = 500–5000) ↑ by 37–47 % (*C* = 500–5000)
	№ 2 Солевая Salt Fr. № 2	↑ на 16–32 % (*C* = 100–1000) ↑ by 16–32 % (*C* = 100–1000)	↑ на 25–27 % (*C* = 20–1000) ↑ by 25–27 % (*C* = 20–1000)	Нет влияния No effects	↑ на 25–61 % (*C* = 4,0–5000) ↑ by 25–61 % (*C* = 4,0–5000)
	№ 3 Щелочная Alkali Fr. № 3	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects		↑ на 16–64 % (*C* = 100–5000) ↑ by 16–64 % (*C* = 100–5000)
P. squarrosa	№ 1 Водная Water-soluble Fr. № 1	↑ на 39–76 % (*C* = 20–100, шляпки, Pileus) ↑ by 39–76 % (*C* = 20–100, caps, Pileus)	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects
	№ 2 Солевая Salt Fr. № 2	↑ на 21–36 % (*C* = 0,16–100, ножки, Stipes) ↑ by 21–36 % (*C* = 0.16–100, legs, Stipes)			↑ на 15–30 % (*C* = 100–5000, ножки, Stipes) ↑ by 15–30 % (*C* = 100–5000, legs, Stipes)
	№ 3 Щелочная № 3 Alkali	Влияние отсутствует No effects			↑ на 14–36 % (*C* = 100–5000, ножки, Stipes) ↑ by 14–36 % (*C* = 100–5000, legs, Stipes)
F. velutipes	Водная (№ 1) Water-soluble Fr. № 1	Нет влияния No effects	↓ на 16–33 % (*C* = 0,8–100, шляпки, Pileus); ↑ на 15–32 % (*C* = 0,8–4,0, ножки, Stipes) ↓ by 16–33 % (*C* = 0.8–100, caps, Pileus); ↑ by 15–32 % (*C*=0.8–4.0, legs, Stipes)	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects
	Солевая (№ 2) Salt Fr. № 2		↑ до 52 % (*C* = 0,16–0,8, ножки, Stipes) ↑ up to 52 % (*C* = 0.16–0.8, legs, Stipes)		↑ на 15–40 % (*C* = 4,0–5000, шляпки, Pileus) ↑ by 15–40 % (*C* = 4,0–5000, caps, Pileus)
	Щелочная (№ 3) Alkali Fr. № 3		↓ на 20–52 % (*C* = 0,16–100, шляпки, Pileus); ↑ на 150–210 % (*C* = 0,16–0,8, ножки, Stipes) ↓ by 20–52 % (*C* = 0.16–100, caps, Pileus); ↑ by 150–210 % (*C* = 0.16–0.8, legs, Stipes)		↑ на 15–40 % (*C* = 20–5000, шляпки, ножки, Pileus, Stipes) ↑ by 15–40 % (*C* = 20–5000, caps, legs, Pileus, Stipes)
K. mutábilis	Водная (№ 1) Water-soluble Fr. № 1	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects	Незначительное влияние Slight effect
	Солевая (№ 2) Salt Fr. № 2			↓ до 40 % (*C* = 0,16–100, шляпки Pileus) ↓ up to 40 % (*C* = 0.16–100, Pileus hats)	↑ до 70 % (*C* = 4,0–5000 шляпки, ножки, Pileus, Stipes) ↑ up to 70 % (*C* = 4.0–5000 caps, legs, Pileus, Stipes)
	Щелочная (№ 3) Alkali Fr. № 3			↓ до 40 % (*C* = 0,16–100, шляпки, Pileus) ↓ up to 40 % (*C* = 0.16–100, caps, Pileus)	↑ до 46 % (*C* = 4,0–5000 шляпки, ножки, Pileus, Stipes) ↑ up to 46 % (*C* = 4.0–5000 caps, legs, Pileus, Stipes)

Примечание. Условные обозначения: ↑ – увеличение активности; ↓ – ингибирование активности, снижение концентрации; *C* – концентрация испытуемых растворов тестируемых объектов, мкг/мл.

Note. Symbols: ↑ – increase in activity; ↓ – inhibition of activity, decrease in concentration; *C* – concentration of test solutions of test objects, μg/m.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения исследования *in vitro* была изучена потенциальная антитромботическая и фибринолитическая активность водных экстрактов грибов:

1) шиитаке (*L. edodes*);
2) чешуйчатки обыкновенной (*Ph. squarrosa*);
3) опенка зимнего (*F. velutipes*);
4) опенка летнего (*K. mutabilis*);
5) лентинеллуса уховидного (*L. cochleatus*);
6) опенка луковичноногого (*A. cepistipes*);
7) опенка северного (*A. borealis*);
8) опенка серопластинчатого (*H. capnoides*).

Влияние водных экстрактов этих видов грибов на отдельные параметры фибринолиза (активацию плазминогена, активность альфа-2-антиплазмина, время лизиса эуглобулинового сгустка, концентрацию фибриногена) ранее не было изучено.

Фракции, выделенные из грибов шиитаке (*L. edodes*), обладают выраженной антитромботической активностью и оказывают влияние в разной степени на все изучаемые параметры фибринолиза. Фракции, выделенные из экстрактов шляпок и ножек чешуйчатки обыкновенной (*Ph. squarrosa*), летних (*K. mutabilis*) и зимних (*F. velutipes*) опят, также проявляют *in vitro* антитромботическую (фибринолитическую) активность, оказывая статистически значимое влияние на разные параметры фибринолиза.

Водные экстракты, выделенные из опят луковичноногих (*A. cepistipes*), северных (*A. borealis*) и серопластинчатых (*H. capnoides*), не оказывают влияния на изученные параметры фибринолиза и концентрацию фибриногена.

Деление плодовых тел грибов на ножки и шляпки для получения экстрактов, скорее всего, не является целесообразным, так как значительных различий между экстрактами, выделенными из ножек и из шляпок, по биологическому действию в целом не выявлено. При фракционировании суммарных экстрактов выбранным способом было показано, что полисахариды водных экстрактов грибов оказывают влияние на активность плазминогена и альфа-2-антиплазмина, в то время как наличие фибринолитической активности обеспечивается белками, в составе которых, вероятнее всего, присутствуют протеолитические ферменты.

Полученные данные позволяют рекомендовать водные экстракты из этих грибов для дальнейшего изучения, в том числе *in vivo*, например, с целью создания антитромботических лекарственных средств или разработки функциональных пищевых продуктов при сердечно-сосудистых заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жалялов А. С., Баландина А. Н., Купраш А. Д., Шривастава А., Шибеко А. М. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2017;16(1):69–82. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-69-82.
2. Cesarman-Maus G., Hajjar K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology.* 2005;129(3):307–321. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
3. Carpenter S. L., Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia*. 2008;14(6):1250–1254.
4. Литвинов Р. И. Молекулярные механизмы и клиническое значение фибринолиза. *Казанский медицинский журнал*. 2013;94(5):711–718.
5. Денисова Н. П. Тромболитические свойства ферментов базидиальных грибов. *Проблемы медицинской микологии*. 2009;11(4):3–9.
6. Park S.-E., Li M.-H., Kim J.-S., Sapkota K., Kim J.-E., Choi B.-S., Yoon Y.-H, Lee J.-C., Lee H.-H., Kim C.-S., Kim S.-J. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71(9):2214–2222. DOI: 10.1271/bbb.70193.
7. Kim J.-H., Lee E.-J., Seok S.-J. Fibrinolytic and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Wild Mushroom Methanol Extracts. *The Korean Journal of Mycology*. 2007;35(2):128–132. DOI: 10.4489/KJM.2007.35.2.128.
8. Lee S.-Y., Kim J.-S., Kim J.-E., Sapkota K., Shen M.-H., Kim S., Chun H.-S., Yoo J.-C., Choi H.-S., Kim M.-K., Kim S.-J. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of Armillaria mellea. *Protein Expression and Purification*. 2005;43(1):10–7. DOI: 10.1016/j.pep.2005.05.004.
9. Choi J.-H., Kim S. Fibrinolytic and Thrombolytic Effects of an Enzyme Purified from the Fruiting Bodies of Boletus pseudocalopus (Agaricomycetes) from Korea. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2021;23(4):47–57. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2021037957.
10. Islam M. R., Uddin Pk M. M. *In vitro* Doses and Incubations Dependent Thrombolytic Potential Study of Edible Mushrooms Pleurotus ostreatus, Ganoderma lucidum and Lentinula edodes Available in Bangladesh. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2015;7(1): 44–51. DOI: 10.9734/BJPR/2015/18227.
11. Denisova N. P. History of the Study of Thrombolytic and Fibrinolytic Enzymes of Higher Basidiomycetes Mushrooms at the V.L. Komarov Botanical Institute in Saint Petersburg, Russia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2010;12(3):317–325. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.110.
12. Шаркова Т. С., Кураков А. В., Осмоловский А. А., Матвеева Э. О., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. Скрининг продуцентов протеиназ с фибринолитической и коллагенолитической активностями среди микромицетов. *Микробиология*. 2015;84(3):316–322. DOI: 10.7868/S0026365615030180.
13. Попова Е. А., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Котова И. Б., Егоров Н. С. Продукция штаммом *Aspergillus ustus* протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков. *Микология и фитопатология*. 2019;53(4):229–235.
14. Осмоловский А. А., Орехова А. В., Конти Э., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. Получение и стабильность комплексного препарата протеиназ Aspergillus ochraceus L-1 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2020;75(3):158–163.
15. Шамцян М. М., Петрищев Н. Н., Денисова Н. П., Чефу С. Г., Васина Е. Ю, Тозик Е. В., Колесников Б. А. Ферментный препарат тромболитического и фибринолитического действия из базидиального гриба рода Coprinus. Патент RU2435848C1. 2010. Доступно по: https://patenton.ru/patent/RU2435848C1. Ссылка активна на 01.12.2023.
16. Ву А. Х. Б., ред. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам. М.: Лабора; 2013. 1380 с.
17. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушения гемостаза. М.: Ньюдиамед; 2008. 292 с.
18. Gong P., Wang S., Liu M., Chen F., Yang W., Chang X., Liu N., Zhao Y., Jing Wang, Chen X., Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydrate Research*. 2020;494. DOI: 10.1016/j.carres.2020.1080.
19. Villares A., Mateo-Vivaracho L., Guillamón E. Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms. *Agriculture*. 2012;2(4):452–471. DOI: 10.3390/agriculture2040452.
20. Кузнецова Т. А. Антикоагулянтная и антитромботическая активность сульфатированных полисахаридов морских водорослей. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2020;(2):53–59. DOI: 10.25555/THR.2020.2.0918.
21. Yoon S.-J., Yu M.-A., Pyun Y.-R., Hwang J.-K., Djong-Chi Ch.-D., Juneja L. R.,Paulo A. S., Mourão P. A. S. The nontoxic mushroom Auricularia auricula contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research*. 2003;112(3):151–158. DOI: 10.1016/j.thromres.2003.10.022.

22. Huang X., Nie S. The structure of mushroom polysaccharides and their beneficial role in health. *Food Funct*. 2015;6(10):3205–3217. DOI: 10.1039/c5fo00678c.
23. Lin H., Xu L., Yu S., Hong W., Huang M., Xu P. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020;52:367–379. DOI: 10.1038/s12276-020-0397-x.
24. Collen D., de Maeyer L. Molecular biology of human plasminogen. I. Physiochemical properties and microheterogeneity. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica*. 1975;34(2):396–402.
25. Brandt J. T. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2002;126(11):1376–1381 DOI: 10.5858/2002-126-1376-PATTPA.
26. Mandle R. J., Kaplan A. P. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood*. 1979;54(4):850–862.
27. Mast A. E., Enghild J. J., Pizzo S. V., Salvesen G. Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed and reactive site cleaved serpins: comparison of .alpha.1-proteinase inhibitor, .alpha.1-antichymotrypsin, antithrombin III, .alpha.2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry*. 1991;30(6):1723–1730. DOI: 10.1021/bi00220a039.
28. Cannon C. P., McCabe C. H., Gibson C. M., Ghali M., Sequeira R. F., McKendall G. R., Breed J., Modi N. B., Fox N. L., Tracy R. P., Love T. W., Braunwald E. TNK-tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10A dose-ranging trial. *Circulation*. 1997;95(2):351–356. DOI: 10.1161/01.cir.95.2.351.
29. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1980;43(2):77–89.

REFERENCES

1. Zhalyalov A. S., Balandina A. N., Kuprash A. D., Srivastava A., Shibeko A. M. The overview of fibrinolysis system contemporary concepts and of its disorders diagnostic methods. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*. 2017;16(1):69–82. (In Russ.) DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-69-82.
2. Cesarman-Maus G., Hajjar K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. 2005;129(3):307–321. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
3. Carpenter S. L., Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia*. 2008;14(6):1250–1254.
4. Litvinov R. I. Molecular mechanisms and clinical significance of fibrinolysis. *Kazan medical journal*. 2013;94(5):711–718. (In Russ.)
5. Denisova N. P. Thrombolytic peculiarities of basidial fungi. *Problems in medical mycology*. 2009;11(4):3–9. (In Russ.)
6. Park S.-E., Li M.-H., Kim J.-S., Sapkota K., Kim J.-E., Choi B.-S., Yoon Y.-H, Lee J.-C., Lee H.-H., Kim C.-S., Kim S.-J. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71(9):2214–2222. DOI: 10.1271/bbb.70193.
7. Kim J.-H., Lee E.-J., Seok S.-J. Fibrinolytic and α-Glucosidase Inhibitory Activities of Wild Mushroom Methanol Extracts. *The Korean Journal of Mycology*. 2007;35(2):128–132. DOI: 10.4489/KJM.2007.35.2.128.
8. Lee S.-Y., Kim J.-S., Kim J.-E., Sapkota K., Shen M.-H., Kim S., Chun H.-S., Yoo J.-C., Choi H.-S., Kim M.-K., Kim S.-J. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of Armillaria mellea. *Protein Expression and Purification*. 2005;43(1):10–7. DOI: 10.1016/j.pep.2005.05.004.
9. Choi J.-H., Kim S. Fibrinolytic and Thrombolytic Effects of an Enzyme Purified from the Fruiting Bodies of Boletus pseudocalopus (Agaricomycetes) from Korea. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2021;23(4):47–57. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2021037957.
10. Islam M. R., Uddin Pk M. M. *In vitro* Doses and Incubations Dependent Thrombolytic Potential Study of Edible Mushrooms Pleurotus ostreatus, Ganoderma lucidum and Lentinula edodes Available in Bangladesh. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2015;7(1): 44–51. DOI: 10.9734/BJPR/2015/18227.
11. Denisova N. P. History of the Study of Thrombolytic and Fibrinolytic Enzymes of Higher Basidiomycetes Mushrooms at the V.L. Komarov Botanical Institute in Saint Petersburg, Russia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2010;12(3):317–325. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.110.
12. Sharkova T. S., Kurakov A. V., Osmolovskiy A. A., Matveeva E. O., Kreyer V. G., Baranova N. A., Egorov N. S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes. *Microbiology*. 2015;84(3):316–322. (In Russ.) DOI: 10.7868/S0026365615030180.
13. Popova E. A., Osmolovskij A. A., Krejer V. G., Kotova I. B., Egorov N. S. Production by aspergillus ustus strain of proteinases highly activeagainst fibrillar proteins. *Mycology and Phytopathology*. 2019;53(4):229–235. (In Russ.)
14. Osmolovskiy A. A., Orekhova A. V., Conti E., Kreyer V. G., Baranova N. A., Egorov N. S. Production and stability of a complex prepatation of proteinases by Aspergillus ochraceus L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2020;75(3):158–163. (In Russ.)
15. Shamtsyan M. M., Petrishchev N. N., Denisova N. P., Chefu S. G., Vasina E. Yu, Tozik E. V., Kolesnikov B. A. Enzyme preparation of thrombolytic and fibrinolytic action from basidial fungus of the genus Coprinus. Patent RU2435848C1. 2010. Available at: https://patenton.ru/patent/RU2435848C1. Accessed: 01.12.2023. (In Russ.)
16. Wu A. H. B., editor. Tietz's Clinical Guide to Laboratory Tests. Москва: Labora; 2013. 1380 p. (In Russ.)
17. Barkagan Z. S., Momot A. P. Diagnosis and controlled therapy of hemostasis disorder. 2008. Moscow: N'yudiamed; 2008. 292 p. (In Russ.)
18. Gong P., Wang S., Liu M., Chen F., Yang W., Chang X., Liu N., Zhao Y., Jing Wang, Chen X., Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydrate Research*. 2020;494. DOI: 10.1016/j.carres.2020.1080.
19. Villares A., Mateo-Vivaracho L., Guillamón E. Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms. *Agriculture*. 2012;2(4):452–471. DOI: 10.3390/agriculture2040452.
20. Kuznetsova T. A. Anticoagulant and antithrombotic activity of seaweed sulfated polysaccharides. *Tromboz, Gemostaz i Reologiy*. 2020;(2):53–59. (In Russ.)
21. Yoon S.-J., Yu M.-A., Pyun Y.-R., Hwang J.-K., Djong-Chi Ch.-D., Juneja L. R.,Paulo A. S., Mourão P. A. S. The nontoxic mushroom Auricularia auricula contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research*. 2003;112(3):151–158. DOI: 10.1016/j.thromres.2003.10.022.
22. Huang X., Nie S. The structure of mushroom polysaccharides and their beneficial role in health. *Food Funct*. 2015;6(10):3205–3217. DOI: 10.1039/c5fo00678c.
23. Lin H., Xu L., Yu S., Hong W., Huang M., Xu P. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020;52:367–379. DOI: 10.1038/s12276-020-0397-x.
24. Collen D., de Maeyer L. Molecular biology of human plasminogen. I. Physiochemical properties and microheterogeneity. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica*. 1975;34(2):396–402.
25. Brandt J. T. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2002;126(11):1376–1381 DOI: 10.5858/2002-126-1376-PATTPA.
26. Mandle R. J., Kaplan A. P. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood*. 1979;54(4):850–862.
27. Mast A. E., Enghild J. J., Pizzo S. V., Salvesen G. Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed and reactive site cleaved serpins: comparison of .alpha.1-proteinase inhibitor, .alpha.1-antichymotrypsin, antithrombin III, .alpha.2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry*. 1991;30(6):1723–1730. DOI: 10.1021/bi00220a039.
28. Cannon C. P., McCabe C. H., Gibson C. M., Ghali M., Sequeira R. F., McKendall G. R., Breed J., Modi N. B., Fox N. L., Tracy R. P., Love T. W., Braunwald E. TNK-tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10A dose-ranging trial. *Circulation*. 1997;95(2):351–356. DOI: 10.1161/01.cir.95.2.351.
29. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1980;43(2):77–89.

Research article / Оригинальная статья

UDC 615.03

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1821

Check for updates

CC BY 4.0

Development and validation of a high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for quantification of tofacitinib in human plasma

Evgeniya S. Vetrova[1, 2] ✉, Polina K. Karnakova[1, 3], Natalia S. Bagaeva[1], Kseniia K. Karnakova[1], Mariia O. Popova[1], Anna A. Popova[1], Olga A. Archakova[1], Timofey N. Komarov[1, 3, 4], Igor E. Shohin[1, 2, 3]

[1] LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia
[2] National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute). 31, Kashirskoe shosse, Moscow, 115409, Russia
[3] Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia
[4] Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University). 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Evgeniya S. Vetrova. **E-mail:** e.vetrova@cpha.ru

ORCID: Evgeniya S. Vetrova – http://orcid.org/0000–0003–2219–5964; Polina K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777; Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; 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: 09.04.2024 **Accepted:** 27.05.2024 **Published:** 27.05.2024

Abstract

Introduction. The use of tofacitinib as a pharmacological treatment for rheumatoid arthritis remains relevant in the light of the predicted increase in prevalence of the disease. At the same time, due to the withdrawal of several foreign pharmaceutical companies from the Russian pharmaceutical market, there has been a heightened demand for domestically produced medications, including generic formulations of tofacitinib. Registration of generic drugs necessitates the conduct of bioanalytical studies. Development and validation of a method for quantifying the analyte in biosamples remains to be a crucial part of the bioequivalence studies.

Aim. The aim of this research is to develop and validate a method for the quantitative determination of tofacitinib in human plasma using high-performance liquid chromatography as the separation system coupled with a tandem mass spectrometer for detection purposes.

Materials and methods. Biosample preparation was based on plasma proteins precipitation using acetonitrile. Baricitinib was selected as an internal standard. The analytical range of the method was 1.00 to 200.00 ng/mL and was further expanded to 0.30 to 200.00 ng/mL during the analytical phase of the study. The mobile phase consisted of water and acetonitrile, both acidified with formic acid (0.1 % v/v). The stationary phase was a Phenomenex Kinetex C_{18} column [100 × 3.0 mm, with a particle size of 5 μm (Phenomenex, USA)]. Sample separation and detection were carried out using high-performance liquid chromatography coupled with a tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), operating in positive ion mode. The multiple reaction monitoring (MRM) transitions selected for the analyte and the internal standard were 313.30 to 173.00 m/z and 371.90 to 186.00 m/z, respectively.

Results and discussion. The developed assay was validated in accordance with the current requirements of regulatory documentation from the EAEU (Eurasian Economic Union), FDA (US Food and Drug Administration), and EMA (European Medicines Agency) with the following parameters being evaluated: selectivity, specificity, carry-over, matrix effect, recovery, calibration curve, lower limit of quantitation, accuracy, precision, stability. The validated method was applied in the analytical part of a bioequivalence study of domestically produced generic tofacitinib.

Conclusion. A method for the quantitative determination of tofacitinib in human blood plasma with an analytical range of 0.30–200.00 ng/mL was developed and validated. Application of the assay during the analytical phase of bioequivalence study of generic tofacitinib confirms the possibility of using the method in similar bioanalytical investigations.

Keywords: tofacitinib, validation, LC-MS/MS, bioequivalence, pharmacokinetics, bioanalytical study

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, Evgeniya S. Vetrova have participated in the development and validation of the bioanalytical method, as well as in conducting the analytical part of the study. Natalia S. Bagaeva, Kseniia K. Karnakova carried out statistical processing of the data. Mariia 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: Vetrova E. S., Karnakova P. K., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Popova M. O., Popova A. A., Archakova O. A., Komarov T. N., Shohin I. E. Development and validation of a high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for quantification of tofacitinib in human plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(2):233–244. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1821

© Vetrova E. S., Karnakova P. K., Bagaeva N. S., Karnakova K. K., Popova M. O., Popova A. A., Archakova O. A., Komarov T. N., Shohin I. E., 2024
© Ветрова Е. С., Карнакова П. К., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Попова М. О., Попова А. А., Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Шохин И. Е., 2024

Разработка и валидация методики количественного определения тофацитиниба в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Е. С. Ветрова[1, 2]✉, П. К. Карнакова[1, 3], Н. С. Багаева[1], К. К. Карнакова[1], М. О. Попова[1], А. А. Попова[1], О. А. Арчакова[1], Т. Н. Комаров[1, 3, 4], И. Е. Шохин[1, 2, 3]

[1] Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»), 117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (ФГАОУ ВО «НИЯУ «МИФИ»). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31
[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] 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:** Ветрова Евгения Сергеевна. **E-mail:** e.vetrova@cpha.ru

ORCID: Е. С. Ветрова – http://orcid.org/0000–0003–2219–5964; П. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777;
Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; 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: 09.04.2024 **Статья принята в печать:** 27.05.2024 **Статья опубликована:** 27.05.2024

Резюме

Введение. Применение тофацитиниба в медикаментозном лечении ревматоидного артрита не теряет актуальности в связи с прогнозируемым ростом распространенности данного заболевания. Вместе с тем, в результате ухода многих зарубежных компаний с фармацевтического рынка России возник спрос на выпуск лекарственных препаратов отечественного производства, в том числе воспроизведенных препаратов тофацитиниба, для регистрации которых обязательно проведение биоаналитических исследований. Необходимой частью аналитического этапа изучения биоэквивалентности является разработка и валидация методики количественного определения анализируемого вещества.

Цель. Целью данного исследования является разработка и валидация методики количественного определения тофацитиниба в плазме крови человека с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в качестве системы разделения и тандемного масс-спектрометра в качестве метода детектирования.

Материалы и методы. Пробоподготовка биообразцов была основана на осаждении белков плазмы крови ацетонитрилом. В качестве внутреннего стандарта был выбран барицитиниб. Аналитический диапазон методики составил 1,00–200,00 нг/мл и в дальнейшем при проведении аналитического этапа исследования был расширен до 0,30–200,00 нг/мл. Подвижная фаза включала воду и ацетонитрил, подкисленные муравьиной кислотой до значения 0,1 % об. Неподвижная фаза была представлена Phenomenex Kinetex C_{18}, 100 × 3,0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США). Разделение и детектирование проб проводили в системе высокоэффективного жидкостного хроматографа с тандемным масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС) в положительном режиме ионизации. Для аналита и внутреннего стандарта были подобраны следующие MRM-переходы: 313,30 → 173,00 m/z, 371,90 → 186,00 m/z соответственно.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована согласно действующим требованиям нормативной документации ЕАЭС, FDA, EMA по следующим параметрам: селективность, специфичность, эффект переноса, эффект матрицы, степень извлечения, градуировочная кривая, нижний предел количественного определения, точность, прецизионность, стабильность. Проведена апробация методики в рамках аналитического этапа исследования.

Заключение. Разработана и валидирована быстрая, нетрудоемкая и чувствительная методика количественного определения тофацитиниба в плазме крови человека с подтвержденным аналитическим диапазоном 0,30–200,00 нг/мл. Апробация методики при проведении аналитического этапа изучения биоэквивалентности препарата тофацитиниба подтверждает возможность использования методики в подобных биоаналитических исследованиях.

Ключевые слова: тофацитиниб, валидация, ВЭЖХ-МС/МС, биоэквивалентность, фармакокинетика, биоаналитические исследования

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, Е. С. Ветрова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики, а также в проведении аналитической части исследования. Н. С. Багаева, К. К. Карнакова проводили 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: Ветрова Е. С., Карнакова П. К., Багаева Н. С., Карнакова К. К., Попова М. О., Попова А. А., Арчакова О. А., Комаров Т. Н., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики количественного определения тофацитиниба в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):233–244. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1821

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis is a type of autoimmune inflammatory rheumatic disease [1] that has seen an increase in global incidence over the past three decades by more than 120 %, reaching almost 18 million cases in 2020. According to estimates made by foreign researchers, the number of individuals suffering from various forms of this pathology, considering the prevalence of the condition and socio-demographic index, will exceed 25 million in the near future [2]. Despite the predicted increase in rheumatoid arthritis prevalence, there has been a

consistent reduction in disease severity over the last three decades. This is attributed to scientific discoveries in medicine that have allowed for changes in treatment approaches and improved patient support during the treatment process [3]. It is important to acknowledge that the risk group encompasses residents of industrialized nations, who are subject to certain controllable risk factors linked to lifestyle, environmental contamination, and other factors. Uncontrollable factors include gender (the incidence is higher in women), age (over sixty years)[1], and a genetic predisposition [3, 4]. Given these considerations, the issue of rheumatoid arthritis management remains pertinent today.

Tofacitinib is a drug that has been approved for use as a treatment of various diseases, including rheumatoid and psoriatic arthritis, as well as ulcerative colitis [1]. The efficacy of tofacitinib in treating these conditions is based on its ability to bind reversibly to the Janus kinase (JAK) site, thereby blocking the signaling pathways from cytokine receptors (such as those of the interleukin-6 (IL-6) family) and interferon to intracellular transcription factors [1, 4]. Rheumatoid and psoriatic arthritis involve inflammatory processes that activate these signaling pathways, leading to an increase in the levels of certain substances. For example, the concentration of interleukin-6 can increase from picogram levels in the healthy state to microgram levels during inflammation [5]. In addition to its effect on interferons, tofacitinib also inhibits the activity of T-lymphocytes. By affecting the transmission of interferon-mediated signals, it helps prevent the development of pathological changes in skin and bone tissue that are characteristic to rheumatoid and psoriatic arthritis [6]. Therefore, tofacitinib can be an effective and safe option for the treatment of these conditions in pharmacotherapy [1, 6].

Since the end of February 2022, several foreign pharmaceutical companies have withdrawn from the domestic market, along with the ceasing the international clinical trials and the reduction in the availability of raw materials and commodities essential for drug production in Russia[2]. Despite this, there has been an increase in demand for imported and locally produced drugs, with sales increasing by more than 20 % since October 2022[3]. Given this situation, it has become more significant to address the issue of expanding the market for domestic pharmaceutical products, as well as through the development and marketing of generic drugs. However, this process requires bioanalytical testing to ensure the safety and efficacy of these products.

The aim of this study was to develop and validate a rapid, non-labor-intensive, sufficiently sensitive method for the quantification of tofacitinib, using high-performance liquid chromatography (HPLC) with a tandem mass spectrometry (MS/MS) detector, based on literature data analysis to assess the feasibility of conducting a bioequivalence study.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Solutions

Acetonitrile (Biosolve Chimie, Netherlands) of «HPLC-S Gradient grade» purity was used to prepare the eluents. Mobile phase was composed of formic acid with a purity of 98 %, which was produced by PanReac, Germany and AppliChem, Spain. Additionally, demineralized water was used, which was obtained using the Hydrolab R5 water purification system from Poland. The use of ultrapure reagents is not required for sample preparation, so acetonitrile with a purity of «reagent grade» produced by Komponent-Reactiv, Russia was used as the precipitant.

The tofacitinib citrate reference standard with a purity of 100.40 %, used for the preparation of stock standard solutions (SSs), was provided by Metrochem Api Private Limited, India. The baricitinib reference standard (internal standard, IS) with a purity of 99.78 % was supplied by Shanghai Famo Biotechnology Co. Ltd., China. Quantities of these substances were transferred into 100.0 mL volumetric flask to prepare tofacitinib (TOF) SS and 50.00 mL volumetric flask to prepare baricitinib (BAR) SS. By dissolving 16.1 mg of tofacitinib citrate and 10.0 mg of baricitinib in appropriate volumes of pure methanol of «special purity grade» for gradient HPLC» (Himmed, Russia), solutions of TOF and BAR were prepared with concentrations of 100 000.00 ng/mL and 200 000.00 ng/mL, respectively. Analyte working standard solutions (WSs), applied for the preparation of calibration samples (CSs) and quality control samples (QCs), were obtained by transferring the appropriate volumes of TOF SS into volumetric flasks. The IS WS was prepared using the same methodology. The first level of CS concentrations corresponded to the lower limit of quantification (LLOQ), the last level of CS concentrations (8^{th} for validation cycles 1, 2, 3, 5; 9^{th} for validation cycle 4) corresponded to the upper limit of quantification (ULOQ). QCs included LLOQ, a low concentration level (L), three medium concentration levels (M1, M2, M3), and a high concentration level (H). CS and QC concentrations obtained by adding a specified volumes of WSs to blood plasma are presented in Table 1.

Eluents A and B for the mobile phase were prepared by combining 1000 µL of formic acid (FA) with 500 mL of solvent (demineralized water or acetonitrile, respectively), followed by adjusting the volume to 1000 mL.

[1] Rheumatoid arthritis. World Health Organization. Available at: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/rheumatoid-arthritis. Accessed: 26.03.2024.

[2] Will we be left without medicinal products: what is happening to the Russian pharmaceutical market after the sanctions? Available at: https://fedpress.ru/article/3243884. Accessed: 26.03.2024.

[3] Pharmaceutical market in Russia: October 2023. DSM Group. Analytical reports. Available at: https://dsm.ru/docs/analytics/october23.pdf. Accessed: 26.03.2024.

Table 1. Concentration levels of calibration standards and quality control samples

Calibration standards for 1–3 validation cycles		1	2	3	4	5	6	7	8
Calibration standards for the 4th validation cycle	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TOF concentration, ng/mL	0.30	1.00	2.50	5.00	10.00	25.00	50.00	100.00	200.00
BAR concentration, ng/mL	150.00								
Quality control samples	Number of the validation cycle								
	1, 2, 3, 5	4	1, 2, 3, 5	4	1–4				
	LLOQ	LLOQ	L	L	M1	M2	M3	H	
TOF concentration, ng/mL	1.00	0.30	3.00	0.90	6.00	30.00	120.00	150.00	
BAR concentration, ng/mL	150.00								

Procedure for processing plasma samples

Intact blood plasma (IBP), hemolytic intact blood plasma (HBP), and lipemic intact blood plasma (LBP) were used for validation purposes. The procedure for preparing plasma samples was carried out using a method that involves the precipitation of biological matrix proteins using acetonitrile (ACN). The first step of the sample preparation process involved transferring a specified amount of each matrix to Eppendorf tubes. The samples were then processed according to the steps described in Figure 1. After completing the sample preparation, chromatographic vials containing prepared samples were placed in the autosampler. Once the samples had reached the temperature set by the operator within the device's storage compartment, analysis could commence.

Apparatus and Chromatographic Conditions

The Nexera XR HPLC system (Shimadzu Corporation, Japan) was employed to separate substances in samples. The chromatographic system comprised the following components: a unit for the preparation and supply of a mobile phase with a specific composition, an autosampler integrated with an external sample loader (rack changer), a column module equipped with a thermostat, and a high-pressure switching valve.

The separation was achieved using a Phenomenex C_{18} pre-column (4 × 3.0 mm) and a Phenomenex Kinetex C_{18} analytical column (100 × 3.0 mm, 5 µm) (Phenomenex, USA). Target substances were eluted using a gradient mobile phase elution mode (GRAD) as shown in Figure 2, with a flow rate of 1 mL/min during the entire sample analysis period.

Mass spectrometric detection conditions

After elution, the substances were introduced into a Shimadzu LCMS-8040 triple quadrupole mass selective detector for electric field spray ionization (ESI) analysis. Detection parameters are summarized in Table 2 below.

LabSolutions software (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Japan) was used to process the raw data obtained from the detection results.

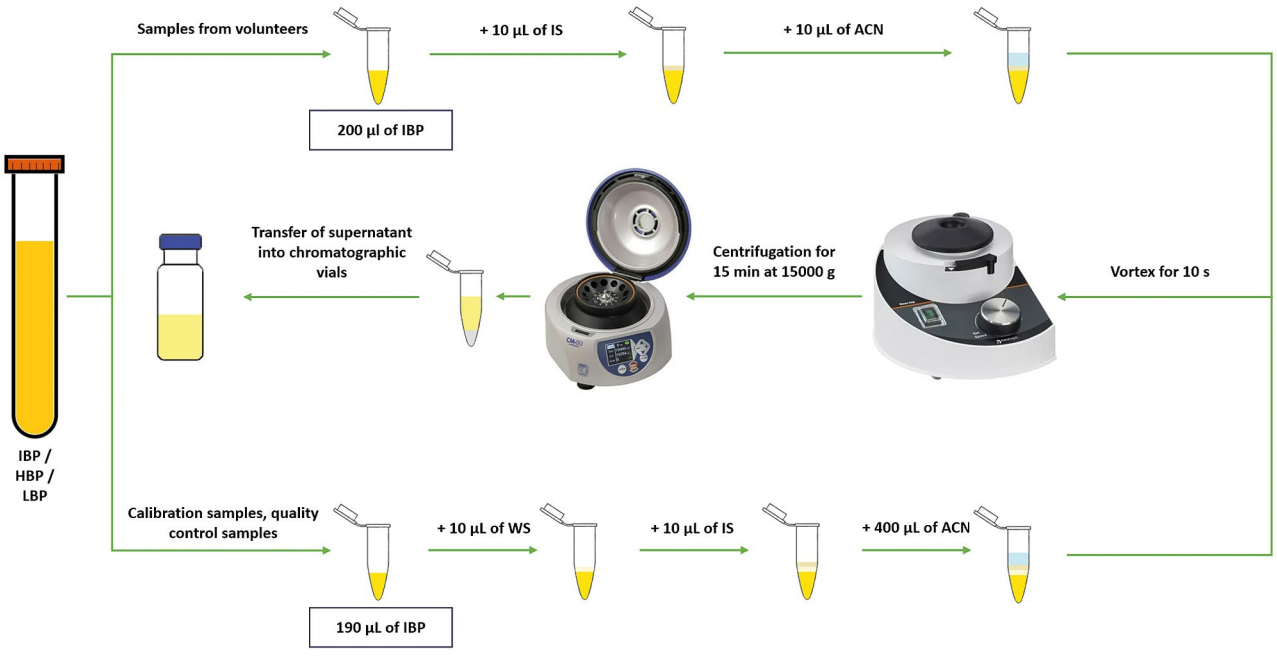


Figure 1. Sample preparation scheme

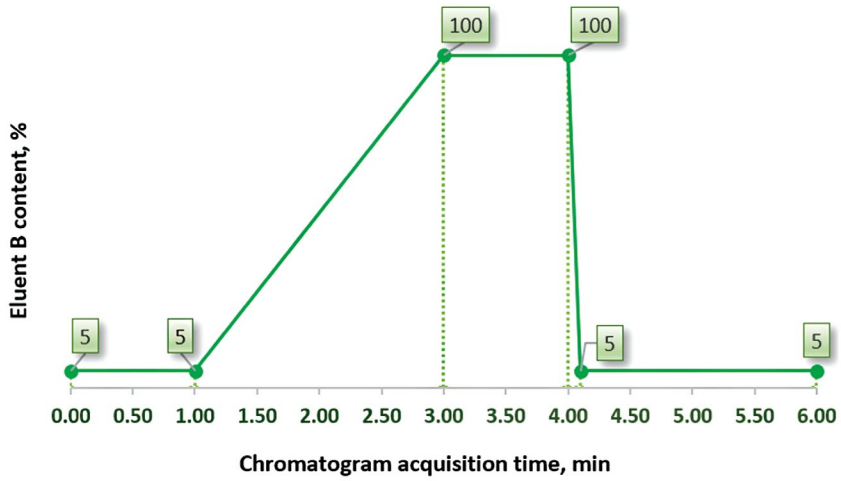


Figure 2. **Composition of the mobile phase during gradient elution**

Table 2. **Tofacitinib and baricitinib detection parameters**

Detection parameters	Ionization mode	Nebulizing gas, L/min	Desolvation gas, L/min	ESI temperature, °C	Parent ion, m/z	Product ion, m/z	Capillary voltage, kV
TOF	+	3	20	400	313.30	173.00	+4.5
BAR					371.90	186.00	

Validation of the Bioanalytical Method

Method validation was carried out in accordance with the regulations for bioequivalence studies of medicinal products approved within the EAEU[1], the guidelines for the validation of bioanalytical methods by FDA[2], and EMA[3].

The parameters that need to be evaluated in order to carry out a full validation of an analytical method in accordance with the listed documentation are shown in Figure 3, together with the samples and acceptance criteria (AC) required for the analysis.

When validating the parameter «Stability» it is necessary to assess several stability types. These forms of stability are evaluated by subjecting the samples that have been stored under different specific conditions to analysis, as shown in Figure 4.

[1] Rules for Conducting Bioequivalence Studies of Medicinal Products within the Eurasian Economic Union (Approved by Decision N 85 of the Council of the Eurasian Economic Commission of 03.11.2016). Available at: https://docs.cntd.ru/document/456026107/ Accessed: 26.03.2024.

[2] Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/ Accessed: 26.03.2024.

[3] Guidline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/ Accessed: 26.03.2024.

RESULTS AND DISCUSSION

Literature review

Table 3 summarizes the methods employed for the quantitative determination of TOF in human biological fluids (blood plasma, blood serum, urine). Most of the reviewed studies utilized the HPLC-MS/MS method, with the analyte being ionized via electrospray or TurbolonSpray in positive mode. Additionally, a technique has been developed for the measurement of the target compound in plasma using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [7].

Literature analysis demonstrates that elution is typically conducted in an isocratic mode (ISO) [7-14]. The solvents in the mobile phase are most often modified with ammonium salts [7, 9–14] or acetic acid (AA) [7]. Additionally, there are two methods using classical eluents: water acidified with formic acid (FA) (eluent A) and acetonitrile acidified with FA (eluent B) [8, 15]. This composition of both eluents facilitates research and analysis.

In the methods presented, complex sample preparation procedures predominate, including solid-phase extraction (SPE) [9–12], which requires the use of a significant amount of expensive reagents and supplies. Liquid-liquid extraction (LLE) [7, 13, 14] also necessitates specialized equipment such as an evaporator. A modification of the precipitation method, which involves dilution of samples with ultrapure water at the end of the sample preparation process [15], should be noted. Pro-

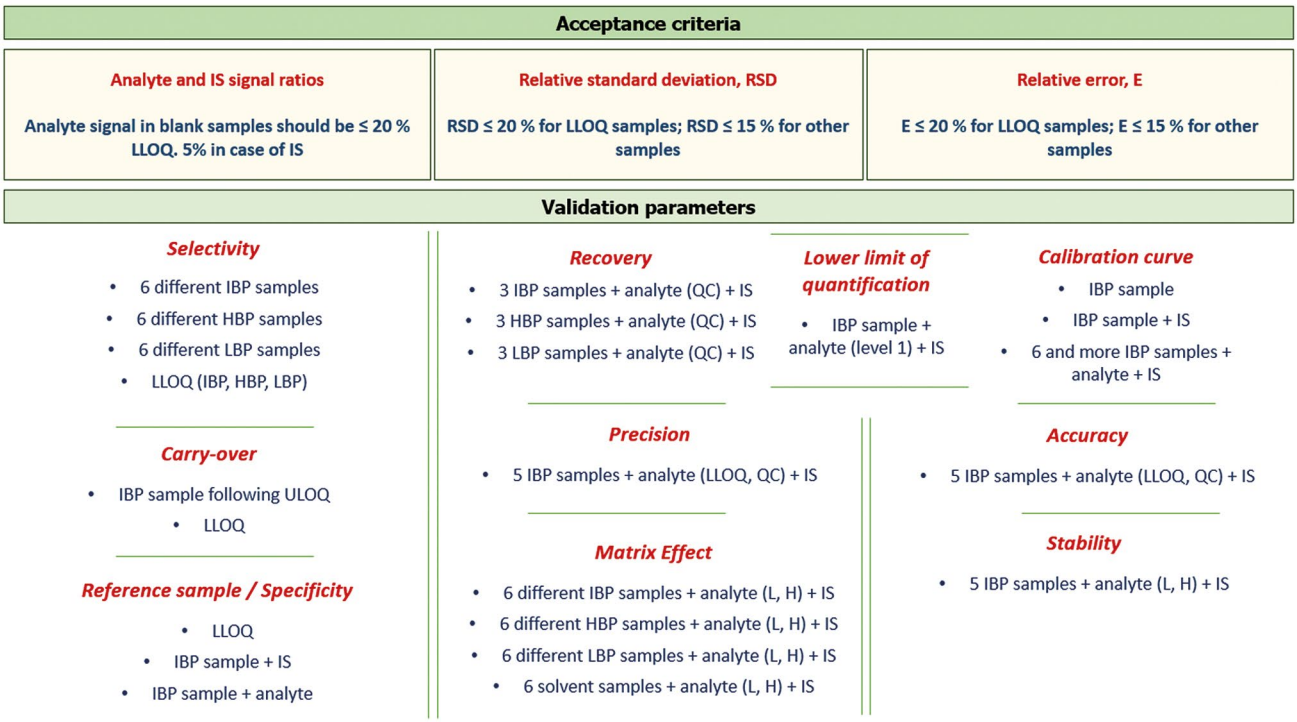


Figure 3. **Validation parameters and acceptance criteria**

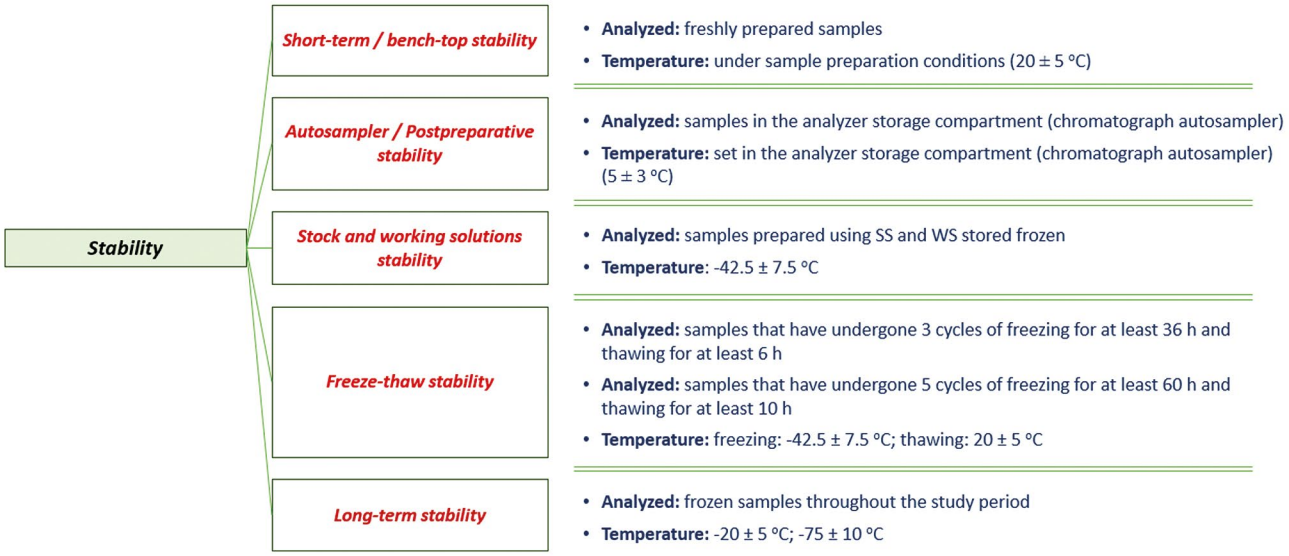


Figure 4. **Assessment conditions for different types of stability**

tein precipitation remains to be the simplest, fastest, and least expensive method for sample preparation using an organic solvent such as ACN or methanol (MeOH) [8].

The most sensitive method reported in literature for the determination of tofacitinib in human plasma is a UPLC-MS/MS-assay with a lower detection limit of 0.05 ng/mL. This assay is highly sensitive, but it requires specialized UPLC equipment that may not be available in most laboratories. Developing an alternative method that is more accessible and easier to use, while maintaining similar sensitivity, would be of significant interest. HPLC-MS/MS method has proven to be reliable and accurate and therefore could be a promising alternative.

Method development

HPLC-MS/MS method development involves the selection of mass spectrometry parameters and chromatographic conditions.

Table 3. **Bioanalytical methods for determination of tofacitinib in biological matrices**

Analysis method	Ionization conditions	Chromatogram register time, min	Mobile phase composition	Biological matrix	Sample preparation	Analytical range, ng/mL	Reference
UPLC-MS/MS	ESI (+)	1.40	Ammonium acetate + water + AA / ACN (ISO)	Blood plasma	LLE	0.05 – 100.00	[7]
HPLC-MS/MS	ESI (+)	4.10	FA + water / FA + ACN (ISO)	Blood serum	Precipitation with ACN	0.10 – 100.00	[8]
HPLC-MS/MS	TurboIonSpray (+)	45.00	Ammonium acetate + MeOH + FA (ISO)	Blood plasma, urine	SPE	1.00 – 100.00	[9]
HPLC-MS/MS	TurboIonSpray (+)	–	Ammonium acetate + MeOH + FA (ISO)	Blood plasma, urine	SPE	0.10 – 350.00	[10]
HPLC-MS/MS	TurboIonSpray (+)	–	Ammonium acetate + MeOH + FA (ISO)	Blood plasma	SPE	0.10 – 350.00	[11]
HPLC-MS/MS	ESI (+)	–	Ammonium acetate + MeOH + FA (ISO)	Blood plasma	SPE	0.10 – 350.00	[12]
HPLC-MS/MS	ESI (+)	6.00	Ammonium formate +FA + water + ACN (ISO)	Blood plasma	LLE	5.00 – 100.00	[13]
HPLC-MS/MS	ESI (+)	4.00	ACN / ammonium formate + water (ISO)	Blood plasma, urine	Dilution with glycine buffer, LLE, filtration	1.00 – 100.00	[14]
HPLC-MS/MS	ESI (+)	7.00	FA + water / FA + ACN (GRAD)	Blood plasma, serum	Precipitation with MeOH, dilution with water	1.00 – 400.00	[15]

In the first step, a suitable IS was selected based on the physicochemical properties of the analyte. Acid dissociation constant (pKa) values, octanol/water partition coefficients (logP) and the structure of the compounds were taken into the consideration when deciding on an IS that is similar to TOF (see Table 4). Baricitinib was opted for as a suitable IS for the current study.

The development of mass-spectrometry conditions was performed using the multiple reaction monitoring (MRM) method, which allows for the identification of a specific fragmentation pathway of the parent ion of a substance, resulting in products with different masses. The resulting MRM-transitions for TOF are the following: 313.30 to 173.00 m/z and for BAR: 371.90 to 186.00 m/z. In order to increase the signal intensity of the analyte and IS, the optimization of several mass spectrometric parameters was carried out, including MRM-transitions, collision energy, quadrupole, desolvation line and needle voltages.

After selecting the conditions that maximize peak intensities for mass spectrometry detection, it is essential to determine the chromatographic parameters that enable effective separation of a biological sample.

For stationary phase a Phenomenex Kinetex C_{18} column (100 × 3.0 mm, with a particle size of 5 μm) was employed. The mobile phase constituted of 0.1 % formic acid-water solution (eluent A) and 0.1 % formic acid-acetonitrile solution (eluent B). Elution was performed in gradient mode, which allowed for obtaining high peak intensities, satisfactory peak asymmetry factors for the analyte and IS (1.054 and 1.115, respectively), and a high signal-to-noise ratio (S/N) for the analyte at LLOQ for the first analytical range (25.56). After reducing the LLOQ to 0.30 ng/mL, the S/N for TOF was found to be 15.81. This indicates that the sensitivity of the analytical method is sufficient. To ensure accurate results, the analysis time for each injection was extended to 6 minutes to allow for adequate system washing and equilibration.

A suitable sample preparation method was determined by examining the samples obtained through the precipitation of plasma proteins using organic solvents: ACN and MeOH. Methanol-based samples revealed suspended solids that proved impossible to separate by centrifugation. The analysis of samples prepared with ACN as a precipitating agent showed satisfactory extraction of the desired substances, along with the acceptable data reproducibility. Therefore, the employment of the LLE method was not required.

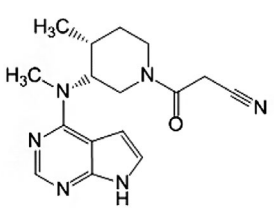
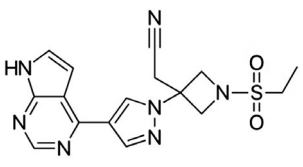
Validation

Full validation of the method for quantitative determination of tofacitinib in human plasma was carried out within validation cycles 1–3. Validated range was 1.00–200.00 ng/mL.

Analytical approbation of the method in terms of bioequivalence study revealed a 5 % excess of LLOQ over the lowest maximum concentration of TOF among all analyzed samples. Consequently, a partial validation was carried out to reduce the LLOQ by expanding the analytical range. The partial validation within the 4th validation cycle involved the assessment of the following parameters: selectivity, calibration curve, lower limit of quantification, accuracy and precision. Additionally, samples stability during five freeze-thaw cycles, as well as stock and working solutions stability was evaluated.

Long-term stability of the analyte in the biological matrix (human blood plasma) was assessed twice: within the 3rd cycle (the first stage) and the 5th cycle (the second stage), in order to extend the shelf life of biological samples during the analytical phase of the study. Consequently, the long-term stability of the analyte was reassessed within the 5th validation cycle with the following parameters: calibration curve, accuracy, precision, and stability.

Table 4. Properties of tofacitinib and baricitinib

Investigated substance	Tofacitinib	Baricitinib
Compound name (IUPAC)	3-[(3R,4R)-4-methyl-3-[methyl({7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl})amino]piperidin-1-yl]-3-oxopropanenitrile	2-[1-(ethanesulfonyl)-3-(4-{7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl}-1H-pyrazol-1-yl)azetidin-3-yl]acetonitrile
Structural formula		
pKa	9.15[1]	13.89[2]
logP	1.808[1]	1.10[2]

Note. [1] Tofacitinib. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB08895. Accessed: 26.03.2024.
[2] Baricitinib. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB11817. Accessed: 26.03.2024.

1. Selectivity, specificity, carry-over

The TOF and BAR signal levels in the blank samples were not more than 20 and 5 % of the arithmetic mean of TOF and BAR signal values in the LLOQ samples, respectively, which is consistent with the requirements specified in the regulatory documentation. Figure 5 illustrates an example of chromatograms obtained from the blank and LLOQ sample analysis.

The specificity of the method (standard sample suitability) was similarly assessed by comparing the signals from the sample without TOF and the sample without BAR to those at the LLOQ level. Sample test results met the AC.

2. Matrix effect

The parameter was estimated at two QC concentration levels (L and H) using IBP, HBP, and LBP samples. The quantitative results of the estimation of the matrix effect on TOF are presented in Table 5. The RSD values for all matrix types were less than 15 % for both concentration levels.

Table 5. Baricitinib-normalized matrix effect for tofacitinib, relative standard deviation

Biological matrix	IBP		HBP		LBP	
Concentration level	L	H	L	H	L	H
Average	1.34	1.25	1.29	1.20	1.31	1.16
RSD, %	9.69	6.42	12.93	6.00	9.98	3.93

3. Recovery

Table 6 presents the average recovery values for different matrix types. The RSD ranged from 1.77 to 12.36 %, which falls within the acceptable limits.

4. Calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification

The simplest linear regression model was chosen for the calibration graph. For the five calibration curves obtained during the validation process, the correlation coefficients for the selected function type were not less than 0.99, while E for the measured CS concentrations remained within the specified tolerance limits (not exceeding ±20 % for the 1st concentration level, not exceeding ±15 % for the remaining concentration levels). A representative calibration graph from the 4th validation cycle is depicted in Figure 6. The corresponding correlation coefficient for this calibration curve is 0.9944968 and the linear regression equation is

$$f(x) = 0.707283x + 0.00276663.$$

For the selected TOF concentration ranges (1.00–200.00 ng/mL and 0.30–200.00 ng/mL), inter-and intra-

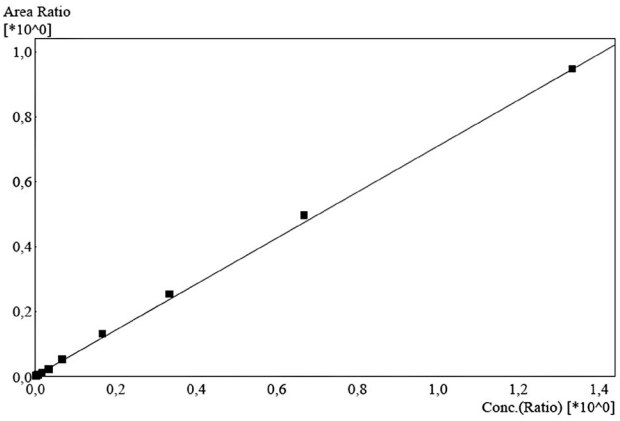


Figure 6. Calibration curve of the 4th validation cycle

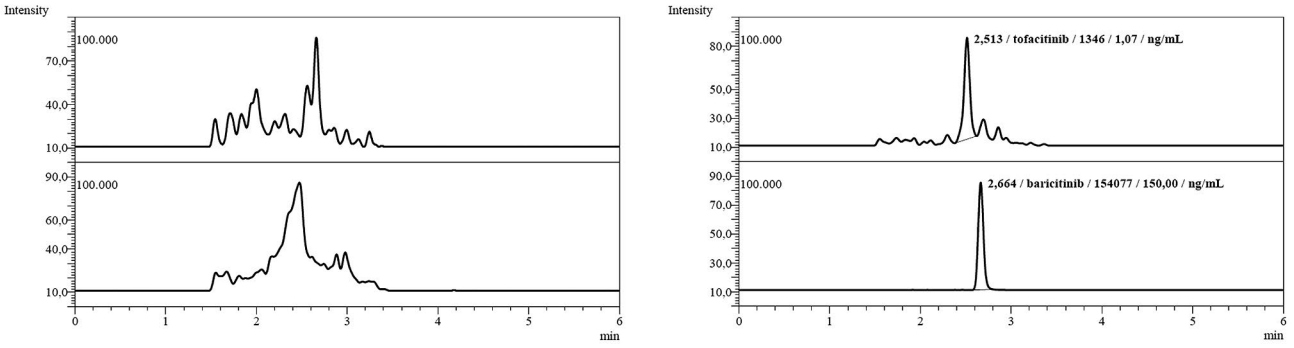


Figure 5. Example of chromatograms used to evaluate selectivity

Table 6. Baricitinib-normalized recovery for tofacitinib, relative standard deviation

Biological matrix	Average value of recovery					RSD, %				
	L	M1	M2	M3	H	L	M1	M2	M3	H
IBP	97.66	101.16	105.71	105.08	98.57	9.41	7.62	4.39	2.05	5.68
HBP	99.80	106.07	98.33	95.80	102.84	12.36	6.04	11.70	2.28	7.74
LBP	107.34	95.02	95.41	100.78	96.65	6.07	9.02	5.70	1.77	4.13

day accuracy and precision of the LLOQ and QC samples were evaluated for all validation cycles. Values for inter-day parameters are presented in Table 7.

The lower limit of quantification was determined based on the data from the calibration curve, accuracy, and precision assessment. For cycles 1 through 3 of the full validation study, the LLOQ was set at 1.00 ng/mL. After analyzing the data from cycle 4 of the partial validation study, a value of 0.30 ng/mL was determined for the LLOQ parameter. In both instances, obtained values corresponded to the first concentration level of TOF. The chromatograms for the LLOQs are presented in Figure 7.

5. Stability

By analyzing low (L) and high (H) QCs during stability estimation process, the resulting E values did not exceed ±15 %. Therefore, the following types of stability were demonstrated:

- short-term stability (BT-St.);
- post-preparative stability of samples (PP-St.) for not more than 41 hours;
- sample stability after 3 cycles of thawing and freezing (3-FT-St.) – within the 3rd validation cycle;
- sample stability after 5 cycles of thawing and freezing (5-FT-St.) – within the 4th validation cycle;
- stability of SSs (SS-St.) and WSs (WS-St.) for 3 days – within the 3rd validation cycle;
- stability of SSs (SS-St.) and WSs (WS-St.) for 5 days – within the 4th validation cycle;
- long-term stability (LT-St.) of analyte in biological matrix (plasma) at the extreme values of storage temperature range: from –25 to –15 °C and from –85 to –65 °C for 3 days – within the 3rd validation cycle;
- long-term stability (LT-St.) of the analyte in biological matrix (plasma) at the extreme values of storage temperature range: from –25 to –15 °C and from –85 to –65 °C for 66 days – within the 5th validation cycle (Table 8).

Method application

Validated method was applied for tofacitinib determination in a bioequivalence study of a domestic tofacitinib formulation and a reference drug: Jaquinus® modified-release, film-coated tablets containing 11 mg of tofacitinib (Pfizer Inc., USA). The pharmacokinetic properties of tofacitinib were investigated in this study following a single dose administration of the test drug (Test) and the reference drug (Ref.), both administered under fasting and fed conditions. Based on the analysis of blood plasma samples, individual pharmacokinetic profiles were generated, as illustrated in Figure 8.

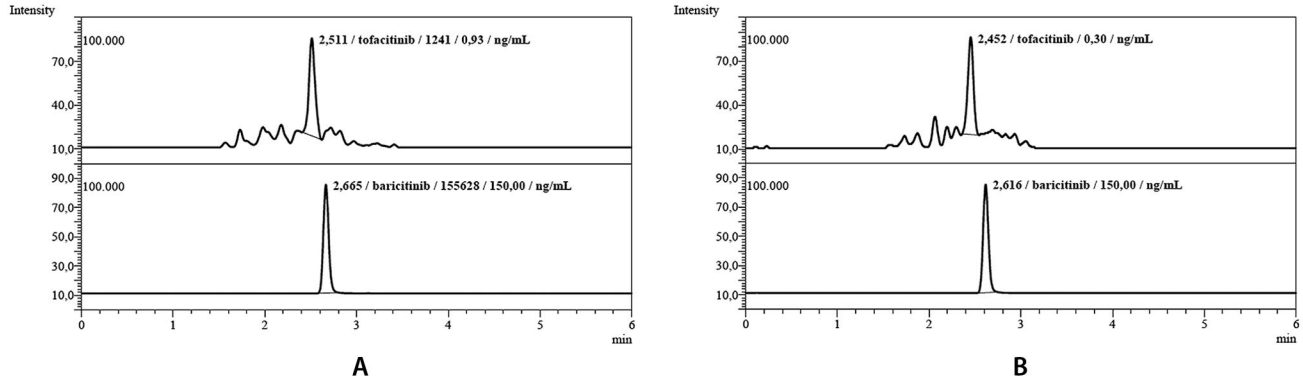


Figure 7. Chromatograms for the lower limit of quantification for validation cycles 1–3 (A) and 4 (B)

Table 7. Inter-day accuracy and precision for tofacitinib

Number of the validation cycle	1, 2, 3, 5	4	1, 2, 3, 5	4	1, 2, 3, 5			
Concentration level	LLOQ	LLOQ	L	L	M1	M2	M3	H
Nominal TOF concentration, ng/mL	1.00	0.30	3.00	0.90	6.00	30.00	120.00	150.00
Number of the validation cycle	Average value of TOF concentration in the cycle, ng/mL							
1	1.02	–	3.07	–	6.03	29.55	115.42	139.01
2	1.06	–	2.68	–	6.23	31.33	119.19	147.15
3	0.94	–	2.71	–	5.80	29.38	111.13	147.80
4	–	0.29	–	0.87	5.27	32.40	126.09	160.36
5	0.98		3.22	–	6.24	31.93	118.15	152.76
Inter-day average TOF concentration, ng/mL	1.00	0.29	2.92	0.87	5.92	30.92	118.00	149.42
E, %	–0.05	–2.00	–2.77	–3.56	–1.41	3.07	–1.67	–0.39
RSD, %	8.98	11.18	10.09	14.19	7.21	5.28	5.15	5.12

The following pharmacokinetic parameters were determined using specialized software:

- C_{max} – maximum plasma concentration of tofacitinib;
- t_{max} – time to reach C_{max};
- $t_{1/2}$ – plasma half-life of tofacitinib.

Table 9 presents average values for C_{max} and $t_{1/2}$, expressed as the arithmetic mean (M), along with the standard deviation (σ), for the sample of volunteers (n). For t_{max}, the data are reported as median (Median), with the range of values from minimum (Min) to maximum (Max), for the same sample (*n*).

An example of biosamples chromatograms from a volunteer participating in a clinical trial of domestically manufactured tofacitinib is shown in Figure 9.

CONCLUSION

An accessible, and sensitive method for the quantitative analysis of tofacitinib was developed. The method is based on sample separation using a high-performance liquid chromatography system. Detection is achieved using a tandem triple-quadrupole mass spectrometry detector. The range of this method is 0.30–200.00 ng/mL. The method was validated in accordance with the relevant regulatory documentation of the EAEU, FDA, EMA. After validation, the method was successfully applied in a bioequivalence study of a generic domestic formulation of tofacitinib. The results obtained

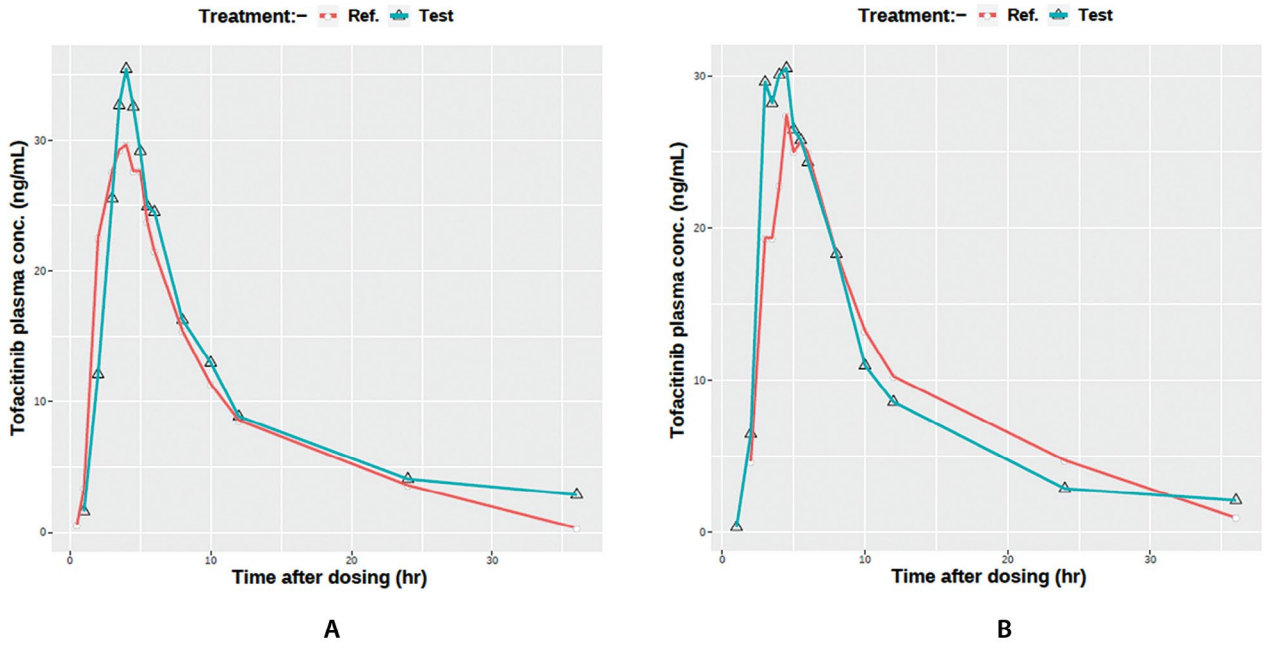


Figure 8. **Individual pharmacokinetic profiles of a volunteer with drugs administration under fasting (A) and fed (B) conditions**

Table 8. **Results of tofacitinib stability assessment**

Stability		Concentration level	L		H	
		Nominal TOF concentration, ng/mL	3.00		150.00	
		Number of the validation cycle	Average TOF concentration, ng/mL	E, %	Average TOF concentration, ng/mL	E, %
BT-St.		1	2.66	–11.40	148.26	–1.16
PP-St.		1	2.78	–7.27	129.37	–13.75
		2	2.63	–12.20	132.21	–11.86
		3	2.75	–8.20	136.37	–9.08
3-FT-St.		3	2.59	13.53	140.09	–6.60
5-FT-St.		4	2.98	–0.67	157.00	1.67
SS-St.		3	2.60	–13.47	145.37	–3.08
		4	3.05	1.67	151.23	0.82
WS-St.		3	2.60	–13.40	141.87	–5.42
		4	2.97	–0.87	159.25	6.17
LT-St.	–20 °C	3	2.82	–5.93	139.52	–6.99
	–80 °C	3	2.96	–1.20	141.04	–5.97
	–20 °C	5	3.04	1.20	151.50	1.00
	–80 °C	5	3.06	1.93	151.68	1.12

Table 9. **Summary data of tofacitinib pharmacokinetic parameters during single dose administration of the drugs**

Drug administration conditions	Fasting		Fed	
Pharmacokinetic parameter	Test drug	Reference drug	Test drug	Reference drug
	M (σ) [n] / Median (Min – Max) [n]			
C_{max}, ng/mL	36.97 (14.96) [18]	37.46 (12.72) [18]	49.35 (13.52) [19]	52.44 (17.66) [19]
t_{max}, h	3.75 (2–5) [18]	4 (2–5) [18]	5 (3.5–10) [19]	5 (3.5–8) [19]
$t_{1/2}$, h	5.77 (2.42) [18]	5.68 (1.46) [18]	7.14 (2.57) [19]	5.54 (2.33) [19]

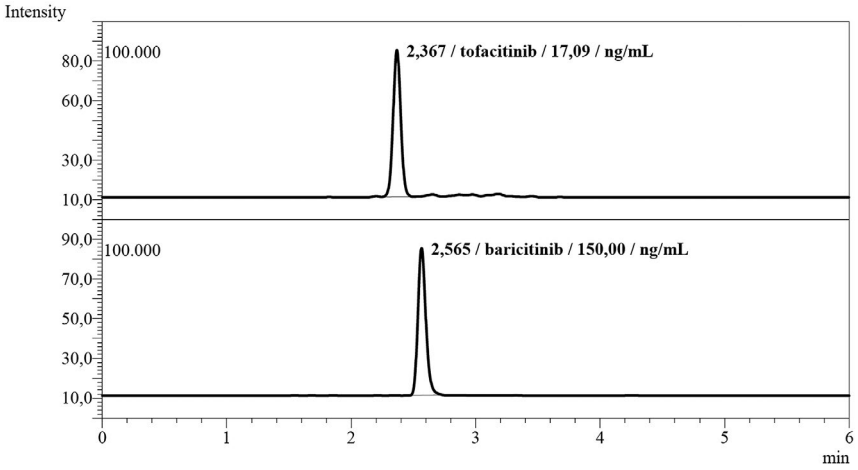


Figure 9. **Chromatograms of a volunteer blood plasma sample after 8 hours after administration of the drug**

during the validation confirm method suitability for the utilization in bioanalytical research of the pharmacokinetics and bioequivalence of tofacitinib formulations.

REFERENCES

1. Nasonov E. L., Avdeeva A. S., Lila A. M. Efficacy and safety of tofacitinib for immune-mediated inflammatory rheumatic diseases (Part I). *Rheumatology Science and Practice*. 2020;58(1):62–79. (In Russ.) DOI: 10.14412/1995-4484-2020-62-79.
2. GBD 2021 Rheumatoid Arthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990–2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*. 2023;5(10):e594–e610. DOI: 10.1016/S2665-9913(23)00211-4.
3. Finckh A., Gilbert B., Hodkinson B., Bae S.-C., Thomas R., Deane K. D., Alpizar-Rodriguez D., Lauper K. Global epidemiology of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2022;18(10):591–602. DOI: 10.1038/s41584-022-00827-y.
4. Smolen J. S., Aletaha D., Barton A., Burmester G. R., Emery P., Firestein G. S., Kavanaugh A., McInnes I. B., Solomon D. H., Strand V., Yamamoto K. Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4:18001. DOI: 10.1038/nrdp.2018.1.
5. Nasonov E. L., Feist E. The prospects of interleukin-6 inhibition in rheumatoid arthritis: Olokizumab (novel monoclonal antibodies to IL-6). *Rheumatology Science and Practice*. 2022;60(5):505–518. (In Russ.) DOI: 10.47360/1995-4484-2022-505-518.
6. Korotaeva T. V., Loginova E. Yu. Results of studying the clinical efficacy and safety of tofacitinib in the treatment of psoriatic arthritis. *Modern Rheumatology Journal*. 2019;13(2):112–118. (In Russ.) DOI: 10.14412/1996-7012-2019-2-112-118.
7. Bharwad K. D., Shah P. A., Shrivastav P. S., Singhal P. Development and validation of a rapid and sensitive UPLC–MS/MS assay for the quantification of tofacitinib in human plasma. *Biomedical Chromatography*. 2019;33(4):e4458. DOI: 10.1002/bmc.4458.
8. Church S., Hyrich K. L., Ogungbenro K., Unwin R. D., Barton A., Bluett J. Development of a sensitive biochemical assay for the detection of tofacitinib adherence. *Analytical Methods*. 2023;15(14):1797–1801. DOI: 10.1039/D2AY01800D.
9. Dowty M. E., Lin J., Ryder T. F, Wang W., Walker G. S., Vaz A., Chan G. L., Krishnaswami S., Prakash C. The pharmacokinetics, metabolism, and clearance mechanisms of tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;42(4):759–773. DOI: 10.1124/dmd.113.054940.
10. Krishnaswami S., Boy M., Chow V., Chan G. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of single oral doses of tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2015;4(2):83–88. DOI: 10.1002/cpdd.171.
11. Krishnaswami S., Wang T., Yuan Y., Alvey C. W., Checchio T., Peterson M., Shi H., Riese R. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of tofacitinib in healthy Chinese volunteers. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2015;4(5):395–399. DOI: 10.1002/cpdd.202.
12. Menon S., Riese R., Wang R., Alvey C. W., Shi H., Petit W., Krishnaswami S. Evaluation of the effect of tofacitinib on the pharmacokinetics of oral contraceptive steroids in healthy female volunteers. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2016;5(5):336–342. DOI: 10.1002/cpdd.270.
13. Abdelhameed A. S., Attwa M. W., Kadi A. A. An LC–MS/MS method for rapid and sensitive high-throughput simultaneous determination of various protein kinase inhibitors in human plasma. *Biomedical Chromatography*. 2017;31(2):e3793. DOI: 10.1002/bmc.3793.
14. Kadi A. A., Abdelhameed A. S., Darwish H. W., Attwa M. W., Bakheit A. H. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for simultaneous quantitation of tofacitinib, cabozantinib and afatinib in human plasma and urine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2016;15(12):2683–2692. DOI: 10.4314/tjpr.v15i12.21.
15. Tachet J., Versace F., Mercier T., Buclin T., Decosterd L. A., Choong E., Girardin F. R. Development and validation of a multiplex HPLC-MS/MS assay for the monitoring of JAK inhibitors in patient plasma. *Journal of Chromatography B*. 2023;1230:123917. DOI: 10.1016/j.jchromb.2023.123917.

Обзорная статья / Review article

УДК 615.11; 57.061

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1765

Check for updates

CC BY 4.0

Устаревшие латинские названия лекарственных растений в монографиях Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (обзор)

М. Н. Повыдыш✉, **М. Ю. Гончаров**

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

✉ **Контактное лицо:** Повыдыш Мария Николаевна. **E-mail:** maria.povydysh@pharminnotech.com

ORCID: М. Н. Повыдыш – http://orcid.org/0000-0002-7768-9059; М. Ю. Гончаров – http://orcid.org/0000-0002-9706-9850.

Статья поступила: 23.02.2024 **Статья принята в печать:** 23.05.2024 **Статья опубликована:** 24.05.2024

Резюме

Введение. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ XIV) включает 107 монографий, посвященных видам лекарственного растительного сырья. Целью исследования являлось выявление некорректных латинских названий лекарственных растений в монографиях ГФ XIV издания, изучение официально принятых латинских названий и таксономического положения лекарственных растений в соответствии с современной системой цветковых растений, обоснование необходимости внесения изменений в последующие издания фармакопеи.

Текст. Было обнаружено 44 случая некорректных латинских названий. Это объясняется тем, что при разработке новых фармакопейных статей были использованы либо исторически сложившиеся в российской фармакогнозии латинские названия, либо названия, бывшие законными на момент прошлого издания Фармакопеи. Основная масса номенклатурных изменений связана с принятием новой системы цветковых растений APG, базирующейся на молекулярно-генетических данных. В статье приведены перечни растений, для которых в ГФ XIV указано неверное название рода, вида, семейства или автора, с указанием корректного названия, а также комментарии о правилах современной ботанической номенклатуры.

Заключение. В связи с перспективами переработки монографий на лекарственное растительное сырье для Государственной фармакопеи XV издания, а также Фармакопеи ЕАЭС особенно актуальной становится гармонизация номенклатуры фармакопейных растений с современными международными требованиями.

Ключевые слова: Государственная фармакопея, лекарственное растительное сырье, латинские названия, ботаническая номенклатура

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

Вклад авторов. М. Н. Повыдыш – концепция статьи, сбор, анализ и обработка информации, подготовка графических материалов, подготовка текста к публикации. М. Ю. Гончаров – сбор и анализ информации, написание номенклатурных комментариев, подготовка текста к публикации.

Для цитирования: Повыдыш М. Н., Гончаров М. Ю. Устаревшие латинские названия лекарственных растений в монографиях Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(2):245–251. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1765

Outdated latin names of medicinal plants in the monographs of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition (review)

Maria N. Povydysh✉, **Mikhail Yu. Goncharov**

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

✉ **Corresponding author:** Maria N. Povydysh. **E-mail:** maria.povydysh@pharminnotech.com

ORCID: Maria N. Povydysh – http://orcid.org/0000-0002-7768-9059; Mikhail Yu. Goncharov – http://orcid.org/0000-0002-9706-9850.

Received: 23.02.2024 **Accepted:** 23.05.2024 **Published:** 24.05.2024

Abstract

Introduction. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV-th edition (SP XIV), includes 107 monographs devoted to medicinal plant materials. The purpose of the study was to identify incorrect Latin names of medicinal plants in the monographs of the XIV edition, study the officially accepted Latin names and taxonomic position of medicinal plants in accordance with the contemporary system of flowering plants, and justify the need to make changes in subsequent editions of the pharmacopoeia.

Text. 44 cases of incorrect Latin names were found. This is explained by the fact that when developing new pharmacopoeia monographs, either Latin names historically established in Russian pharmacognosy were used, or names that were legal at the time of the last edition of the Pharmacopoeia. The bulk of nomenclatural changes are associated with the adoption of the new APG system of flowering plants, based on molecular genetic data. The paper contains lists of plants for which the State Pharmacopoeia XIV contains an incorrect name of the genus, species, family or author, indicating the correct name, as well as comments on the rules of modern botanical nomenclature.

© Повыдыш М. Н., Гончаров М. Ю., 2024
© Povydysh M. N., Goncharov M. Yu., 2024

Conclusion. In connection with the prospects for processing monographs on medicinal plant raw materials for the State Pharmacopoeia XV-th edition, as well as the EAEU Pharmacopoeia, the harmonization of the nomenclature of pharmacopoeial plants with modern international requirements becomes especially relevant.

Keywords: State Pharmacopoeia, medicinal plant materials, Latin names, botanical nomenclature

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

Contribution of the authors. Maria N. Povydysh – article concept, collection, analysis and processing of information, preparation of graphic materials, writing the text. Mikhail Yu. Goncharov – collection and analysis of information, writing nomenclature comments, writing the text.

For citation: Povydysh M. N., Goncharov M. Yu. Outdated latin names of medicinal plants in the monographs of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition. *Drug development & registration*. 2024; 13(2): 245–251. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1765

ВВЕДЕНИЕ

В XIV издание Государственной фармакопеи Российской Федерации вошло 107 монографий, посвященных видам лекарственного растительного сырья, включая 25 новых монографий. Перечень фармакопейных растений был пересмотрен и дополнен и в настоящее время включает 142 наименования[1] [1]. При этом ряд латинских названий лекарственных растений, а соответственно, и видов растительного сырья, вошедших в ГФ XIV, не соответствует принятым в современной ботанической номенклатуре. Это объясняется тем, что при разработке новых фармакопейных статей были использованы либо исторически сложившиеся в российской фармакогнозии латинские названия, либо названия, бывшие законными на момент прошлых изданий Фармакопеи.

Вопрос о единых правилах ботанической номенклатуры впервые был поставлен на Международном ботаническом конгрессе в Лондоне. Проект подготовил А. Л. Декандоль, и через год, в 1867 г., на конгрессе в Париже Правила ботанической номенклатуры были приняты в качестве рекомендации. Первые Международные правила ботанической номенклатуры (International rules of botanical nomenclature) были опубликованы в 1906 году [2]. Только в 1950 г. на VII Международном ботаническом конгрессе в Стокгольме правила были переработаны в Международный кодекс ботанической номенклатуры [3]. С тех пор принципы наименования таксонов всех рангов для растений регулируются кодексом, который постоянно обновляется и утверждается на очередном международном конгрессе ботаников (на Мельбурнском конгрессе в 2011 г. кодекс получил новое название – Международный кодекс номенклатуры водорослей, грибов и растений, МКН) [4]. На сегодняшний день действующим считается кодекс, принятый на последнем Международном ботаническом конгрессе в Шеньчжене (Шеньчженьский кодекс). Он опубликован в 2018 году [5]. Цель кодекса заключается в том, чтобы каждая таксономическая группа имела только одно правильное название, принятое во всем мире. Кодекс устанавливает, помимо прочего, необходимость при описании нового вида ссылаться на физический образец растения, который в случае признания нового вида становится типовым образцом. Кодекс пересматривается на ботанических конгрессах каждые 6 лет и предназначен в первую очередь для использования практикующими систематиками, специализирующимися на определенном регионе или семействе растений и непосредственно участвующими в создании или пересмотре названий, используемых для этих растений. Но и в фармацевтической терминологии латинские названия растений должны определяться требованиями ботанической номенклатуры, изложенными в Международном кодексе номенклатуры водорослей, грибов и растений.

Напомним лишь наиболее общие правила: название вида всегда состоит из двух слов – названия рода и собственно видового эпитета. Данная биномиальная система была создана Карлом Линнеем и изложена в труде «Species Plantarum» [6]. Название обычно сопровождается фамилией (полной или сокращенной) автора, который первым его обнародо-

[1] Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. Т. IV. Лекарственное растительное сырье. Доступно по: https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol4/647/ Ссылка активна на 15.02.2024.

вал. Также один из основных принципов номенклатуры в МКН гласит: «Научные названия таксономических групп рассматриваются как латинские независимо от их происхождения». То есть ботанические названия подчиняются правилам грамматики латинского языка, в большинстве случаев имеют латинские окончания, но могут происходить из любого языка и даже быть искусственно составленными и не имеющими лексического значения.

The International Plant Names Index (IPNI) (Международный указатель названий растений) – указатель названий сосудистых растений, публикуемый в соответствии с Кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (ICN)[1] [5]. IPNI содержит данные о научных названиях сосудистых растений от семейства до внутривидовых рангов: корректное написание, автор, тип и первоописание. Номенклатурные данные и регистрация названий производятся Королевскими ботаническими садами Кью в сотрудничестве с Гербарием Гарвардского университета и Австралийским национальным гербарием [7]. Они доступны на сайте IPNI[2]. Помимо IPNI, Королевские ботанические сады курируют Всемирный контрольный список сосудистых растений – World Checklist of Vascular Plants (WCVP), который, помимо общепринятого названия растения, содержит сведения о его синонимах[3], ресурс «Растения мира онлайн» – Plants of the World Online (POWO), содержащий дополнительные визуальные и географические данные[4], и Службу названий лекарственных растений – Medical Plant Names Services (MPNS)[5], призванную отслеживать упоминания растений, применяемых в медицинских целях, используемых частей растений, а также общепринятые и фармакопейные названия. Каждый из этих ресурсов постоянно обновляется: исправляются ошибочные данные, добавляются новые названия и принимаются новые таксономические изменения.

Латинские научные названия растений имеют международный статус, поскольку употребляются в письменной и устной речи на всех литературных языках [8].

В конце декабря 2019 года Евразийская экономическая комиссия (ЕЭК) завершила научно-техническое редактирование 157 общих фармакопейных монографий, которые вошли в I издание Фармакопеи ЕАЭС [1]. В связи с этим особенно актуальной становится гармонизация номенклатуры фармакопейных растений с современными международными требованиями.

Основная масса номенклатурных изменений связана с принятием новой системы цветковых растений. Первая глобальная филогенетическая система цветковых, базирующаяся на молекулярно-генетических данных, была создана международной группой Angiosperm Phylogeny Group – APG (Группа по филогении покрытосеменных) и опубликована в 1998 г. в журнале «Annals of the Missouri Botanical Garden» в статье «An ordinal classification for the families of flowering plants» [9].

Система отличается от всех ранее известных систем классификации цветковых растений в первую очередь тем, что она базируется не на интегральных принципах доказательства родственных связей между таксонами, а на анализе нуклеотидных последовательностей трех генов – двух генов хлоропластной ДНК и одного из рибосомных генов ядерного генома. Внутри порядков, признаваемых по системе APG, по сравнению с традиционными системами произошел ряд изменений. Показательно, что состав групп, выделенных в результате молекулярных исследований, подтверждается результатами исследований, основанных и на других принципах (морфология, хемосистематика и др.).

В настоящее время основной молекулярно-филогенетической системой является уже четвертая версия системы, предложенная APG, – APG IV. Система APG IV была опубликована в марте 2016 г. в «Botanical Journal of Linnaean Society» в статье «An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV» [10]. Важнейшим ресурсом, отражающим положение дел в молекулярной филогенетике цветковых, является Angiosperm Phylogeny Website – APWeb, поддерживаемый на портале Миссурийского ботанического сада[6]. Всего в системе APG IV признано 416 семейств, отнесенных к 64 порядкам [11].

Целью исследования являлось выявление некорректных латинских названий лекарственных растений в монографиях ГФ XIV издания, изучение официально принятых латинских названий и таксономического положения лекарственных растений в соответствии с современной системой цветковых растений, обоснование необходимости внесения изменений в монографии ГФ XIV.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам системы APG IV некоторые традиционные семейства были разделены (например, сем. *Scrophulariaceae* – норичниковые) или перене-

[1] The International Plant Names Index (IPNI). Available at: https://www.ipni.org/about1. Accessed: 15.02.2024.

[2] The International Plant Names Index (IPNI). Available at: https://www.ipni.org/ Accessed: 15.02.2024.

[3] Royal Botanic Gardens, Kew (2021) World Checklist of Vascular Plants (WCVP), version 2.0. Available at: http://wcvp.science.kew.org. Accessed: 15.02.2024.

[4] Royal Botanic Gardens, Kew (2021) Plants of the world online. Available at: http://www.plantsoftheworldonline.org/ Accessed: 15.02.2024.

[5] Royal Botanic Gardens, Kew (2021) Medicinal plant names services, version 10. Available at: www.kew. org/mpns. Accessed: 15.02.2024.

[6] Angiosperm Phylogeny Website. Version 14. Available at: http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/ Accessed: 15.02.2024.

сены в состав других семейств (например, представители сем. *Tiliaceae* – липовые – рассматриваются в составе сем. *Malvaceae* – мальвовые), другие же, напротив, объединены (например, сем. *Lamiaceae* и *Verbenaceae*). В результате данных изменений принадлежность к семействам целого ряда фармакопейных лекарственных растений изменилась и должна быть скорректирована с учетом официально признаваемых на сегодняшний день семейств (таблица 1).

Таблица 1. Перечень растений, для которых в ГФ XIV указано неверное семейство, с указанием корректного названия семейства

Table 1. List of plants for which the wrong family is indicated in SP XIV, indicating the correct family name

№	Латинское название растения Latin name of the plant	Семейство по ГФ XIV Family according to SP XIV	Семейство, признаваемое по системе APG IV Family recognized by APG IV system
1	*Sambucus nigra* L.	*Sambucaceae*	*Viburnaceae*
2	*Valeriana officinalis* L.	*Valerianaceae*	*Caprifoliaceae*
3	*Viburnum opulus* L.	*Caprifoliaceae*	*Viburnaceae*
4	*Convallaria majalis* L.	*Liliaceae*	*Asparagaceae*
5	*Convallaria keiskei* Miq.	*Liliaceae*	*Asparagaceae*
6	*Dryopteris filix-mas* (L.) Schott	*Aspidiaceae*	*Polypodiaceae*
7	*Tilia cordata* Mill.	*Tiliaceae*	*Malvaceae*
8	*Tilia platyphyllos* Scop.	*Tiliaceae*	*Malvaceae*
9	*Digitalis purpurea* L.	*Scrophulariaceae*[1]	*Plantaginaceae*
10	*Digitalis grandiflora* Lam.	*Scrophulariaceae*	*Plantaginaceae*
11	*Digitalis purpurea* Ehrh.	*Scrophulariaceae*	*Plantaginaceae*

Примечание. [1] Для видов рода *Digitalis* приведены данные по ГФ XI.

Note. [1] For species of the genus *Digitalis*, data from the SP XI are provided.

Некоторые латинские названия фармакопейных растений используются российскими специалистами несмотря на то, что мировое научное сообщество знает данные растения под другими названиями, установленными Международным кодексом ботанической номенклатуры. Для ряда растений, однако, родовая принадлежность изменилась недавно по результатам современной таксономической классификации APG. Использование неофициальных латинских названий растений, пусть и традиционно принятых, порождает разночтения и нередко вызывает вопросы у рецензентов международных научных изданий. В таблице 2 приведены растения ГФ XIV, известные мировому научному сообществу под другими латинскими названиями.

Так, например, широко известный вид багульник болотный (*Ledum palustre*) перенесен в род рододендрон и его законное название – *Rhododendron tomentosum* Harmaja [12]. В последние годы по результатам молекулярно-филогенетических исследований был пересмотрен объем многих широко известных родов, в том числе включающих растения из ГФ XIV. Так, при ревизии рода *Polygonum* в близкий, но самостоятельный род *Persicaria* были перенесены горец перечный и г. почечуйный. А широко известные бурые водоросли ламинария японская и л. сахаристая перенесены в род *Saccharina*. При этом для видов *Polygonum persicaria* и *Laminaria saccharina* новые комбинации с видовым эпитетом стали невозможными из-за образования тавтонима, что не допускается статьей 23.4 кодекса. Поэтому законными названиями этих видов являются соответственно *Persicaria maculosa* Gray и *Saccharina latissima* (L.) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl et G.W. Saunders как самые ранние, законно обнародованные и базирующиеся на типе видов *Polygonum persicaria* и *Laminaria saccharina* (статья 11.4 кодекса).

Таблица 2. Перечень растений, для которых в ГФ XIV приведено устаревшее название рода, с указанием официально принятого названия

Table 2. List of plants for which the outdated genus name is given in SP XIV, indicating the officially accepted name

№	Латинское название по ГФ XIV Latin name according to SP XIV	Официально принятое название Officially adopted name
1	*Ledum palustre* L.	*Rhododendron tomentosum* Harmaja
2	*Polygonum hydropiper* L.	*Persicaria hydropiper* (L.) Delarbre
3	*Polygonum persicaria* L.	*Persicaria maculosa* Gray
4	*Laminaria japonica* L.	*Saccharina japonica* (J.E. Areschoug) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl & G.W. Saunders
5	*Laminaria saccharina* (L.) Lam	*Saccharina latissima* (L.) C.E. Lane, C. Mayes, Druehl et G.W. Saunders
6	*Amygdalus communis* var. *dulcis*	*Prunus amygdalus* Batsch
7	*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert	*Matricaria chamomilla* L.
8	*Cassia acutifolia* Del.	*Senna alexandrina* var. *alexandrina*
9	*Cassia angustifolia* Vahl	*Senna alexandrina* var. *alexandrina*
10	*Aerva lanata* (L.) Juss. ex Schult.	*Ouret lanata* (L.) Kuntze
11	*Crataegus korolkowi*i L. Henry	*Crataegus chlorocarp*a Lenne et K.Koch
12	*Crataegus orientobaltic*a Cinovskis	*Crataegus monogyn*a Jacq.
13	*Crataegus curvisepal*a Lindm.	*Crataegus rhipidophylla* Gand. var. *rhipidophyll*a

Различия в названиях растений, принятых в ГФ XIV, с законными с точки зрения современной ботаники могут быть связаны с изменившимися по дан-

ным молекулярно-филогенетических исследований объемами многих родов. Так, например, весь комплекс видов ромашки сейчас относится к роду *Matricaria*. Поэтому вид ромашка аптечная должен называться *Matricaria chamomilla* L. Название *M. recutita* L. не может применяться, так как основано на другом типовом образце и является синонимом (либо может рассматриваться для самостоятельного вида)[1] [13].

Все представители, ранее относившиеся к группе (подсемейству) *Prunoideae* сем. *Rosaceae*, на основании современных исследований объединены в один род *Prunus*. Поэтому для вида миндаль обыкновенный принятым сегодня названием является *Prunus amygdalus* Batsch (соответственно для абрикоса – *P. armeniaca* L., а для персика – *P. persica* (L.) Batsch). Встречающееся иногда название *P. dulcis* (Mill.) D.A. Webb является незаконным, так как базируется на названии *Amygdalus dulcis* Mill., являющимся более поздним синонимом.

Очень крупный род *Cassia,* напротив, оказался полифилетичным и был разделен на роды *Cassia, Senna* и *Chamaecrista*. Таким образом, для фармакопейных видов *Cassia acutifolia* Delile и *C. angustifolia* Vahl законным названием является *Senna alexandrina* Mill., так как эти виды перенесены в род сенна. При этом различия между образцами, относящимися к двум разным видам, в настоящее время не считаются значимыми даже на уровне разновидности.

Еще одним примером подобного рода стало выделение в качестве самостоятельного рода *Ouret* из рода *Aerva*. В числе прочих видов к этому роду теперь относится и широко известное растение пол-пола, или эрва шерстистая, законное латинское название которого – *Ouret lanata* (L.) Kuntze. На русском языке, как мы считаем, можно использовать традиционное название растения или заменить его на уретия шерстистая.

Несоответствие названия вида по ГФ XIV принятому в современной ботанике может быть связано с изменением понимания объема вида в современной систематике. Так, известный вид ортосифон тычиночный (*O. stamineus* Benth.) сейчас рассматривается как синоним к широко распространенному виду *O. aristatus* (Blume) Miq. И хотя дата опубликования для *O. stamineus* (1830) более ранняя, чем для *O. aristatus*, обнародованного в 1858 году, именно последнее название, согласно принципу приоритета, считается законным, так как базируется на типе вида *Ocimum aristatum* Blume, этот вид был описан в 1826 году [14].

Еще одной причиной несоответствия названий растений – источников ЛРС в ГФ XIV принятым на сегодняшний день является различный взгляд на объем видов. Особенно это касается представителей родов (*Rosa, Crataegus*) с большим количеством официнальных видов, в том числе узколокальных. Многие названия, ранее относившиеся к самостоятельным видам, сейчас рассматриваются как синонимы к более широко распространенным видам. На наш взгляд, такие названия можно не упоминать при переработке фармакопейных статей на данные виды сырья.

Так, *Atropa caucasica* Kreyer, применяемый вместе с *Atropa bella-donna* L. в качестве источника сырья «Красавки листья», в настоящее время не признается самостоятельным видом и включен в состав *Atropa bella-donna* L. Второй случай такого рода: вид *Rubia iberica* (Fisch. ex DC.) K. Koch, указанный в ГФ XIV как самостоятельный вид, включается в состав *Rubia tinctorum* L.

При определении несоответствий стоит обратить внимание и на ситуацию с широко известным и распространенным лекарственным видом одуванчик лекарственный – *Taraxacum officinale* Wigg. Вопрос об объеме этого вида в современной систематике весьма сложен. Одуванчик лекарственный является апомиктом, то есть образование плодов и семян у него происходит без оплодотворения. Поэтому ряд исследователей считает, что морфологически отличающиеся и географически изолированные от типового образца популяции могут быть описаны как отдельные виды, так как скрещивание между ними невозможно. Поэтому в разное время было описано несколько десятков «микровидов». Однако, учитывая тот факт, что большинство из этих видов по химическому профилю практически неразличимы, нам представляется целесообразным отнести их к одному виду *Taraxacum officinale* s.l. Этот подход, на наш взгляд, должен применяться и к другим лекарственным видам-апомиктам.

Международный указатель названий растений (IPNI) следует рекомендациям, изложенным в работе Brummitt & Powell (1992), в соответствии с которыми стандартной формой указания автора является фамилия, или ее аббревиатура (например, Adans от Adanson), или, реже, ее сокращение (например, Michx от Michaux), с инициалами или без [15]. Авторство таксонов, хотя и не несет смысловой нагрузки, должно быть скорректировано в соответствии с официально признаваемыми в ботанической номенклатуре первоописаниями видов [16]. Указание автора после видового названия растения позволяет проверить исходные сведения о публикации названия и при необходимости найти соответствующие типовые образцы. В названиях растений ГФ XIV встречаются как неверные ссылки на авторство видов, так и (в большинстве случаев) некорректные сокращения фамилий авторов (таблица 3). Эти названия могут являться двусмысленными, поскольку определенная комбинация названий рода и вида могла быть опуб-

[1] Если рассматривать род *Chamomilla* как самостоятельный, то законным названием для ромашки аптечной во избежание тавтонима будет *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert.

ликована более одного раза в разное время разными авторами. Эти названия известны как омонимы и часто относятся к совершенно разным видам.

Таблица 3. Перечень растений, для которых в ГФ XIV неверно указан автор вида, с указанием официально принятого названия

Table 3. List of plants for which the author of the species is incorrectly indicated in the SP XIV, indicating the officially accepted name

№	Название растения по ГФ XIV Name of the plant according to SP XIV	Официально признанное латинское название Officially recognized Latin name
1	*Melilotus officinalis* (L.) Desr.	*Melilotus officinalis* (L.) Lam.
2	*Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl.	*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.
3	*Potentilla erecta* L. Raeusch.	*Potentilla erecta* (L.) Raeusch.
4	*Arctium minus* (Mill) Bernh.	*Arctium minus* (Hill) Bernh.
5	*Populus suaveolens* Fisch.	*Populus suaveolens* Fisch. ex Poit. & A. Vilm.
6	*Cucurbita maxima* Duch.	*Cucurbita maxima* Duchesne
7	*Cucurbita moschata* (Duch.) Poir.	*Cucurbita moschata* Duchesne
8	*Viola arvensis* Murr.	*Viola arvensis* Murray
9	*Rosa beggeriana* Schrenk	*Rosa beggeriana* Schrenk ex Fisch. & C.A. Mey.
10	*Crarategus pentagyna* Waldst. et Kit.	*Crarategus pentagyna* Waldst. et Kit. ex Willd.

Виды, являющиеся результатом скрещивания (гибриды), отмечаются знаком «×». Это относится, в частности, к *Populus canadensis*, представляющему собой гибрид *P. deltoides* и *P. nigra*. Корректное обозначение вида – *Populus* × *canadensis* Moench. Более известный пример: *Mentha piperita* L. (гибрид *M. aquatica* и *M. spicata*) обозначается как *Mentha* × *piperita* L.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным Allkin и Patmore [17], ежегодно публикуется около 10 000 статей, содержащих изменения научных названий высших растений, из которых не менее 1500 изменений относятся к лекарственным растениям.

Разработка новых фармакопейных статей, равно как и любые исследования в области лекарственного растительного сырья, требуют указания точного, недвусмысленного и признаваемого во всем мире названия вида используемого растения. Ботаническая латинская номенклатура является единой, универсальной и однозначно определяет конкретный вид растения. Однако необходима правильная интерпретация научных названий: существуют синонимы и омонимы; мнения относительно правильного таксономического положения растения и, соответственно, официально признаваемые названия растений могут меняться по мере накопления новых данных, в частности результатов молекулярно-филогенетических исследований, приводящих к изменению принятой таксономической иерархии.

В связи с перспективами переработки монографий на лекарственное растительное сырье для Государственной фармакопеи XV издания, а также Фармакопеи ЕАЭС особенно актуальной становится гармонизация номенклатуры фармакопейных растений с современными международными требованиями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shikov A. N., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Luzhanin V. G., Pozharitskaya O. N. Medicinal plants from the 14th edition of the Russian Pharmacopoeia, recent updates. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;268:113685. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113685.
2. Briquet J. International rules of botanical nomenclature adopted by the International Botanical Congress of Vienna, 1905. Berlin: G. Fischer; 1906. 99 p.
3. Lanjouw J., Baehni C., editors. International Code of Botanical Nomenclature: adopted by the Seventh International Botanical Congress. Volume 3. Regnum vegetabile. Stockholm: Chronica Botanica Company; 1952. 228 p.
4. Barrie F. R., Buck W. R., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D. L., Herendeen P. S., Knapp S., Marhold K., Prado J., Prud'homme Van Reine W. F., Smith G. F., Wiersema J. H., Turland N. J. International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code). Königstein: A.R.G. Gantner Verlag KG; 2012.
5. Turland N. J., Wiersema J. H., Barrie F. R., Greuter W., Hawksworth D. L., Herendeen, P. S., Knapp S., Kusber W.-H., Li D.-Z., Marhold K., May T. W., McNeill J., Monro A. M., Prado J., Price M. J., Smith G. F., editors. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code). Glashütten: Koeltz Botanical Books; 2018. DOI: 10.12705/Code.2018.
6. Linne C. Species plantarum. Berolini: Impensis G.C. Nauk; 1799.
7. Croft J., Cross N., Hinchcliffe S., Lughadha E. N., Stevens P. F., West J. G., Whitbread G. Plant Names for the 21st Century: The International Plant Names Index, a Distributed Data Source of General Accessibility. *Taxon*. 1999;48(2):317–324. DOI: 10.2307/1224436.
8. Туманова О. Т. Латинско-русский словарь названий растений с указателем русских эквивалентов. Москва: Лориэн; 1995.
9. An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1998;85(4):531–553. DOI: 10.2307/2992015.
10. Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Fay M. F., Byng J. W., Judd W. S., Soltis D. E., Mabberley D. J., Sennikov A. N., Soltis P. S., Stevens P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016;181(1):1–20, DOI: 10.1111/boj.12385.
11. Гельтман Д. В. Современные системы цветковых растений. *Ботанический журнал*. 2019;104(4):503–527. DOI: 10.1134/S0006813619040045.
12. Stace C. New Flora of the British Isles. Buckinghamshire: C&M Floristics; 2019. 1266 p.
13. Lozano T., Salvador, editors. Flora Iberica. Volume 16(III). Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC; 2019.
14. Ridley H. N., editor. The Flora of the Malay Peninsula. London: L. Reeve & Co., Ltd. 1923.
15. Brummitt R. K., Powell C. E., editors. Authors of Plant Names: a list of authors of scientific names of plants, with recommended standard forms of their names, including abbreviations. Edinburgh: Royal Botanic Gardens; 1992. 732 p.

16. Гельтман Д. В., Соколова И. В. Ботаническая номенклатура: специфика и современные тенденции развития. *Труды Зоологического института РАН*. 2013;2:230–237.
17. Allkin B., Patmore K. Botanical Nomenclature for Herbal Medicines and Natural Products: It's Significance for Pharmacovigilance. *Pharmacovigilance for Herbal and Traditional Medicines*. 2022;141–175. DOI: 10.1007/978-3-031-07275-8_8.

REFERENCES

1. Shikov A. N., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Luzhanin V. G., Pozharitskaya O. N. Medicinal plants from the 14th edition of the Russian Pharmacopoeia, recent updates. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;268:113685. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113685.
2. Briquet J. International rules of botanical nomenclature adopted by the International Botanical Congress of Vienna, 1905. Berlin: G. Fischer; 1906. 99 p.
3. Lanjouw J., Baehni C., editors. International Code of Botanical Nomenclature: adopted by the Seventh International Botanical Congress. Volume 3. Regnum vegetabile. Stockholm: Chronica Botanica Company; 1952. 228 p.
4. Barrie F. R., Buck W. R., Demoulin V., Greuter W., Hawksworth D. L., Herendeen P. S., Knapp S., Marhold K., Prado J., Prud'homme Van Reine W. F., Smith G. F., Wiersema J. H., Turland N. J. International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code). Königstein: A.R.G. Gantner Verlag KG; 2012.
5. Turland N. J., Wiersema J. H., Barrie F. R., Greuter W., Hawksworth D. L., Herendeen, P. S., Knapp S., Kusber W.-H., Li D.-Z., Marhold K., May T. W., McNeill J., Monro A. M., Prado J., Price M. J., Smith G. F., editors. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code). Glashütten: Koeltz Botanical Books; 2018. DOI: 10.12705/Code.2018.
6. Linne C. Species plantarum. Berolini: Impensis G.C. Nauk; 1799.
7. Croft J., Cross N., Hinchcliffe S., Lughadha E. N., Stevens P. F., West J. G., Whitbread G. Plant Names for the 21st Century: The International Plant Names Index, a Distributed Data Source of General Accessibility. *Taxon*. 1999;48(2):317–324. DOI: 10.2307/1224436.
8. Tumanova O. T. Latin-Russian dictionary of plant names with an index of Russian equivalents. Moscow: Lorien; 1995. (In Russ.)
9. An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1998;85(4):531–553. DOI: 10.2307/2992015.
10. Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Fay M. F., Byng J. W., Judd W. S., Soltis D. E., Mabberley D. J., Sennikov A. N., Soltis P. S., Stevens P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016;181(1):1–20, DOI: 10.1111/boj.12385.
11. Geltman D. V. Modern systems of flowering plants. *Botanicheskij zhurnal*. 2019;104(4):503–527. (In Russ.) DOI 10.1134/S0006813619040045.
12. Stace C. New Flora of the British Isles. Buckinghamshire: C&M Floristics; 2019. 1266 p.
13. Lozano T., Salvador, editors. Flora Iberica. Volume 16(III). Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC; 2019.
14. Ridley H. N., editor. The Flora of the Malay Peninsula. London: L. Reeve & Co., Ltd. 1923.
15. Brummitt R. K., Powell C. E., editors. Authors of Plant Names: a list of authors of scientific names of plants, with recommended standard forms of their names, including abbreviations. Edinburgh: Royal Botanic Gardens; 1992. 732 p.
16. Geltman D. V., Sokolova I. V. Botanical nomenclature: specifics and modern tendencies of development. *Trudy Zoologicheskogo instituta RAN*. 2013;2:230–237. (In Russ.)
17. Allkin B., Patmore K. Botanical Nomenclature for Herbal Medicines and Natural Products: It's Significance for Pharmacovigilance. *Pharmacovigilance for Herbal and Traditional Medicines*. 2022;141–175. DOI: 10.1007/978-3-031-07275-8_8.

научно-технический журнал

ЛАБОРАТОРИЯ И ПРОИЗВОДСТВО

ИЗДАНИЕ ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛОВ

в химии и биохимии, науках о жизни, нано- и микротехнологиях, научном приборостроении

О ЖУРНАЛЕ

ПЕРИОДИЧНОСТЬ: 6 номеров в год.
ТИРАЖ: 4500 экз.
ОБЪЕМ: 120 полос.

ОСНОВНАЯ ТЕМА: создание и исследование новых веществ и материалов – от фундаментальной науки до промышленных производств. Методы, технологии, решения, инструменты.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР: Алексей Константинович Буряк, член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор, директор Института физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН.

КОНТАКТЫ

ЗАМ. ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА: Наталья Василевич, к.х.н., nvasile2003@yahoo.com
НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР: Алла Липеева, к.х.н., mond_05@list.ru
РЕКЛАМА, ПОДПИСКА: Ольга Шахнович, director@labpro-media.ru; rec-tech@mail.ru

ПОДПИСКА

Каталог “Урал-Пресс”, подписной индекс: 013680.

labpro-media.ru

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этичного поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля **«Разработка и регистрация лекарственных средств»** является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале **«Разработка и регистрация лекарственных средств»**, должно соответствовать науке:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармаколо- гия (медицинские науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.
2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

   Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – http://www.consort-statement.org

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате А4 Microsof Word (*doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах, и не повторять название статьи.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: http://elibrary.ru

Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производителя и страну происхождения [пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдранол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацеутикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, страну происхождения [пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете, в прослеживаемом формате, с четкими, разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т. д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n. Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т. д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте http://www.translit.ru

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychophar-macogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: http://www. nlm.nih.gov/citingmedicine.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B . Obesity among individuals with serious mental illness. Acta Psychiatr Scand. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/

Варианты библиографического описания патентов: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте http://search.crossref.org/ или https://www. citethisforme.citethisforme.com.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *tif, *jpg, *cdr, *ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.

научно-производственный журнал

РРЛС

разработка и регистрация лекарственных средств

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