

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ

ВАК Scopus®



DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

XVIII конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств»

ЦФА | центр
фармацевтической
аналитики



Конгресс состоится
26–27 февраля 2025 г. в Москве

стр. 10

Том 13, № 4. 2024
Volume 13, No. 4. 2024

Summum bonum medicinae sanitas

+7 495 281 81 11
info@cpha.ru
www.cpha.ru
117149, Москва,
Симферопольский бульвар, д. 8



ЦЕНТР ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АНАЛИТИКИ

Сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств

ПОЧЕМУ МЫ?



СЕРТИФИКАТЫ

Первая в России биоаналитическая лаборатория, сертифицированная по GLP



СОВРЕМЕННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Все исследования выполняются на современном проверенном оборудовании



ОПЫТ

100+ исследований
выполняются ежегодно



ЛУЧШИЕ СПЕЦИАЛИСТЫ

В составе лаборатории
работают 30+ сотрудников



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2024. Том 13, № 4

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2024. Volume 13, No. 4

Цели и задачи журнала

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

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств.

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

Третий раздел описывает аналитические методики контроля качества.

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

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

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

Бахрушина Е. О. – к. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 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

Бондарева И. Б. – д. биол. н., профессор кафедры общей и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», 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, Москва, Россия

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

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

Каракулова Е. В. – д. фарм. н., 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 А. Е. – 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 фармациии Медицинского института непрерывного образования, ФГБОУ ВО «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 технологии 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 технологии 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: 117149, 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: 117149, Россия, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, пом. 1/1
Издатель	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117149, 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, 117149, 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

Elena O. Bakhrushina – Cand. of Sci. (Pharm.), I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 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

Irina B. Bondareva – Dr. of Sci. (Biol.), Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, 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

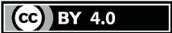
Olga V. Trineeva – Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

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

Wrood S. Al-Khfaj – 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, 117149, Russia I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia Siberian State Medical University Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
Online version founders	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, Russia
Publisher	LLC "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA") Address: room 1/1, 8, Simferopol Boulevard, Moscow, 117149, 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, 117149, 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

Мероприятия 24

Поиск и разработка новых лекарственных средств

Актуализация сведений о микозах и противогрибковых препаратах для поиска эффективных платформ для производства новых соединений тиазолов
Т. Ф. Черных, О. Ю. Богданова, Е. В. Флисюк, Ю. М. Коцур, К. О. Сидоров, И. А. Наркевич 27

Перспективные клеточные системы для таргетной доставки нано- и микроносителей, нагруженных лекарственными или биологическими молекулами (обзор)
Л. А. Мирошниченко, Т. Ю. Полякова, И. А. Хлусов, Е. Ю. Авдеева, В. Г. Лужанин, М. Ю. Хлусова, М. В. Белоусов 45

Фармацевтическая технология

Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: классификация, составные компоненты, способы изготовления и стабилизации. Часть 1 (обзор)
С. С. Осочук, Ю. М. Коцур, О. Н. Пожарицкая, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова, С. Д. Малков, К. О. Зарифи, И. А. Титович, Е. К. Красова, А. Н. Шиков 60

Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: визуализация и фармакокинетика. Часть 2 (обзор)
О. Н. Пожарицкая, Ю. М. Коцур, С. С. Осочук, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова, С. Д. Малков, К. О. Зарифи, И. А. Титович, Е. К. Красова, А. Н. Шиков 78

Твердые дисперсные системы как способ создания лекарственных форм с замедленным высвобождением из расплывающихся субстанций
О. А. Терентьева, Ю. М. Коцур, И. А. Наркевич, Е. В. Флисюк 99

Изучение растворимости нифедипина в физических смесях и твердых дисперсиях
Н. Д. Дахма, Е. Т. Жилиякова, М. Д. Дахма 107

Применение напрессованных покрытий для создания таблеток пролонгированного действия на основе гигроскопичных субстанций
Ю. М. Коцур, О. А. Терентьева, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич 113

Разработка состава топической формы производного тиадиазола
Ю. М. Коцур, Т. Ф. Черных, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич 121

Разработка и исследование мукоадгезивных микрокапсул для интраназальной доставки леводопы
Д. С. Гордеева, В. В. Хуторянский, Р. И. Мустафин 129

Методы анализа лекарственных средств

Разработка методики жидкостной хроматографии для анализа масляного экстракта полыни цитварной
С. К. Ордабаева, А. Д. Серикбаева, Ш. Х. Фаршад, Г. Бахыткызы 139

Количественное определение дубильных веществ методами титриметрии и спектрофотометрии в сырье некоторых представителей рода *Rumex* трех сроков вегетации
А. М. Полуянов, А. Е. Савельева, А.-Д. Койнова, А. Г. Полухина, Ф. И. Гаджиева, А. Ю. Соколова, А. М. Анцышкина, Н. В. Бобкова 148

Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения
Р. Э. Ермаченков, А. Л. Марков, М. М. Агаев, Е. В. Бурцева, И. И. Тернинко 161

Оценка рисков воздействия тяжелых металлов и мышьяка, поступающих в организм человека с лекарственными растительными препаратами
М. С. Галенко, И. В. Гравель 180

Доклинические и клинические исследования

Валидация биоаналитической методики определения и оценка фармакокинетики нового лекарственного средства на основе полисахарида аира болотного в эксперименте на лабораторных животных С. В. Кривошеков, Е. А. Яновская, Р. В. Гурто, О. С. Брюшнина, Д. А. Исаков, А. В. Зыкова, Ю. Г. Зюзькова, А. М. Гурьев, В. В. Удут, М. В. Белоусов	190
Влияние кетогенной диеты на липидный профиль у пациентов с сахарным диабетом второго типа Фадва Гассан, Атека Мохаммед, Зейнаб Казим	202
Кросс-валидация методик количественного определения феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различной экстракции А. И. Платова, И. И. Кузьмин, Д. В. Иващенко, И. И. Мирошниченко	212
О возможном механизме влияния эмпаглифлозина на сердечно-сосудистую смертность А. В. Карпушев, М. В. Краснова, Д. Ю. Ивкин, В. Б. Михайлова, Е. С. Клименко, С. В. Оковитый, А. Н. Куликов	223
Влияние сапонина таурозида Sx1 на продолжительность жизни и экспрессию рецепторов к витамину D в ткани печени мышей на фоне гриппозной инфекции Т. П. Сатаева, В. Ю. Малыгина, Т. П. Макашиш, М. А. Кривенцов, А. К. Гуртовая	231
Изучение фармакокинетики нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамиды на крысах И. И. Яичков, М. К. Корсаков, Н. Н. Вольхин, С. С. Петухов, А. Н. Тюшина, В. Е. Зайкова, О. Э. Лазарянц	238
Противогрибковая активность нового производного тиадиазола при экспериментальной кандидозе у мышей Д. Ю. Ивкин, А. В. Караваева, Т. Ф. Черных, М. В. Краснова	251
Изучение фармакокинетики производного малоновой кислоты этмабена в рамках I фазы клинического исследования П. К. Карнакова, К. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, Н. С. Багаева, М. О. Попова, Д. Ю. Ивкин, О. А. Арчакова, И. Е. Шохин, И. А. Наркевич	259
Регуляторные вопросы	
Перспективы оптимизации лекарственного обеспечения педиатрических пациентов на основе развития фармацевтического рынка в сегменте лекарственных препаратов для детей О. Д. Немятых, Е. А. Ковалёва, И. А. Наркевич	272

CONTENTS

Introduction	10
Events	24
Research and development of new drug products	
Updating information of mycoses and antifungal medicines to find effective platforms for the production of new thiazole compounds	
Tatyana F. Chernykh, Olga Yu. Bogdanova, Elena V. Flisyuk, Yuliya M. Kozur, Kirill O. Sidorov, Igor A. Narkevich	27
Promising cell systems for targeted delivery of nano- and microcarriers loaded with drugs or biomolecules (review)	
Larisa A. Miroshnichenko, Tatiana Yu. Polyakova, Igor A. Khlusov, Elena Yu. Avdeeva, Vladimir G. Luzhanin, Marina Yu. Khlusova, Mikhail V. Belousov	45
Pharmaceutical Technology	
Liposomes – metabolically active drug transport systems: classification, components, preparation methods, and stabilization. Part 1 (review)	
Sergey S. Osochuk, Yuliya M. Kotsur, Olga N. Pozharitskaya, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova, Sergey D. Malkov, Kseniya O. Zarifi, Irina A. Titovich, Elena K. Krasova, Alexander N. Shikov	60
Liposomes – metabolically active drug transport systems: visualization and pharmacokinetic. Part 2 (review)	
Olga N. Pozharitskaya, Yuliya M. Kozur, Sergey S. Osochuk, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova, Sergey D. Malkov, Kseniya O. Zarifi, Irina A. Titovich, Elena K. Krasova, Alexander N. Shikov	78
Production sustained release dosage forms from deliquescent substances by solid dispersion systems	
Oksana A. Terenteva, Yuliya M. Kotsur, Igor A. Narkevich, Elena V. Flisyuk	99
Study of nifedipine solubility in physical mixtures and solid dispersions	
Nermin Joseph Dahma, Elena T. Zhilyakova, Michel Joseph Dahma	107
Application of press-coatings for the development of prolonged release tablets based on hygroscopic substances	
Yuliya M. Kotsur, Oksana A. Terenteva, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich	113
Development of a topical formulation of a thiadiazole derivative	
Yuliya M. Kotsur, Tatyana F. Chernykh, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich	121
Development and study of mucoadhesive microcapsules for the nasal levodopa delivery	
Daria S. Gordeeva, Vitaliy V. Khutoryanskiy, Rouslan I. Moustafine	129
Analytical Methods	
Development of a liquid chromatography method for the analysis of oil extract of artemisia cina	
Saule K. Ordabayeva, Aigul D. Serikbayeva, Hosseini Shirazi Farshad, Gaukhar Bakhytkyzy	139
Quantitative determination of tannins by titrimetry and spectrophotometry in raw materials of some representatives of the genus <i>Rumex</i> of three growing seasons	
Andrey M. Poluyanov, Anna E. Savelyeva, Anna-Daniella Koinova, Alexandra G. Polukhina, Fidan I. Gadzhieva, Anna Yu. Sokolova, Alla M. Antsyshkina, Natalia V. Bobkova	148
Study of component features of essential oils of <i>Rosmarinus officinalis</i> and <i>Salvia sclarea</i> of Crimean origin	
Roman E. Ermachenkov, Andrey L. Markov, Musafir M. Agaev, Elena V. Burtseva, Inna I. Terninko	161
Assessment of the risks of impacts of heavy metals and arsenic entering the human body with herbal medicines	
Marta S. Galenko, Irina V. Gravel	180

Preclinical and clinical study

Pharmacokinetics of a new drug based on polysaccharide from *acorus calamus* in an experiment on laboratory animals

Sergei V. Krivoshekov, Elena A. Yanovskaya, Roman V. Gurto, Olga S. Bryushinina, Denis A. Isakov, Anastasia V. Zykova, Yulia G. Zyuz'kova, Artem M. Guryev, Vladimir V. Udut, Mikhail V. Belousov 190

The effect of the keto diet on lipid profile with type two diabetic patients

Fadwa Ghassan, Ateka Mohammed, Zainab Kazim 202

Cross-validation of methods for the quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at various extractions

Angelina I. Platova, Ivan I. Kuzmin, Dmitriy V. Ivaschenko, Igor I. Miroshnichenko 212

Possible mechanism of effect of the empagliflozin on cardiovascular mortality

Alexey V. Karpushev, Marina V. Krasnova, Dmitry Yu. Ivkin, Valeria B. Mikhailova, Ekaterina S. Klimenko, Sergey V. Okovityi, Alexander N. Kulikov 223

Influence of saponin tauroside Sx1 on lifespan and expression of vitamin D receptors in the liver tissue of mice with influenza infection

Tatiana P. Sataieva, Veronika Yu. Maligina, Tatiana P. Makalish, Maxim A. Kriventsov, Anna K. Gurtovaya 231

Pharmacokinetic study of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats

Ilya I. Yaichkov, Mikhail K. Korsakov, Nikita N. Volkhin, Sergey S. Petukhov, Alena N. Tyushina, Valeria E. Zaykova, Olga E. Lasaraynz 238

Antifungal activity of thiadiazole derivative in experimental candidiasis in mice

Dmitry Yu. Ivkin, Anna V. Karavaeva, Tatyana F. Chernykh, Marina V. Krasnova 251

Phase I pharmacokinetic study of etmaben, a malonic acid derivative

Polina K. Karnakova, Kseniia K. Karnakova, Timofey N. Komarov, Natalia S. Bagaeva, Mariia O. Popova, Dmitry Yu. Ivkin, Olga A. Archakova, Igor E. Shohin, Igor A. Narkevich 259

Regulatory Issues

Prospects for optimizing the provision of medicines to pediatric patients based on the development of the pharmaceutical market in the segment of medicines for children

Oksana D. Nemyatykh, Eva A. Kovaleva, Igor A. Narkevich 272

Редакционная статья / Editorial article

XVIII конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств» состоится 26–27 февраля в г. Москве

26 и 27 февраля 2025 года в Москве пройдет ежегодный двухдневный конгресс «Разработка и регистрация лекарственных средств». Тематика конгресса традиционно охватывает все ключевые этапы жизненного цикла лекарственного средства, от разработки до пострегистрационных исследований.

XVIII Congress "Drug development and registration" will take place on February 26–27 in Moscow

On February 26 and 27, 2025, the annual two-day congress "Drug development and registration" will be held in Moscow. The topics of the congress traditionally cover all key stages of the life cycle of a drug, from development to post-registration studies.



Конгресс «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» проводится ежегодно с 2012 года и за это время стал уважаемым и ожидаемым отраслевым мероприятием. В 2024 году в конгрессе приняли участие более 170 слушателей, с нами были 60+ докладчиков, нас поддержали более 20 партнеров.

Организаторы конгресса – научно-производственный журнал «**Разработка и регистрация лекарственных средств**», ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», научный журнал «Гербариум», ООО «Сайнтифик Комплайнс».

В программе предстоящего конгресса запланировано несколько секций, где мы обсудим меры поддержки отечественных производителей, поговорим о регистрации лекарственных средств и регуляторных вопросах действующего законодательства, технологическом суверенитете, трансфере технологий в здравоохранении и другие темы.

В секции «**Клинические, доклинические и «околоклинические» исследования: современные тенденции и перспективы**» обсудим актуальные вопросы проведения клинических, доклинических исследований, их аналитического сопровождения. Затронем

тему регуляторных аспектов и изменения требований к проведению исследований, а также тренды развития отрасли. Своим мнением о проблеме поделятся ведущие представители клинических и биоаналитических центров, регуляторных органов, представители ведущих производителей и разработчиков лекарственных средств. В рамках секции **«Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств»** мы поговорим о различных этапах исследования биотехнологических препаратов – от ранней разработки до регистрации. Обсудим современные тренды в аналитической разработке, а также подходы к оценке биоаналогичности *in vitro* и *in vivo*, особенности исследований отдельных групп биологических препаратов.

В рамках секции **«Меры поддержки отечественных производителей»** мы подробно рассмотрим актуальные программы грантовой поддержки высокотехнологичных компаний, обсудим механизмы внедрения инноваций, применяемые в системе здравоохранения Москвы.

В рамках предстоящего конгресса запланированы круглые столы и мастер-классы. Мы поговорим, является ли система менеджмента качества (СМК) лишь дополнительной нагрузкой на ресурсы компании или это стратегическая инвестиция в ее будущее. Также обсудим влияние цифровизации и автоматизации на принципы управления качеством. В ходе дискуссии мы ответим на вопрос о нехватке человеческих ресурсов и выясним, можно ли считать СМК причиной этому. Кроме того, мы проанализируем успешные примеры внедрения СМК и работу над ошибками, когда цели не оправдывают вложенные средства.

Круглый стол **«Исследования лекарственного растительного сырья»** посвящен вопросам стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья, растительных препаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения в свете требований фармакопей Российской Федерации и Евразийского экономического союза.

Специалисты поделятся своими взглядами на подходы к оценке фармакологической активности субстанций растительного и иного природного происхождения, а также выскажутся о перспективах производства отечественных стандартных образцов природных соединений.

В рамках секции **«Актуальные вопросы разработки, регистрации, производства и изготовления РФЛП»** мы затронем следующие аспекты: создание и вывод в обращение на рынок перспективных РФЛП, особенности регулирования обращения РФЛП, регуляторные пути внедрения РФЛП в медицинскую практику. Спикеры поделятся своим опытом в формировании регистрационного досье РФЛП, а также расскажут о проведении доклинических и клинических исследований этих препаратов. Кроме того, мы



обсудим практические аспекты изготовления РФЛП в производственных аптеках.

Впервые в рамках конгресса молодые ученые и специалисты смогут представить свои научные работы наравне с ведущими представителями фармацевтической отрасли.

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

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

Ознакомиться с программой конгресса и зарегистрироваться



XVIII конгресс «РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

Москва | 26–27 фев 2025



В программе конгресса в этом году:

- Меры поддержки отечественных производителей
- Регистрация ЛС и регуляторные вопросы действующего законодательства ЕАЭС
- Технологический суверенитет и трансфер технологий в здравоохранении
- Инновационные подходы к моделированию при разработке лекарственных препаратов
- Клинические, доклинические и «околоклинические» исследования: современные тенденции и перспективы
- Исследования биологических лекарственных средств
- Исследования лекарственного растительного сырья
- ВТЛП, особенности производства, регистрации, контроля качества
- СМК – лишняя трата ресурсов компании или инвестиция в будущее?
- и другие темы

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

Редакционная статья / Editorial article

Интервью в рамках цикла «Мнение лидеров»

Представляем вашему вниманию новое интервью в рамках цикла «Мнение лидеров». Сегодняшним гостем стала вице-президент по развитию бизнеса ГК «Фармасинтез» Наталья Малых. В роли интервьюера выступила Кульджанова Наталья Вячеславовна, директор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Interview as Part of the "Leadership Opinion" Series

We present to your attention a new interview as part of the Leaders' Opinion series. Today's guest is Natalya Malykh, Vice President for Business Development at Pharmasyntez Group of Companies. The interviewer was Natalya V. Kuldzhanova, director of the scientific and production journal "Drug development and registration".



Наталья Малых рассказала о деятельности ГК «Фармасинтез», инновационных разработках компании, поделилась своим видением относительно необходимых механизмов для эффективного внедрения инноваций в нашей стране.

Наталья Кульджанова: *Производственные мощности ГК «Фармасинтез» представлены пятью современными высокотехнологичными заводами в таких городах, как Иркутск, Уссурийск,*

Санкт-Петербург, Братск, Тюмень. Планируется ли строительство новых площадок?

Наталья Малых: Да, в настоящее время мы планируем открытие новых производственных площадок в Москве и Калуге. Кроме того, в наших намерениях – расширение уже существующих заводов путем возведения дополнительных цехов по новым направлениям.



**Пять современных высокотехнологичных заводов ГК «Фармасинтез»
в городах Иркутск, Уссурийск, Санкт-Петербург, Братск, Тюмень**

Наталья Кульджанова: *Инвестируете ли Вы в исследования и собственные разработки компании. Каков объем инвестиций на сегодняшний день? Планируется ли его увеличение в будущем?*

Наталья Малых: Разумеется, мы ежегодно вкладываем средства как в разработку инновационных продуктов, так и в производство дженериков. Без последних не обойтись, ведь они необходимы для обеспечения доступности лекарств. В среднем в нашем бюджете на разработку дженериков и инноваций ежегодно предусматривается несколько миллиардов рублей. Однако эта сумма может меняться в зависимости от стадии исследования.

На ранних этапах разработки инновационного продукта затраты обычно ниже. Но когда исследование переходит в третью фазу клинических испытаний, бюджет может увеличиться в десятки раз. Поэтому мы всегда ориентируемся на фактическую ситуацию и учитываем необходимые инвестиции в бизнес-плане.

Наталья Кульджанова: *Считаете ли вы необходимым наличие собственного R&D-центра в составе фармацевтического предприятия? Почему?*

Наталья Малых: R&D-отдел необходим для создания инновационных продуктов, так как разработка зачастую начинается с небольших пробных партий. Если проводить подбор лекарственной формы на промышленном оборудовании, это может повлечь за собой значительные затраты на материалы, сырье и вспомогательные вещества. Поэтому для небольших серий, подбора лекарственных форм и изучения фармакокинетических параметров необходим R&D-отдел.

Если говорить об усовершенствовании уже существующих дженериков, то стоит отметить, что постоянно разрабатываются новые вспомогательные вещества, которые повышают биодоступность и эффективность препаратов. Даже если дженерик кажется простым, можно попытаться увеличить его биодоступность и эффективность. Наличие R&D-отдела открывает прекрасную возможность использовать новые вспомогательные вещества, отработать технологию и оптимизировать фармакокинетические параметры.

В современном мире сложно представить предприятие, которое не имеет R&D-отдела.

Наталья Кульджанова: *Интересны ли вам инвестиции в разработки российских ученых? Есть ли успешные примеры коллаборации?*

Наталья Малых: Да, мы активно сотрудничаем с российскими учеными. В настоящее время у нас реализуются совместные проекты с Первым Московским государственным медицинским университетом имени И.М. Сеченова и РХТУ им. Д.И. Менделеева.

К сожалению, у нас были и неудачные проекты, которые мы были вынуждены закрыть. Один из продуктов не показал удовлетворительных результатов на этапе доклинических исследований, а другой – на второй фазе клинических испытаний.

Однако у нас также есть и положительные примеры. Например, наш зарегистрированный препарат «Перхлозон», который был разработан российскими учеными в Иркутском институте химии имени А. Е. Фаворского СО РАН. Этот препарат уже успешно прошел все клинические исследования и регистрацию и активно применяется в медицинской практике.

Мы стремимся к тому, чтобы участие научных центров и российских ученых в наших проектах росло с каждым годом. Работать с профессионалами – настоящее удовольствие.

Наталья Кульджанова: *На основании чего принимается решение о направлении движения компании в части инновационных разработок?*

Наталья Малых: Прежде всего мы тщательно изучаем современные тенденции в медицинской практике и новые подходы к лечению заболеваний. Мы анализируем, существуют ли уже на рынке подобные препараты или их еще предстоит разработать.

Кроме того, мы обращаем внимание на те области медицины, где наблюдается дефицит эффективных лекарственных средств. Например, если в настоящее время лечение направлено только на симптомы заболевания, а для его полного устранения или воздействия на причину нет необходимых препаратов, то мы исследуем именно эти направления.

Наша главная цель – обеспечить российских пациентов современными лекарственными средствами, которые помогут им преодолеть существующие проблемы со здоровьем.

Наталья Кульджанова: *Есть ли у Вас задача вывода инновационных разработок компании на глобальные рынки? Какие?*

Наталья Малых: Сейчас очень сложно вывести препараты на международные рынки, такие как Европа и Америка. Очень немногие государства готовы рассматривать российские инновационные разработки без их одобрения в FDA или EMA.

Если говорить о Китае, то его достижения в области инноваций настолько велики, что нам довольно сложно конкурировать с ним.

Сейчас мы сосредоточены на расширении рынков ЕАЭС для вывода наших инноваций. Планируем выход на рынки Сирии, Бразилии и Индонезии. Индонезия уже заинтересовалась нашими инновационными разработками.

Наталья Кульджанова: *Чего не хватает российским фармкомпаниям для эффективного внедрения инноваций?*

Наталья Малых: В первую очередь это значительные бюджеты, необходимые для разработки и клинических исследований инновационных продуктов. Процесс окупаемости длится очень долго, а риски при этом высоки.

Я уже упоминала, что у нас были две неудачные попытки, в результате которых мы потеряли значительные средства. Это вызывает страх у разработчиков: стоит ли проводить разработку? Они тщательно изучают все риски и, если они высоки, предпочитают не рисковать. Однако, при таком подходе упускаются интересные проекты.

Многие российские ученые предлагают промышленному партнеру инновационные продукты, которые не всегда соответствуют критериям инновационности. Это происходит ввиду того, что многие научные институты заинтересованы в том, чтобы всегда находиться в разработке, получая за это деньги, и не сфо-

кусированы на реальных потребностях рынка. В таком случае связь между практической медициной и разработкой часто теряется.

Хотелось бы, чтобы российские ученые уделяли больше внимания прикладным аспектам своей работы. Они должны не просто создавать разработки и публиковать их, а делать их применимыми на практике. Необходимо уходить от фундаментальных наук и больше внимания уделять прикладным исследованиям. Многие научные институты начинают публиковать свои разработки раньше, чем получают патент. Это автоматически делает их неинтересными для промышленных партнеров, так как в нашей отрасли без патента работать очень невыгодно.

В России существует всего несколько современных баз для проведения доклинических исследований. Я могу назвать только два или три таких учреждения. В настоящее время мы отправляем множество инновационных и биотехнологических продуктов на доклинические исследования в зарубежные страны, такие как Индия и Китай. Необходимо совершенствовать базу для доклинических исследований в России, так как без сильной базы выводить инновационные разработки очень сложно.

Также хотелось бы изменений в регуляторной сфере. Нам нужны консультации от регулятора по проведению клинических исследований и составлению регистрационных досье. Было бы здорово получать научные консультации от регулятора на ранних этапах клинических исследований, чтобы мы могли двигаться с одобренной регулятором стратегией.

Наталья Кульджанова: *Все мы знаем, что введенные санкции и уход с российского рынка некоторых западных компаний, безусловно, отразился и на российском рынке. Вы как представитель одной из крупнейших фармацевтических компаний в России как оцениваете сложившуюся ситуацию?*

Наталья Малых: Большинство зарубежных фармацевтических компаний, у кого были хорошие продукты и стабильный рынок, остались. Но, конечно, уход зарубежных компаний стал вызовом для российских производителей. Мы мобилизовались и перестроились. Мы постоянно отслеживаем списки дефектурных препаратов и разрабатываем новые лекарства, основываясь на информации из этих списков. Я не могу сказать, что уход зарубежных компаний сильно повлиял на медицинскую помощь населению. На мой взгляд, те проблемы, которые возникали в начале 2020 года, уже успешно решены.



Редакционная статья / Editorial article

УДК 615.11

Аптекарский приказ – зарождение и становление. Часть 3

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

Третья часть статьи посвящена обзору источников, отражающих функции Аптекарского приказа. К этим источникам ученые-историки относят: челобитные, памяти и отпуски (копии) с них, переписку с региональными властями, указы и указные царские грамоты, отписки воевод, приказные записи, росписи (перечни) предметов и людей, приказные книги, сказки и осмотры, приходные и расходные книги и сохранившиеся рецепты. Кроме того, в корпусе документов Аптекарского приказа встречаются выписки в доклад, допросные речи, копии судных дел, родословные росписи, разрядные, боярские писцовые книги и т. п. Анализ содержания этих источников позволяет установить роль Аптекарского приказа в структуре государственного управления аптечным делом.

The apothecary order – the origin and formation. Part 3

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 third part of the article is devoted to a review of sources reflecting the functions of the apothecary order. To these sources Historian scientists include: petitions, memories and releases (copies) from petitions, correspondence with regional authorities, decrees and decree royal letters, voivode's formal replicas, order records, paintings (lists) of objects and people, order books, fairy tales and inspections, receipt and expenditure books and preserved recipes. In addition, in the corpus of documents of the apothecary order there are extracts from the report, interrogation speeches, copies of court cases, genealogical paintings, rank, boyar scribe books, etc. Analysis of the content of these sources allows us to establish the role of the apothecary order in the structure of state management of the pharmacy business.

ИСТОЧНИКИ, ОТРАЖАЮЩИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АПТЕКАРСКОГО ПРИКАЗА

Основной корпус документов Аптекарского приказа сохранился лишь с сентября 1629 г. Хотя в научном сообществе цитируются документы и более раннего периода (с 1581 г.). По всей вероятности, часть более ранней документации погибла в пожаре 1626 г. Это подтверждает текст записи в делопроизводстве Аптекарского приказа от 8 апреля 1645 г.: «Того в Аптекарском приказе не сыскано, потому <что> выехал <...> до московского пожара 134 (1626) году». Потерю документов Аптекарского приказа историки чаще всего связывают с пожарами в Москве. Причи-

ны отсутствия документов раннего времени объясняют, кроме пожара 1626 г., катастрофами 1629, 1634, 1637, 1642 гг. Другой причиной утраты документов Аптекарского приказа является перенос столицы в Петербург. Старый Аптекарский приказ, располагавшийся в Москве, просуществовал до 1718 г., однако согласно указу 1712 г. он был переведен в Петербург с образованием Аптекарской, а затем Медицинской канцелярии. Шесть лет продолжалась параллельная работа Приказа в двух городах, что также вносило и путаницу, и потери.

К источникам делопроизводственной документации Аптекарского приказа ученые-историки относят: челобитные, памяти (пояснительные записки) и отпуски (копии) с них, переписку с региональными

властями, указы и указные царские грамоты, отписки воевод, приказные записи, росписи (перечни) предметов и людей, приказные книги, сказки и осмотры, приходные и расходные книги и сохранившиеся рецепты. Кроме того, в корпусе документов Аптекарского приказа встречаются выписки в доклад, допросные речи, копии судебных дел, родословные росписи, разрядные, боярские писцовые книги и т. п.

Невозможно точно назвать количество сохранившихся документов. Только опубликованных в монографиях «Материалы для истории медицины в России», упомянутых нами ранее, их представлено более 2600 единиц. Но существуют еще документы, разбросанные по частным коллекциям, архивам и различным ведомственным хранилищам, которые обнаруживаются и изучаются до сих пор. Однако, по мнению К. С. Худина, в целом корпус источников Аптекарского приказа имеет хорошую сохранность. Это позволяет получить весьма достоверное знание о деятельности этого учреждения. Тем не менее автор признает, что «некоторые документы безвозвратно утрачены в результате военных действий или пожаров», и высказывает надежду, что все же «...со временем отдельные документы XVII в. будут обнаружены в непрофильных фондах, в фондах других учреждений, а также в личных фондах ученых и коллекционеров»¹.

ЧЕЛОБИТНЫЕ

В архиве Аптекарского приказа сохранилось множество челобитных, которые являются исходной точкой всего делопроизводства. Челобитные на имя государя подавали не только служащие Приказа (медицинские служащие, подьячие, переводчики, истопники и пр.), но и члены их семей. Такой привилегией пользовались и частные лица (бояре ближнего круга, подданные России или иностранцы, приглашенные на службу), и служивые люди, пострадавшие во время несения службы или во время войн. Они касались, как правило:

- выдачи кормового и денежного жалованья, сука, снабжения транспортом, а также выделения денежной помощи на «дворовое строение» после пожара, свадьбу, похороны и т. п.;
- разрешения имущественных и личных споров между служащими Аптекарского приказа и другими людьми;
- выдачи лекарств, просьб о присылке врача, освидетельствования и освобождения от службы по состоянию здоровья.

¹ Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. С. 55–56. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/synopsis_pdfs/000/000/039/original/d98a91866b03b3279773b13a48daa292ea8eccc4.pdf?1632215959. Ссылка активна на 10.06.2024.

С XVI в. существовали стандартные шаблоны этих документов, называемые формулярами. Так, формуляр челобитной начинается словами: «Царю государю и великому князю <...> Михаилу Федоровичю всея Руси бьют челом холопи твои Янка Черкасской да Бориско Морозов». Заканчивался формуляр челобитной всегда единообразно: «Царь государь смилуйся, пожалуй». На обороте челобитных, как правило, имеются отметки приказного человека, принявшего этот документ. Обычно это написанная на обороте или подклеенная на отдельном листе *выписка в доклад, приказная записка* или *роспись*, образующая дело.

ВХОДЯЩИЕ И ИСХОДЯЩИЕ ПАМЯТИ И ОТПУСКИ С НИХ

На основании памятей (пояснительных записок) и отпусков (их копий) можно проследить связи Аптекарского приказа с другими учреждениями, определить его место в приказной системе и те функции, которые были на него возложены. Формуляр памяти начинается словами: «Лета 7138 сентября в 9-й день. По государеву цареву и великого князя <Имя Отчество> <малый титул> указу <кому> велети», а затем идет изложение сути дела. Если речь идет о подлиннике, то он будет оканчиваться подписью дьяка (например, «дѣак Алмаз Иванов» или «приписал Василей Прокофьев») либо подьячего с приписью («приписал Богдан Силин»). На обороте памяти, как правило, расположена подпись подьячего того же приказа о том, что он проверил правильность содержания документа (например, «справил Любимко Асманов» или «справил Ивашко Хрипков»).

Делопроизводство, начатое присланной памятью, могло включать в себя так называемые *выписки в доклад*, начинавшиеся словами: «да выписано на пример» или «государь пожаловал, велел, выписав, доложить себя государю». Эта процедура возникала при необходимости привлечь из архива Приказа более ранние документы, как-то связанные с решением аналогичного вопроса в прошлом.

Входящие памяти, как правило, сохранились в подлинниках. На этих источниках имеются автографы дьяков и подьячих учреждений, с которыми Аптекарский приказ взаимодействовал. Так, с 1629 по 1672 год отмечены финансовые отношения со следующими приказами: Большого дворца, Большого прихода, Большой казны, Иноземским, Монастырским, Печатным, Поместным, Разрядным, Сбора десятой деньги (в ведении Приказа Большого прихода), Стрелецким, Царицыной мастерской палатой – и четьми: Владимирской, Галицкой, Костромской, Новой, Новгородской (в ведении Посольского приказа), Устюжской. Это очередной раз доказывает, что Аптекарский приказ не занимал какого-то обособленного места в приказной системе и поддерживал

связь почти со всеми государственными учреждениями того времени¹.

В памятниках нашли отражение различные функции Аптекарского приказа. В этих источниках содержится подробная информация об организации снабжения Приказа предметами для канцелярской работы, а также сведения о поиске и доставке ингредиентов для изготовления лекарств.

Анализ текстов этих документов позволил установить:

- ✓ регионы сбора и закупки лекарственных растений;
- ✓ перечень растений, которые собирались, закупались в различных регионах страны и которые выращивались на аптекарском огороде;
- ✓ хозяйственные процессы, происходившие на аптекарском дворе;
- ✓ номенклатуру и состав лекарственных препаратов, которые производились на аптекарском дворе.

ПЕРЕПИСКА С РЕГИОНАЛЬНЫМИ ВЛАСТЯМИ

Эта группа документов имеет важное значение потому, что позволяет выявить взаимодействия Аптекарского приказа с другими регионами страны. В этой переписке раскрывается широта географии снабжения Приказа лекарственными растениями, произрастающими на территории Русского государства. Грамоты местным воеводам, написанные от лица царя, позволяют судить о широте географии поиска растений. Запросы поступали во множество городов и уездов, но не всегда получали положительный ответ, несмотря на строгость формулировок и угрозы ослушавшимся. Среди растений, которые доставляли в Москву для нужд Аптекарского приказа, были дягиль, зверобой, можжевельниковые ягоды, солодковый корень, табак, укроп, чемерица, «чечуйная трава» и пр. Организация сбора растений возлагалась на местное население в качестве повинности и контролировалась региональными властями (воеводами). Переписка между Аптекарским приказом и воеводами, как правило, затрагивала такие вопросы, как:

- организация транспортировки заграничных товаров, доставленных в русские приграничные города;
- урегулирование региональных вопросов, в которые оказались вовлечены лица, входившие в юрисдикцию Аптекарского приказа (например, земельный и имущественный спор между апте-

карем, переводчиком и золотых дел мастером, с одной стороны, и каким-либо воеводой – с другой);

- снабжение армии врачами и медикаментами;
- организация противодействия эпидемиям.

УКАЗНЫЕ ЦАРСКИЕ ГРАМОТЫ

Формуляр указных грамот начинается со слов: «От царя и великого князя <Имя Отчество> <малый титул>», далее следует указание, куда и кому адресован данный документ, например «на Воронеж воеводе нашему Ивану Дмитриевичу Солнцеву», а затем уже изложение самой сути дела. Конечный пункт включает в себя указание на место и дату создания источника, например «писан на Москве лета 7170 сентября в 4 день». В черновом отпуске (копии) с грамоты обычно присутствует указание на факт отправки документа с указанием лица, которое выступило в роли гонца. Например, «послана такова грамота на Воронеж с воронежским сыном боярским с Миней Корчаниновым того же числа». Подобная грамота могла быть адресована и служителям церкви.

ОТПИСКИ ВОЕВОД

Эти источники иллюстрируют широкую географию административной переписки служащих Аптекарского приказа. В текстах отписок упоминаются города: Архангельск, Белгород, Белёв, Болхов, Владимир, Вологда, Воронеж, Кадом, Казань, Калуга, Коломна, Коротояк, Кострома, Лихвин, Могилёв, Муром, Великий Новгород, Нижний Новгород, Переславль-Залесский, Полоцк, Пошехонье, Псков, Ржев, Ростов, Самара, Саратов, Серпухов, Смоленск, Томск, Шклов, Царевичев-Дмитриев (совр. Кокнесе (Кокенгаузен), Ярославль. Формуляр отписок воевод начинается инвокацией: «Государю Царю и Великому князю <Имя Отчество> <малый титул> холоп твой Ивашка Елецкий челом бьет».

ПРИКАЗНЫЕ ЗАПИСИ

Приказные записи относятся к внутреннему делопроизводству, они служили приказным людям в учетных и справочных целях. Формуляр приказной записи структурно близок к формуляру памяти, но он более краток.

ПЕРЕЧНИ (РОСПИСИ)

Перечни (рописи) составлялись отдельно от памятей и выполняли функцию справочной документации для последующего к ним обращения. Учету подлежали предметы и люди. В первом случае целью создания росписи были организация закупки или хранения товаров (как правило, лекарственных препаратов), а также их непосредственное изготовление.

¹ Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. С. 37–38. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/synopsis_pdfs/000/000/039/original/d98a91866b03b3279773b13a48daa292ea8eccc4.pdf?1632215959. Ссылка активна на 10.06.2024.

Списки людей создавались либо для выплаты жалования, либо для медицинского освидетельствования (например, стрельцов, пострадавших при тушении пожара).

Перечни предметов

Росписи предметов представляют собой списки товаров со всех концов света: от Индии и Китая до Африки и Америки. Со всего мира они стекались в торговые города: Гамбург, Лондон, Ригу, Могилёв, а там уже закупались для Аптекарского приказа.

Другая разновидность росписи – это перечень приказного имущества, который создавался в период смены дьяка в учреждении. За период с 1629 по 1672 год такие смены происходили несколько раз: в 1640, 1643, 1648/49, 1670 и 1672 гг.

Перечни людей

Первый известный перечень людей относится к 1618/19 гг. и является самым ранним из документов Аптекарского приказа, дошедших до нашего времени. Появление этого источника связано с составлением так называемого Осадного списка – поименного перечня людей, оборонявших Москву во время ее осады войсками польского королевича Владислава в 1618 г. Этот учет производился для последующего награждения защитников города земельными наделами. «Роспись Обтекарского приказу всяким людям, которые в московскую осаду на Москве сидели и Государю служили, и люди даточные с них на городиманы, и рвы копали», составленная в Аптекарском приказе подъячим Вяжицей Потемкиным, сохранилась в составе разрядного делопроизводства¹.

Основная же часть источников этой группы была связана с выплатами жалования служащим Аптекарского приказа. Такие росписи всегда строго упорядочены: человек в списке занимает место в соответствии с его местом в социальной иерархии. Доктора всегда занимали первую позицию, за ними следовали аптекари, затем алхимист, окулист, лекари (сначала иностранцы, а затем русские лекари). Замыкали список, как правило, переводчики. В архиве Аптекарского приказа сохранилось несколько росписей раненых служилых людей, в которых они поименно перечислены, а также подробно указано, какие раны они получили.

В делопроизводстве Аптекарского приказа, помимо столбцовой, существовала и иная форма – кодексы. Эти книги регулярно упоминались в делопро-

изводстве, но, судя по всему, до нас дошла лишь небольшая их часть, так как они часто использовались в справочных целях и быстро приходили в негодность. В этих книгах нередко встречаются пометы, свидетельствующие о работе Приказа: «из оптеки отпущено и в книгу писано», «в книгу записано», «принял и в книгу записал», «принять коренья и записать в книгу».

ПРИКАЗНЫЕ КНИГИ

В архиве Аптекарского приказа сохранилось несколько разновидностей приказных книг:

- записные;
- приходные и расходные (*приходо-расходные*).

Записные книги

Эти источники представляют собой подневные записи о выдаче различных веществ для производства лекарств или их продаже частным лицам. С одной стороны, они позволяют проследить производственные процессы, происходившие в Приказе, а с другой стороны, помогают установить социальный состав лиц, бывших потребителями этих лекарств.

Приходные и расходные книги

Записи в этих книгах велись вместе и отдельно. Их содержание, как правило, устроено сходным образом. Приходная часть состояла из двух разделов: сначала указывалось количество денег, оставшихся с прошлого года, а затем следовала запись о поступлении денежных средств из других приказов (Большого дворца, Костромской чети, Печатного и др.). Расходная часть включала в себя разделы о расходах на выплату жалования служащим Приказа, на различные приказные нужды (бумага, чернила, свечи и пр.) и производственные потребности (для производства и упаковки лекарств). В конце каждой записи о выдаче жалования ставилась собственноручная подпись лица, получившего деньги, на русском, английском, но чаще всего на немецком языке.

СКАЗКИ И ОСМОТРЫ

Эти документы описывают процесс и итог обследования пациента. В документах XVII в. эта процедура фигурирует под различными наименованиями: «осмотр», «досмотр», «смотрел» и прочее – все это означает врачебное освидетельствование больного. Сказка – предшественник двух разновидностей медицинского делопроизводства: осмотра и составления рецепта. Сказки не имеют устойчивого формуляра и составлялись в связи с конкретным запросом, касавшимся различных медицинских аспектов. Имеются, к примеру, сказки докторов о лечении болезни *angina*, «сказка и вымысел всех <докто>ров о болез-

¹ Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. С. 40. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/synopsis_pdfs/000/000/039/original/d98a91866b03b3279773b13a48daa292ea8eccc4.pdf?1632215959. Ссылка активна на 10.06.2024.

ни, имянуемой рожа», «сказка, какую сырую траву кладут в питье, от которой травы холодит» и «сказка о моровом поветрии»¹.

Подлинники сказок и досмотров, подписанные дьяком Приказа, докторами или лекарями, отсылались в приказ, из которого поступил запрос. Отпуски (копии) оставались в Аптекарском приказе, благодаря чему они и дошли до наших дней. Как правило, указ об осмотре пациента давался именем царя, но встречаются случаи, когда указ исходил от царевичей. В случае осмотра стрельцов он проводился по памяти из Стрелецкого или же из Разрядного приказа при осмотре дворян. Эти осмотры были связаны с необходимостью освидетельствовать негодность к службе. Число врачей, проводивших осмотр, менялось от одного до трех. Это могли быть доктор, лекарь или же врач-специалист (окулист), если того требовала специфика заболевания. Обычный состав врачебной комиссии состоял из доктора и лекаря (иногда двух лекарей: иноземца и русского). Сопровождать врачей для проведения осмотра могли переводчики и подьячие, ведущие записи. Дворяне и другие служилые люди подавали челобитные в Разрядный приказ, чтобы их освидетельствовали на негодность к службе. Тот, в свою очередь, переадресовывал эти челобитные в Аптекарский приказ. Часто жалобы были связаны с застаревшими заболеваниями, обострениями старых ран и увечий, заболеваниями внутренних органов или старостью. Иногда врачам приходилось освидетельствовать трупы, появление которых было связано с бытовыми ситуациями, боями, моровыми поветриями, различными кожными заболеваниями, связанными с заразными болезнями. Пациентов с этими заболеваниями или другими подозрительными симптомами досматривали особо тщательно. Таких пациентов «доктор... осматривал нагих», чтобы обнаружить, «что де на них никакой болезни нет, все в чистоте». Особенно это касалось ситуаций, которые могли угрожать жизни и здоровью членов царской семьи.

РЕЦЕПТЫ

Под рецептами истории медицины понимают список ингредиентов, составляющих лекарства (иногда с краткими рекомендациями), составленный доктором или аптекарем Аптекарского приказа. Рецепты не входили в «Материалы по истории медицины России» Н. Е. Мамонова и Н. Я. Новомбергского и не были опубликованы ранее.

¹ Худин К. С. Документы Аптекарского приказа (1629–1672 гг.) как исторический источник. Дис. ... канд. ист. наук. Москва; 2021. С. 115. Доступно по: https://igh.ru/system/dissertations/synopsis_pdfs/000/000/039/original/d98a91866b03b3279773b13a48daa292ea8eccc4.pdf?1632215959. Ссылка активна на 10.06.2024.

Оригиналы рецептов представляют собой узкие листки бумаги, шириной, как правило, 6,5–7,5 см. К листку с рецептом, написанным латиницей, но чаще всего по-немецки или по-английски, был подклеен листок с его переводом на русский язык, сделанный приказным переводчиком. Оба текста имели сходный формуляр, включающий дату, список ингредиентов с их количеством, имя и статус пациента, имя доктора, составившего рецепт и имя человека, забравшего лекарства («курьера»). Рецепт почти всегда датирован составителем по григорианскому календарю по летоисчислению от Рождества Христова. Рецепты составлялись для изготовления многокомпонентного лекарства, предназначенного для конкретного человека. Часто в латинском или русском вариантах фигурирует его имя и отчество. Сам рецепт составлялся доктором Аптекарского приказа (например, «по росписи дохтура Ягана Костера зделаны составы»), изготовлением лекарства занимался аптекарь – его имя также указано в рецепте (например, «оптекарь Ондрей делал»). В редких случаях встречается упоминание болезни, от которой собираются лечить пациента, но эти указания часто носят общий характер (например, «принимать по бумашке за два часа перед лихорадкою в водке с ниже писанною»).

Самые ранние рецепты, сохранившиеся в Аптекарском приказе, датируются 1661 г. Список пациентов очень разнообразен: светская аристократия (от бояр до думных дьяков), приказные люди (дьяки и подьячие), духовенство (от вселенских патриархов до протопопов), служилые люди (от дворян до стрельцов), а также ремесленники и даже крестьяне. Редко среди пациентов встречаются женщины – приближенные царицы, дворянские и боярские жены, жены дипломатов и священников. В рецептах, отпускавшихся безденежно, стоимость лекарств не указывалась. Но именно близостью к царю и его семье определяли то, во сколько обойдется казне тот или иной препарат и из каких ингредиентов он будет изготовлен. Дорогие лекарства использовали для высокопоставленных пациентов, а дешевые – для рядовых. Таким образом, стоимость рецепта отражала социальное положение пациента.

Несмотря на то, что основная масса документов Аптекарского приказа обнаружена и опубликована, многие исследователи убеждены, что их небольшая часть все же еще не раскрыта. Эти документы сохраняются в фондах, напрямую не относящихся к Аптекарскому приказу, государственным хранилищам и частным коллекциям. Доказательством этому служит тот факт, что до настоящего времени обнаруживаются новые источники, раскрывающие важную роль этого учреждения в сложной системе государственного управления аптечным делом.

Рекламная статья / Sponsored article

Персонализированное, или «Кастомное», выделение индивидуальных растительных субстанций



Авторы подготовили статью при финансовой поддержке ООО «Сайнтифик Комплайнс»

«Кастомное» выделение – это разработка методики выделения и само выделение индивидуального соединения под заказ за определенный срок благодаря комбинации аналитических методов, учитывающих особенности конкретного растения и физико-химические свойства выделяемых компонентов.

Personalized, or "Custom" isolation of individual plant substances

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

"Custom" isolation is the development of an isolation methodology and the isolation of a customized compound in a specific time frame through a combination of analytical methods that take into account the characteristics of a particular plant and the physicochemical properties of the isolated components.

«Сайнтифик Комплайнс» – современная компания, развивающая проекты на стыке различных исследовательских направлений. Одним из таких направлений деятельности центра научных разработок является анализ метаболома лекарственного растительного сырья.

За время существования компании был получен опыт работы с различными видами перспективного лекарственного растительного сырья [например, клекачкой перистой (*Staphylea pinnata* L.)], содержащего разные группы биологически активных веществ (БАВ), среди которых можно выделить антраценпроизводные (представители рода Rumex), флавоноиды и дубильные вещества (представители рода Astragalus) и др.

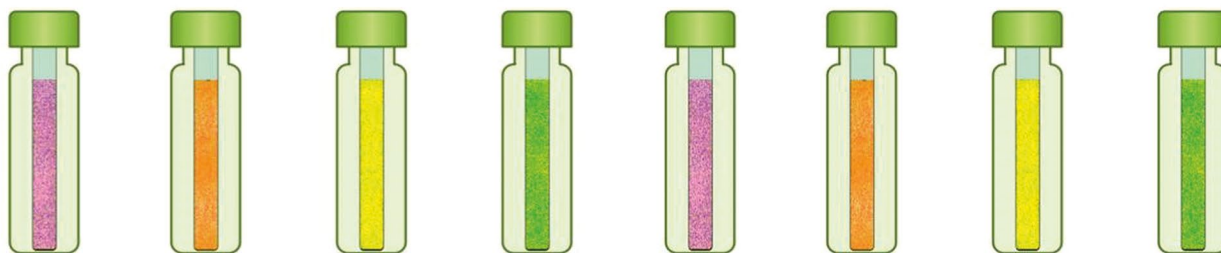
В своих исследованиях с растительными объектами мы уделяли особое внимание динамике накопления групп БАВ, и в частности отдельных соединений, в зависимости от фазы вегетации изучаемых растений. Таким образом была подобрана определенная фенологическая фаза заготовки подземных органов растений рода щавель, в которой можно отметить доминирующее содержание одного из основных действующих веществ – хризотановой кислоты.

В рамках фитохимического изучения сырья методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), спектрофотометрии (СФМ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ) одной из главных трудностей является поиск стандартных образцов. Даже располагая всем необходимым оборудованием и методиками качественного и количественного хро-

мографического определения, без индивидуальных субстанций невозможно подтвердить наличие соединений, а также достоверно установить их количество. На российском рынке существуют несколько зарубежных компаний, у которых можно приобрести растительные индивидуальные субстанции, однако подобная закупка имеет ряд недостатков, в частности высокую стоимость, длительное время доставки, а также затраты на сложную логистику.

Многие индивидуальные соединения растительного происхождения сложно получать путем химического синтеза из-за нерентабельности такого производства. Химический синтез растительных соединений будет многоэтапен, субстанция будет требовать очистки от побочных родственных соединений, образовавшихся в процессе синтеза. Использовать же каллусные клетки для продукции конкретной субстанции крайне сложно из-за особенностей растительного метаболизма. В качестве примера можно привести бесчисленное количество попыток культивирования клеток растений, содержащих карденолиды (сердечные гликозиды). В основном их содержание оказывалось либо исходно достаточно низким, либо постепенно снижалось в процессе длительного культивирования до исчезающе малых количеств. Поэтому вариантом выбора является выделение биологически активных соединений из растительного сырья, заготовленного в период максимального накопления целевых веществ.

В связи с потребностью в субстанциях и с учетом нашего опыта работы в направлении выделения индивидуальных соединений возникла необхо-



димось создания услуги персонализированного, или «кастомного», выделения.

«Кастомное» выделение – это разработка методики выделения и само выделение индивидуального соединения под заказ за определенный срок благодаря комбинации аналитических методов, учитывающих особенности конкретного растения и физико-химические свойства выделяемых компонентов.

Длительность разработки метода выделения и сама наработка требуемого объема будет напрямую зависеть от конкретного растительного сырья, его доступности, сроков заготовки, а также сопутствующих веществ, которые в нем содержатся. Помимо этого, немаловажным фактором являются реактивы и сопутствующие материалы, необходимые для выполнения работы.

На данный момент мощности ЦНР ООО «СК» позволяют выделять индивидуальные вещества в объемах, равных десяткам граммов чистого вещества в

год. Стоимость будет рассчитываться индивидуально, исходя из временных затрат, особенностей сырья, самого вещества.

Данная услуга может быть интересна образовательным учреждениям и научно-исследовательским институтам для организации поисковых работ, молодым ученым и аспирантам, которые проводят фитохимическое изучение лекарственного растительного сырья, а также производителям биологически активных добавок к пище, в основе которых лежит сырье, экстракты или индивидуальные вещества.



Компания Сайнтифик Комплайнс занимается изучением лекарственных препаратов, конструкторскими работами по созданию научных установок для фармацевтической области, а также производством субстанций из растительного сырья и реактивов для проведения биорелевантных тестов твердых лекарственных форм

ОКБ

Опытно-
конструкторское
бюро

ЦНР

Центр
научных
разработок

АЛ

Аналитическая
лаборатория

В компетенции сотрудников АЛ СК входит проведение исследования «ФРТ» для твердых лекарственных форм в зависимости от класса и подкласса биофармацевтической классификации растворимости с предсказанием профилей на базе РВРК теста, а также ТСКР. Для высокомолекулярных соединений выполняется изучение фармакокинетики и иммуногенности в рамках КИ

ОКБ СК производит инновационный прибор для проведения биопредиктивных тестов твердых лекарственных форм СК ФРТ-6

Physiological
Relevance
Tester

Физиологически
Релевантный
Тестер



ФРТ 6

Две
параллельные
линии

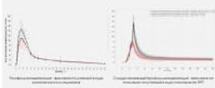


2 режима работы

Совместим с
порошками для
приготовления
биорелевантных
сред растворения



Предсказание ФК
профилей по данным
in vitro



Автоматический отбор
проб с фильтрацией



ЦНР СК производит реактивы для проведения биорелевантных тестов твердых лекарственных форм: порошок для приготовления биорелевантных сред SC Powder и буферы концентраты SC ReMedia



Общество с ограниченной ответственностью
«Сайнтифик Комплайнс»

info@scientific-compliance.ru



Информационная статья / Informational article

Главная пленарная сессия «Движение к технологическому лидерству – нацпроекты технологического суверенитета для здравоохранения»

7 октября 2024 года в рамках форума «БИОТЕХМЕД» состоялась главная пленарная сессия «Движение к технологическому лидерству – нацпроекты технологического суверенитета для здравоохранения».

Main plenary session "Moving towards technological leadership – national projects of technological sovereignty for healthcare"

On October 7, 2024, within the framework of the BIOTECHMED forum, the main plenary session "Movement towards technological leadership – national projects of technological sovereignty for healthcare" was held.



Центральной темой пленарной сессии стало достижение технологического суверенитета, что является одним из приоритетных направлений российской государственной политики. Медицинская промышленность занимает здесь особое место, поскольку именно в этой сфере особенно важно достичь необходимого уровня технологического развития.

На главной пленарной сессии выступили **Антон Алиханов** (министр промышленности и торговли РФ), **Михаил Альбертович Мурашко** (министр здравоохранения РФ), **Сергей Цыб** (статс-секретарь ГК «Ростех»), **Александр Браверман** (первый заместитель председателя ГК «ВЭБ.РФ»), **Дмитрий Зайцев** (генеральный директор АО «Фармстандарт») и **Илья Бардин-Денисов** (генеральный директор ООО «ПРОМОМЕД ДМ»). Модератором сессии выступила **Софико Шеварднадзе**, известная журналистка и телеведущая.

«Наверное, начать нужно с того, что в целом национальный проект – это серьезное государственное решение, которое в первую очередь призвано сделать жизнь граждан лучше», – отметил **Михаил Альбертович Мурашко** в начале своего доклада. В сфере здравоохранения будут реализованы три проекта: «Новые технологии сбережения здоровья»,

«Продолжительная активная жизнь» и «Семья». Все проекты призваны развивать инфраструктуру, создавать новые возможности для реализации инновационных технологий лечения и способствовать развитию промышленности и повышению эффективности разработок.

В реализации проекта задействованы три федеральных органа исполнительной власти: Министерство здравоохранения, Министерство образования и Министерство промышленности и торговли РФ. В рамках проекта «Медицинская наука для человека» разрабатываются уникальные лекарственные препараты, призванные помочь людям в борьбе с тяжелыми заболеваниями. «Мы ожидаем, что эти препараты окажут хороший терапевтический эффект при лечении больных», – подчеркнул **Михаил Альбертович Мурашко**.

Новые разработки включают в себя не только лекарственные препараты, но и медицинские изделия. Минпромторг уже составил список препаратов, производство которых необходимо для обеспечения экономической безопасности и независимости нашей страны. Кроме того, будет детально проработана программа «Продукты на полку». Напомним, что программа предполагает выделение субсидий рос-

сийским фармпроизводителям на разработку аналогов патентованных препаратов, правообладателями которых являются компании из недружественных стран. Данный подход сможет обезопасить российский лекарственный рынок в случае ухода зарубежных компаний.

Ранее на сессии выступал генеральный директор ГК «Фармасинтез» Викрам Пуния. Спикер отметил, что несмотря на уход с российского рынка некоторых западных фармкомпаний, их продукцию удалось заместить. В России работает специальная комиссия, которая оценивает дефектуру и регулирует ценовую политику, что способствует безопасности граждан и устойчивой работе медицинских организаций. Этот проект станет основой для инновационного развития здравоохранения, включая разработку новых лекарственных препаратов и технологий лечения.

Алиханов Антон Андреевич подчеркнул, что Россия достаточно хорошо обеспечена препаратами из перечня жизненно важных, 77 % мы производим сами. Главная задача – дойти до 90 % за 6 лет. Объем собственного производства медицинских изделий на данный момент составляет 28 %. Задача на 6 лет – дорасти до 40 % собственного производства на рынке. В фармацевтической отрасли ситуация более-менее понятна, с медицинскими изделиями ситуация несколько сложнее, и нужен более комплексный подход, поскольку существует зависимость от пластика, радиоэлектроники, фотоники, металлургии и других комплектующих.

За последние 10 лет программа «Фарма-2020» стала успешным проектом для Министерства промышленности и торговли РФ. Объем государственной поддержки составил около 61 млрд рублей, что позволило фармкомпаниям получить импульс и научиться развиваться самостоятельно.

Цыб Сергей Анатольевич в своем выступлении представил медицинские разработки «Ростеха»: нанороботов, персональных медицинских цифровых помощников и кардиороботов. **Александр Арнольдovich Браверман** поделился своим мнением о финансовой стороне национальных проектов: где брать деньги, как их использовать и контролировать. Он также подробно остановился на взаимодействии с «ВЭБ.РФ» и вопросах рыночного аккредитования в фармацевтической сфере.

Зайцев Дмитрий Иванович в начале диалога отметил, что Россия – социальное государство и многие жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты (ЖНВЛП) закупаются через госзакупки. Без регулирования здесь не обойтись, и ФАС проделала колоссальную работу. На данный момент в нашей стране самые низкие цены среди референтных государств, и зачастую препараты ЖНВЛП являются самыми дешевыми в мире. Для обеспечения доступности высококачественных препаратов по разумной цене необходимо создать условия для отрасли, чтобы компании были готовы инвестировать

в развитие новых проектов. Это ключевое условие для разработки лекарственных средств и достижения целей национальных проектов. Спикер подчеркнул, что для фармацевтических производителей важно стабильное, понятное и развивающееся законодательство и его правоприменение. Некоторые зарубежные производители неуверенно себя чувствуют на российском рынке. В планах – разработать четкие, понятные и справедливые критерии для принудительного лицензирования. Если компания ушла с российского рынка или перестала поставлять продукт, она должна понимать, что ее ждет принудительное лицензирование. Если компания осталась и продолжает выводить продукты на рынок, она должна быть уверена, что ей ничто не угрожает. При соответствующем законодательстве наш рынок будет привлекателен для российских и зарубежных инвесторов.

Бардин-Денисов Илья Николаевич считает, что цель нацпроекта – повышение конкурентоспособности российской фармацевтической промышленности. Главная задача фармотрасли – бороться за качество лекарственных средств. За последние несколько лет восприятие российской фармацевтической промышленности стало улучшаться. В настоящее время фармацевтическая промышленность активно работает над повышением стандартов качества и открыто демонстрирует результаты исследований, подтверждающих улучшение качества лекарственных препаратов. Это тяжелый и комплексный вопрос, однако задача стоит перед всей отраслью. Важно понимать, что во всех национальных проектах идет речь о здоровье человека. Основными причинами потери здоровья на сегодняшний день являются ожирение и онкология. Эти проблемы должны быть красной линией, и их необходимо прорабатывать всем вместе – Министерству промышленности и торговли и Министерству здравоохранения РФ. «Нужно улучшать аналоги и разрабатывать собственные инновационные препараты. Смелых решений нужно больше. У нас нет времени делать потихонечку. Иностранные компании в любой момент могут уйти. Сейчас нужно собраться и начать принимать решения, которые будут идти в мейнстриме для сбережения здоровья. Тогда мы все вместе справимся», – в заключение подчеркнул спикер.

В этом году «БИОТЕХМЕД» впервые проходил в рамках Международного форума «Биопром: промышленность и технологии для человека». Цель объединения – в достижении мультипликативного эффекта от синергии технологических кластеров, для которых «биотех» является сквозной технологией. Значительная часть сессий в рамках форума была посвящена цифровым продуктам, инновациям и вопросам развития производства оборудования, сырья, комплектующих для фармацевтической, медицинской промышленности и реабилитационной индустрии.

gotoipheb.ru | +7 965 772 7791



Международная выставка и форум по фармацевтике и биотехнологиям



8–10 апреля 2025 | Санкт-Петербург

Поддержка:



Организатор:





Актуализация сведений о микозах и противогрибковых препаратах для поиска эффективных платформ для производства новых соединений тиазолов

Т. Ф. Черных[✉], О. Ю. Богданова, Е. В. Флисюк, Ю. М. Коцур, К. О. Сидоров, И. А. Наркевич

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

[✉] Контактное лицо: Черных Татьяна Фёдоровна. E-mail: tatiana.odegova@pharminnotech.com

ORCID: Т. Ф. Черных – <https://orcid.org/0009-0000-1539-8013>;
О. Ю. Богданова – <https://orcid.org/0000-0002-4492-6599>;
Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;
К. О. Сидоров – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>;
И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 10.07.2024

Статья принята в печать: 25.10.2024

Статья опубликована: 25.10.2024

Резюме

Введение. Сведения о микозах и противогрибковых препаратах современного типа зачастую носят отрывочный, несистематизированный характер, что требует корректировки.

Цель. Систематизировать новейшие сведения о грибах и микозах, средствах борьбы с ними и встречаемых на этом пути проблемах, осветить последние достижения в области синтеза и исследования активности 1,2,4-триазола как потенциального фунгицидного соединения.

Материалы и методы. Материалами служили опубликованные в передовых научных журналах исследования авторов, проведенные по всему миру, в области изучения грибов, противогрибковых препаратов, поиска новых противогрибковых средств.

Результаты и обсуждение. В статье представлен обзор современных сведений о морфобиологических особенностях грибов, актуализации их таксономии и номенклатуры, показана роль грибов в природе и развитии грибковых инфекций у человека и животных, структурированы сведения о классификации микозов и их возбудителях. Также приведены новейшие сведения о фармакологических свойствах основных существующих на настоящее время противогрибковых препаратов, механизмах формирования устойчивости к ним у грибов; в сравнительном аспекте с другими группами противомикотических препаратов показана перспективность азолов и их производных в качестве источников получения новых фунгицидных лекарственных и дезинфицирующих средств. Литературные исследования показали, что производные 1,2,4-триазола обладают широким спектром противогрибковой активности, которая распространяется и на другие виды активности.

Заключение. Значительная перспективность триазолов обусловлена в том числе и фунгицидным влиянием в отношении устойчивых штаммов грибов – возбудителей инфекций человека и животных. Преимуществом новых производных является и низкий уровень подавляющих грибы концентраций, низкая цитотоксичность, что позволяет в перспективе использовать их для внутривенного введения. Актуализация сведений о действенности новых противогрибковых соединений поможет исследователям систематизировать знания о свойствах азолов, что может способствовать поиску и разработке новых потенциальных кандидатов на противогрибковые препараты с высокой эффективностью и селективностью, способствовать формированию новых направлений исследований по поиску эффективных средств борьбы с микозами в различных сферах деятельности человека.

Ключевые слова: грибы, грибковые инфекции, противогрибковые препараты, азолы, триазолы, устойчивость

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

Вклад авторов. Т. Ф. Черных и О. Ю. Богданова осуществляли сбор данных из литературных источников, проводили сбор и анализ полученных данных, отвечали за написание. Ю. М. Коцур и К. О. Сидоров проводили сбор и систематизацию материала, работали с табличным материалом, участвовали в написании текста. Е. В. Флисюк и И. А. Наркевич отвечали за

концепцию обзора, редактирование текста статьи, научное консультирование и утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Для цитирования: Черных Т. Ф., Богданова О. Ю., Флисюк Е. В., Коцур Ю. М., Сидоров К. О., Наркевич И. А. Актуализация сведений о микозах и противогрибковых препаратах для поиска эффективных платформ для производства новых соединений тиазолов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):27–44. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1871>

Updating information of mycoses and antifungal medicines to find effective platforms for the production of new thiazole compounds

Tatyana F. Chernykh✉, Olga Yu. Bogdanova, Elena V. Flisyuk, Yuliya M. Kozur, Kirill O. Sidorov, Igor A. Narkevich

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

✉ **Corresponding author:** Tatyana F. Chernykh. **E-mail:** tatiana.odegova@pharminnotech.com

ORCID: Tatyana F. Chernykh – <https://orcid.org/0009-0000-1539-8013>;
Olga Yu. Bogdanova – <https://orcid.org/0000-0002-4492-6599>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
Yuliya M. Kozur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;
Kirill O. Sidorov – <https://orcid.org/0000-0002-7573-1719>;
Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 10.07.2024

Accepted: 25.10.2024

Published: 25.10.2024

Abstract

Introduction. Information about mycoses and antifungal drugs of the modern type is often fragmentary and unsystematic, which requires correction.

Aim. To systematize the latest information about fungi and mycoses, means of combating them and the problems encountered along the way, to highlight the latest achievements in the field of synthesis and research of the activities of 1,2,4-triazole as a potential fungicidal compound.

Materials and methods. The materials were the authors' research published in advanced scientific journals, conducted around the world in the field of studying fungi, antifungal drugs, and the search for new antifungal agents.

Results and discussion. The article provides an overview of current information on the morphobiological features of fungi, updating their taxonomy and nomenclature, shows the role of fungi in nature and the development of fungal infections in humans and animals, structured information on the classification of mycoses and their pathogens. The latest information is also provided on the pharmacological properties of the main currently existing antifungal drugs, the mechanisms of formation of resistance to them in fungi, in a comparative aspect with other groups of antimycotic drugs, the prospects of azoles and their derivatives as new fungicidal drugs and disinfectants are shown. Literature studies have shown that 1,2,4-triazole derivatives have a wide range of antifungal activity, which extends to other types of activity.

Conclusion. It was noted that the significant prospects of triazoles are due, among other things, to the fungicidal effect on resistant strains of fungi-pathogens of human and animal infections. The advantage of the new derivatives is the low level of concentrations suppressing fungi, low cytotoxicity, which allows them to be used for intravenous administration in the future. Updating information on the effectiveness of new antifungal compounds will help researchers systematize knowledge about the properties of azoles, which can contribute to the search and development of new potential candidates for antifungal drugs with high efficiency and selectivity, and contribute to the formation of new research directions for the search for effective means of combating mycoses in various fields of human activity.

Keywords: fungi, fungal infections, antifungal drugs, azoles, triazoles, resistance

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

Contribution of the authors. Tatyana F. Chernykh and Olga Yu. Bogdanova collected data from literary sources, collected and analyzed the data obtained, and were responsible for writing. Yuliya M. Kozur and Kirill O. Sidorov collected and systematized the material, worked with tabular material, and participated in writing the text. Elena V. Flisyuk and Igor A. Narkevich were responsible for the concept of the review, editing the text of the article, scientific consulting, and approval of the final version of the article for publication.

For citation: Chernykh T. F., Bogdanova O. Yu., Flisyuk E. V., Kozur Yu. M., Sidorov K. O., Narkevich I. A. Updating information of mycoses and antifungal medicines to find effective platforms for the production of new thiazole compounds. *Drug development & registration*. 2024;13(4):27–44. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1871>

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонный рост грибковых инфекций среди населения и среди сельскохозяйственных и домашних животных обуславливает актуальность поиска инновационных противогрибковых средств. Некоторые фунгицидные средства перестают быть эффективными вследствие развития резистентности, различных побочных эффектов и высокой токсичности. Синтез и разработка ряда новых противогрибковых средств становится первостепенной задачей современной фармации. Одна из наиболее важных фармакофорных систем, доказавших свою многовекторную фармакологическую активность, – производное азола – 1,2,4-триазол. Мощная и широкая активность триазолов подтвердила, что они являются фармакологически значимыми фрагментами.

Цель этого обзора – систематизировать новейшие сведения о грибах и микозах, средствах борьбы с ними и встречаемых на этом пути проблемах, осветить последние достижения в области синтеза и исследования активности 1,2,4-триазола как потенциального фунгицидного соединения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами служили опубликованные в передовых научных журналах исследования авторов, проведенные по всему миру в области изучения грибов, противогрибковых препаратов, поиска новых противогрибковых средств. Проанализировано 75 источников литературы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика грибов и грибковых инфекций. Грибы являются самостоятельным царством живых организмов, насчитывающим порядка 150 тыс. видов, хотя предположения исследователей сводятся к гораздо большему разнообразию видов, которое, по меняющимся и все возрастающим оценкам, составляет от 1,5 до 13,2 млн видов [1–4]. Грибы являются вездесущими обитателями благодаря своим биологическим свойствам [5–7]:

- морфологическому дуализму (дрожжевая и гифальная форма клеток), обеспечивающему экологическую пластичность;
- гетеротрофному типу питания, обусловившему высокую развитость ферментных литических систем;
- множеству способов размножения и высокому репродуктивному потенциалу, позволяющему захватывать новые места обитания;
- ярко выраженным биосинтетическим, симбиотическим и антагонистическим способностям, развившимся благодаря обитанию в конкурентной среде.

Значительное биоразнообразие и сложная филогения грибов обусловила трудности их таксономии.

В настоящее время номенклатура грибов и грибоподобных организмов регулируется международным кодексом International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICNafp), который исторически сформирован на базе Международного кодекса ботанической номенклатуры на Международном ботаническом конгрессе в Мельбурне в 2011 году. Мировое сообщество микологов готовит новое издание ICNafp каждые 6 лет на основании заседаний Международного микологического конгресса, включающего 20 ведущих микологов мира. Последние изменения внесены решением Номенклатурной секции XIX Международного ботанического конгресса, который состоялся в Шэньчжэне, Китай, в июле 2017 года, тем самым Шэньчжэньский кодекс сменил Мельбурнский кодекс номенклатуры грибов [3]. В настоящее время выделяют 4 отдела грибов: низшие – *Chytridiomycota* и *Zygomycota* и высшие – *Ascomycota* и *Basidiomycota*.

Грибы являются активными и важными участниками экосистем, обитают в воде и в почвах, образуют симбиотические или паразитические взаимоотношения с растениями, имеют экономическое значение как источники средств биоконтроля, биотоплива, продуктов питания и пищевых добавок, промышленных ферментов и фармацевтических препаратов.

Медицинское значение имеет малая доля грибов, с заболеваниями человека взаимосвязано примерно 100 видов [8–12]. При этом значительное число возбудителей вызывает болезни как у человека, так и у животных, что придает им существенное эпидемиологическое значение в ветеринарной практике. Инфицированные и больные животные могут составлять значительный риск для здоровья человека [13].

Инфекции, вызванные грибковыми возбудителями, обобщенно называются микозами и приводят к широкому спектру заболеваний, включая аллергии, поверхностные инфекции, дерматомикозы и инвазивные (глубокие и системные) микозы. Эпидемиологически микозы подразделяются на контактные (высокозаразные инфекции) и оппортунистические (присоединяющиеся в качестве вторичных инфекций при снижении иммунных сил) [8–10, 14].

Поверхностные, или суперфициальные, микозы обусловлены поверхностной колонизацией грибами без проникновения в ткани, поражают слущивающиеся эпителиоциты, преимущественно кератоциты, развиваясь в волосах, ногтях и роговом слое кожи. Кожные микозы или дерматомикозы – поверхностные инфекции кожи и/или слизистых оболочек различных участков тела. Подкожные микозы поражают подкожную паренхиму и соединительную ткань. Глубокие микозы являются наиболее трудно излечиваемыми инфекциями, опасны, поскольку поражают внутренние органы. Сведения о возбудителях контактных микозов показаны в таблице 1.

Оппортунистические микотические инфекции развиваются у иммунокомпрометированных лиц. Круг

Таблица 1. Основные контагиозные микозы и их возбудители [9, 10]
Table 1. The main contagious mycoses and their pathogens [9, 10]

Тип микозов Type of mycoses	Микоз Mycosis	Возбудитель The causative agent	Отдел грибов Mushroom section
Поверхностные, или суперфициальные, микозы Superficial mycoses	Разноцветный лишай Multicolored lichen	<i>Malassezia furfur</i>	<i>Basidiomycota</i>
	Себорейный дерматит Seborrheic dermatitis	<i>Malassezia furfur</i>	<i>Basidiomycota</i>
	Белая пьедра The white piedra	<i>Trichosporon beigeli</i>	<i>Basidiomycota</i>
	Черная пьедра The black piedra	<i>Piedraia hortae</i>	<i>Ascomycota</i>
	Черный лишай Black lichen	<i>Hortaea werneckii</i>	<i>Ascomycota</i>
Кожные микозы (дерматомикозы) Cutaneous mycoses (dermatomycoses)	Эпидермофития Epidermophytosis	<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Ascomycota</i>
	Микроспория Microsporia	род <i>Microsporum</i> genus <i>Microsporum</i>	<i>Ascomycota</i>
	Трихофития Trichophytosis	род <i>Trichophyton</i> genus <i>Trichophyton</i>	<i>Ascomycota</i>
Подкожные микозы Subcutaneous mycoses	Лобомикоз Lobomycosis	<i>Loboa lobi</i>	<i>Ascomycota</i>
	Мицетома Mycetoma	Рода <i>Exophiala</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Madurella</i> , <i>Leptosphaeria</i> <i>Pseudallescheria</i> , <i>Curvularia</i> и др. Genus <i>Exophiala</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Madurella</i> , <i>Leptosphaeria</i> <i>Pseudallescheria</i> , <i>Curvularia</i> , etc.	<i>Ascomycota</i>
	Подкожный мукомикоз Subcutaneous mucormycosis	Рода <i>Absidia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Saksenaea</i> , <i>Rhizomucor</i> и др. Genus <i>Absidia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Saksenaea</i> , <i>Rhizomucor</i> , etc.	<i>Zygomycota</i>
	Подкожный энтомофторомикоз Subcutaneous entomophthoromycosis	<i>Basidiobolus ranarum</i>	<i>Basidiomycota</i>
		<i>Conidiobolus coronatus</i>	<i>Zygomycota</i>
	Хромобластомикоз Chromoblastomycosis	Рода <i>Fonsecaea</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Cladosporium</i> и др. Genus <i>Fonsecaea</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Cladosporium</i> , etc.	<i>Ascomycota</i>
Глубокие микозы Deep mycoses	Гистоплазмоз Histoplasmosis	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Ascomycota</i>
	Кокцидиомикоз Coccidiomycosis	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Ascomycota</i>
	Североамериканский бластомикоз North American blastomycosis	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Ascomycota</i>
	Южноамериканский бластомикоз South American blastomycosis	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Ascomycota</i>

их возбудителей широк, развиваются в основном у ВИЧ-инфицированных, иммунокомпроментированных лиц, онкологических пациентов, проходящих антибиотико-, химио- или радиотерапию, или зачастую как вторичные инфекции у лиц с тяжелыми вирусными или бактериальными инфекциями. К данной группе относят:

- ✓ Инфекции, вызываемые дрожжевыми грибами:
 - кандидоз (возбудители – грибы рода *Candida*, отдел *Ascomycota*);
 - криптококкоз (возбудитель – *Cryptococcus neoformans*, отдел *Basidiomycota*);
 - пневмоцистоз (возбудитель – *Pneumocystis carinii*, отдел *Ascomycota*).

- ✓ Инфекции, вызываемые гифальными грибами:
 - псевдаллергический (возбудитель – *Pseudallescheria boydii*, отдел *Ascomycota*);
 - аспергиллез (возбудители – грибы рода *Aspergillus*, отдел *Ascomycota*);
 - гиапофитомикозы (возбудители – грибы родов *Beauveria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* и др., отдел *Ascomycota*);
 - феогифомикозы (возбудители – грибы родов *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Exserohilum*, *Wangiella*, отдел *Ascomycota*);
 - зигомикозы (возбудители – грибы родов *Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, отдел *Zygomycota*) [9, 10].

Дрожжеподобные грибы *Candida albicans* и нитчатый гриб *Aspergillus fumigatus* на сегодняшний день являются наиболее важными причинами опасных для жизни оппортунистических инвазивных микозов. Около 10 % из более чем 200 видов рода *Aspergillus*, например *A. terreus*, *A. flavus* и *A. niger*, считаются патогенами для человека или оказывают другие неблагоприятные воздействия [15].

Примерно четверть всех видов дрожжей относится к роду *Candida* [16]. При этом общие оценки видового разнообразия кандид существенно различаются в разных источниках и составляет от 150 до 200 видов [17]. Распространенность *C. albicans* в клинических образцах *Candida* составляет 50–70 %. Инфекция *Candida glabrata* обнаруживается в 20–25 % клинических образцов. Менее распространенные патогенные и условно-патогенные виды рода *Candida* включают *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* и *C. parapsilosis*. Клинические проявления кандидоза зависят от места локализации процесса и могут включать поверхностные кандидозы, кандидозы слизистых оболочек, поражения ногтей, кишечника, репродуктивного тракта [18–24]. Резистентность к лекарственным средствам у *C. albicans* появляется лишь при очень длительном использовании антимикотических препаратов [25]. Различные проявления инфекций *C. albicans* связаны с образованием биопленок на поверхности биоматериалов [26, 27]. Приспособленность к выживанию *C. albicans* позволяет им эффективно колонизировать хозяина и приводит к распространению инфекции, вызывая тяжелое воспаление слизистой оболочки у пострадавших людей [28].

Важным патогенным для человека грибом, имеющим клиническое значение, является гриб *Cryptococcus neoformans*. Криптококковые поражения, включая тяжелую пневмонию и криптококковый менингит, являются наиболее распространенными оппортунистическими инфекциями среди больных СПИДом и людей с выраженными иммунодефицитами [29].

Микозы в целом редко поражают здоровых лиц с напряженным иммунитетом в противовес многим бактериальным и вирусным агентам [30–32].

В последнее время аккумулируются данные о том, что грибы обуславливают вторичные инфекции, ос-

ложения основной инфекции или хронического состояния, все чаще занимают весомое место среди возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в стационарах, в значительной степени осложняя течение болезни. Тем самым грибы стали прочно занимать значимое место среди резистентных к антифунгальным препаратам возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций и инфекций, связанных с медицинской и ветеринарной помощью [12, 33, 34].

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), распространенность микозов составляет в зависимости от региональных особенностей от 20 до 70 % всех инфекционных патологий человека. В мире от тяжелых, глубоких микозов страдают более 300 млн человек [30]. Глубокие микозы ежегодно обуславливают 1,2–1,5 млн летальных исходов [35]. В последние десятилетия наблюдается тенденция к росту инвазивных микозов, что приводит к значительной смертности. Так, например, в США заболеваемость сепсисом, вызванным патогенными грибами, увеличилась с 1991 г. по настоящее время более чем на 200 %, смертность от микозов увеличилась в 10 раз [30, 36]. Пандемия COVID-19 значительно усилила риск возникновения микозов [12]. Рост онкозаболеваний среди населения и применяемые методы жесткой терапии также способствуют росту микотической заболеваемости. В России микозы встречаются у 20 % населения, в Москве – у 25 %, при этом в возрасте от 70 лет и выше заболеваемость достигает 50 % [37]. Заболеваемость поверхностными дерматомикозами, вызываемыми *Microsporum* sp., флуктуирует на уровне более 50 случаев на 100 тыс. населения. Трихофития достигает 2,8 случаев на 100 тыс. населения [10, 38]. Являясь источником заражения человека, дерматомикозы домашних и сельскохозяйственных животных представляют собой значительную опасность и медико-социальную проблему во многих странах мира. Кроме того, эти инфекции наносят большой экономический ущерб сельскому хозяйству и животноводству [39]. Наиболее распространенными микозами в ветеринарной практике остаются микроспория и трихофития [40].

Тем самым следует отметить возрастающую роль грибковых инфекций в здравоохранении и ветеринарии, усугубление их течений, появление новых, устойчивых к антифунгальным препаратам видов и формирование резистентности у зарекомендовавших себя с этой стороны видов грибов, все возрастающие сложности в изучении и борьбе с микозами.

Классификация противогрибковых препаратов. Противогрибковые препараты на основании химического строения действующего вещества распределены на 5 основных групп (рисунок 1).

Полиены как антибиотики были внедрены в медицинскую и ветеринарную практику с 1950-х годов, механизм их действия хорошо изучен. Полиены, обладая мембраноактивными свойствами, создают в



Рисунок 1. Современная классификация антифунгальных лекарственных препаратов

Figure 1. Modern classification of antifungal drugs

мембранах грибов устойчивые гидрофильные каналы, в результате чего нарушаются осмотические свойства цитоплазмы и грибковые клетки теряют ионы и низкомолекулярные метаболиты, что делает невозможным восстановление клеток, возникает их гибель. Полиены в сравнении с остальными группами препаратов характеризуются максимальным спектром противогрибковой активности. Зигомицеты к полиенам малочувствительны, дерматомицеты – проявляют значительную устойчивость. При системном применении полиены активны в отношении большинства дрожжеподобных, мицелиальных и диморфных грибов (амфотерицин В). При локальном использовании активны только против *Candida* spp. (нистатин, натамицин, леворин) [9, 41].

В настоящее время исследователи работают над поиском механизма доставки в организм липидассоциированных форм амфотерицина В. Эти формы были получены еще в 1980-е годы, однако их использование ограничено малой биодоступностью. Среди данных форм известны:

- эквимольный комплекс амфотерицина В с липидами – абелсет;
- гидрофильный липосомальный амфотерицин В – амбизом;
- коллоидный дисперсионный амфотерицин В – амфоцил.

Данные формы имеют такие преимущества, как существенное снижение токсичности, лучшая переносимость, более высокие уровни накопления в крови, не проникают в ткань почек, эффективное противогрибковое воздействие при системных ми-

козах, редкость нежелательных реакций. Это позволяет использовать липидные комплексы амфотерицина В при неэффективности стандартного препарата при самых тяжелых формах глубоких микозов, у пациентов с почечной недостаточностью, возникшей нефротоксичности препарата, при ярко выраженных побочных реакциях на внутривенное введение назначенного другого противогрибкового препарата [42–44]. Азолы при приеме внутрь наиболее часто дают такие побочные реакции, как диспепсические нарушения, диарея, абдоминальная боль, атопии. При локальном использовании чаще возникает раздражение кожи. У липидассоциированных форм амфотерицина В нежелательные реакции возникают значительно реже.

Фармакологические свойства сведены в таблицу 2.

Азоловые противогрибковые средства в настоящее время имеют большое преимущество перед другими противогрибковыми препаратами в силу своих фармакологических свойств [9, 45]. Азолы связывают и ингибируют активный центр цитохром-Р-450-ланостерол-14-альфа-деметилазы (ЛС14АД). Цитохром-Р-450-ЛС14АД дрожжей участвует в важной стадии биосинтеза эргостерола. Поскольку ЛС14АД является мишенью азольных противогрибковых средств, этот фермент подвержен трансформациям, приводящим к устойчивости грибов к этой группе препаратов. У дрожжей ЛС14АД кодируется генами ERG11, у аспергиллов – Cyp51. Подавление ЛС14АД приводит к накоплению токсичных метилстеринов, что нарушает нормальную функцию плазмалеммы грибов. Тем самым осуществляется фунги-

Таблица 2. Полиеновые антибиотики

Table 2. Polyene antibiotics

Название Name of the drug	Год открытия Year of opening	Продуцент Producer	Спектр действия The spectrum of action	Лекарственные формы Dosage forms
Амфотерицин В Amphotericin B	1956	<i>Streptomyces nodosum</i>	При системном применении активно действует на большинство дрожжей, мицелиальных и диморфных грибов When applied systemically, it is active against most yeasts, mycelial and dimorphic fungi	Лиоф. порошок для инфузий, таблетки, мазь Liof. powder for infusions, tablets, ointment
Леворин levorin	1959	<i>Actinomyces levoris</i> Krass	При локальном применении действуют преимущественно на <i>Candida</i> spp. When applied topically, they act mainly on <i>Candida</i> spp.	Таблетки, мазь, гранулы для раствора для приема внутрь Tablets, ointment, granules for oral solution
Микогеptин Mycoheptin	1955	<i>Streptoverticillium mycoheptini</i> cum		Таблетки, мазь Tablets, ointment
Нистатин Nystatin	1954	<i>Streptomyces noursei</i>		Крем, ректальные таблетки, суппозитории вагинальные Cream, rectal tablets, suppositories vaginal
Натамицин Natamycin	1955	<i>Streptomyces natalensis</i>		Крем, суппозитории вагинальные, таблетки вагинальные Cream, suppositories vaginal, vaginal tablets
Липидассоциированные формы амфотерицина В Lipid-associated forms of amphotericin B	1980	Полусинтетический Semi-synthetic	Активен в отношении <i>Candida</i> spp., <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus</i> spp. и др. гифальных грибов, таких как зигомикеты It is active against <i>Candida</i> spp., <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus</i> spp. and other hyphal fungi such as zygomycetes	Лиоф. порошок для инфузий Liof tablets for infusion powder

статический эффект азолов в отношении дрожжевых грибов и фунгицидный эффект в отношении мицелиальных грибов [46].

При этом у азолов, представляющих собой группу с наиболее широким спектром препаратов, имеются различия в некоторых фармакокинетических характеристиках:

- при пероральном приеме полная абсорбция наблюдается у вориконазола и в меньшей степени – у флуконазола;
- абсорбция позаконазола и итраконазола увеличивается при приеме пищи;
- все азолы, кроме позаконазола и итраконазола, имеют высокое распределение в тканях при низких концентрациях в плазме;
- позаконазол и итраконазол имеют высокое сродство к белкам плазмы и весьма низкую свободную фракцию;
- итраконазол аккумулируется в коже и ногтях в количествах, в несколько раз больших, чем в сыроворотке;

- итраконазол и кетоконазол плохо проходят через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и гематофтальмический барьер (ГФБ);
- флуконазол хорошо проходит через ГЭБ и ГФБ, его уровень в спинномозговой жидкости может достигать 50–90 % от уровня в плазме.

Различия фармакологических свойства азолов определяют форму и варианты применения.

Расщепление азолов осуществляется с помощью изоферментов CYP450. Однако этот метаболический путь имеет нелинейную фармакокинетику с высоким риском взаимодействия с другими лекарственными средствами, что объясняется способностью азолов ингибировать изоферменты CYP450 [47]. Кетоназол отличается гепатотоксичностью. При системном применении азолы обуславливают следующие побочные реакции: абдоминальные боли, диспепсические проблемы, головные боли, нарушения печени, аллергические и гематологические реакции (тромбоцитопения, агранулоцитоз).

В таблицу 3 сведены фармакологические свойства азолов.

Аллиламины – синтетические препараты с преимущественно фунгицидным воздействием, обусловленным угнетением скваленэпоксидазы. Этот фермент совместно со скваленциклазой участвует в метаболическом пути трансформации сквалена в ланостерол – одной из промежуточных реакций синтеза эргостерола. В результате накопления сквалена происходит гибель клетки вследствие блокировки ранних метаболических стадий биосинтеза эргостерола. Клиническое значение аллиламины имеют только в отношении возбудителей дерматомикозов, и применяются в основном местно и наружно [41, 48].

Фармакологические свойства аллиламинов сведены в таблицу 4.

Эхинокандины – полусинтетические препараты, полученные в 2010-х годах. В клиническую практику внедрен только каспофунгин. В стадии клинических испытаний находятся еще два препарата – микафунгин и анидулафунгин. Каспофунгин – липопептидное соединение, производимое путем ферментации метаболических продуктов гриба *Glarea lozoyensis*. Эхинокандины блокируют функции фермента бета-1,3-глюкансинтазы, который является ключевым ферментом

реакции биосинтеза уникального вещества грибной клеточной мембраны – бета-(1,3)-D-глюкана. В результате нарушается формирование и обновление плазмалеммы. Каспофунгин обладает фунгицидной активностью в отношении *Candida* spp., преодолевая резистентность штаммов к азолам (флуконазолу, итраконазолу) и амфотерицину В. Каспофунгин проявляет фунгистатическую активность в отношении гифальных грибов *Aspergillus* spp., вегетативных форм *Pneumocystis carinii*. Этот препараты имеет мало побочных эффектов (известны аллергические реакции, анафилаксия). В связи с крайне низкой биодоступностью при пероральном приеме (не выше 1 %) этот препарат применяется только внутривенно [41, 49].

Противогрибковые препараты других групп имеют разнообразные фармакологические свойства. В клинической практике для системного использования чаще применяют гризеофульвин, флуцитозин, для локального использования – аморолфин, циклопирокс. Получены и другие эхинокандины, однако в настоящее время они проходят стадию испытаний. Среди новых эхинокандинов известны коринекандин, фузакандин, сордарины, циспентацин, азоксибациллин.

Таблица 3. Азолы

Table 3. Azoles

Название Name of the drug	Год открытия Year of opening	Спектр действия The spectrum of action	Применение Application	Лекарственные формы Dosage forms
Кетоконазол Ketoconazole	1978	Широкий спектр противогрибкового действия, в основном фунгистатический эффект A wide range of antifungal action, mainly a fungistatic effect	Внутрь Inside	Капсулы, таблетки Capsules, tablets
Флуконазол Fluconazole	1982		Внутрь Inside	Капсулы, таблетки, раствор для внутривенного введения Capsules, tablets, solution for intravenous administration
Итраконазол Itraconazole	1980		Внутрь Inside	Капсулы, раствор для приема внутрь Capsules, solution for oral capsules
Вориконазол Voriconazole	1995		Внутрь Inside	Таблетки, раствор для внутривенного введения Tablets, solution for intravenous administration
Клотримазол Clotrimazole	1969		Местно Locally	Мазь, крем, суппозитории вагинальные Ointment, cream, suppositories vaginal
Кетоконазол, бифоназол, изоконазол, миконазол, оксиконазол, эконазол Ketoconazole, bifonazole, isconazole, miconazole, ketconazole, econazole	1978		Местно Locally	Крем, мазь, суппозитории вагинальные, шампунь Cream, ointment, suppository, shampoo

Таблица 4. Аллиламины
Table 4. Allylamines

Название Name of the drug	Год открытия Year of opening	Спектр действия The spectrum of action	Лекарственные формы Dosage forms	Побочные реакции Adverse reactions
Тербинафин Terbinafine	1986	Дерматофитоз, онихомикозы, разноцветный лишай (местно) Dermatophytosis, onychomycosis, multicolored lichen (locally)	Крем, гель, спрей, мазь Cream, gel, spray, ointment	При системном использовании: головная боль, головокружение; аллергические и гематологические реакции, диспепсические расстройства, нарушения функций печени. При локальном использовании: поражения кожи, кожный зуд, сухость With systemic use: headache, gastrointestinal disorders, allergic and hematological reactions, dizziness; increased transaminase activity, cholestatic jaundice, liver failure. With local application: skin lesions, itching, dryness
Нафтифин Naftifin	1986		Крем, раствор для наружного применения Cream, solution for external use	

По направлению использования антифунгальные препараты классифицируют на три типа, включающих комбинацию из антибиотиков, химиотерапевтических препаратов разных химических групп и дезинфектантов (рисунок 2).

Устойчивость грибов к противогрибковым препаратам. Патогенные грибы обладают несколькими механизмами устойчивости к противогрибковым препаратам, обусловленными генетической пластичностью и универсальностью их гомеостатических реакций на стрессовые сигналы окружающей среды.

Устойчивость к антифунгальным препаратам можно разделить на внутреннюю (первичную) и приобретенную (вторичную). Первичная резистентность определяется транскрипцией генов и связана с видами грибов, которые по своей природе невосприимчивы к определенным противогрибковым препаратам и их устойчивость не зависит от предыдущего воздействия этих препаратов. Оценка и обнаружение этого типа устойчивости зависит от точной идентификации грибов на видовом уровне, что часто требует геномного секвенирования для дифференциации фенотипически сходных родственных видов [46].

Устойчивость к амфотерицину В встречается редко, поскольку устойчивость связана со значительными клеточными затратами на приспособленность к действию амфотерицина за счет канально-опосредованной проницаемости мембраны грибов [50]. Некоторые необычные грибковые патогены обладают врожденной устойчивостью, например *Candida guilliermondii*, *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus terreus*, некоторые представители *Mucorales* (например, *Cunninghamella*) [46].

Устойчивость к эхинокандинам, которые широко используются в качестве средства первой линии лечения инвазивного кандидоза и в качестве терапии при инвазивном аспергиллезе, остается относительно редкой у видов *Candida* (<3 % изолятов). Основным исключением является вид *C. glabrata*, у которого резистентность к каспофунгину возрастает, многие изоляты также демонстрируют перекрестную резистентность к другим эхинокандинам и противогрибковым триазолам (от 8 до 9 % изолятов) [51, 52].

Устойчивость к триазолам проявляют *Candida albicans*, обладающие пластичностью генома, который генерирует числовые и структурные геномные вариации как средство адаптации к противогрибковым препаратам. Показано, что устойчивость кандид к триазолам основана на формировании трисомии хромосомы R [53]. При этом трисомия Chr4 вносит значительный вклад в резистентность к флуконазолу, тогда как трисомия Chr6 практически не влияет на резистентность [54].

С эволюционной точки зрения развитие устойчивости к лекарственному средству позволяет грибам выживать в его присутствии, но может поставить под угрозу их приспособленность, проявляясь в снижении скорости роста и споруляции по сравнению с изогенным штаммом дикого типа в неселективных условиях. На практике динамические компенсаторные геномные изменения у грибов, несущих мутации, связанные с устойчивостью, приводят к изменениям приспособленности, варьирующимся от ослабления до улучшения [52].

Устойчивость к противогрибковым препаратам предсказывает терапевтический ответ на определенные комбинации видов грибов и лекарств. Однако корреляция между измерением минимальной подавляющей концентрацией (МПК) и клиническим



Рисунок 2. Современная классификация противогрибковых препаратов, применяемых для лечения разных типов микозов в клинической практике

Figure 2. Modern classification of antifungal drugs used in clinical practice for the treatment of various mycoses

ответом на лечение является несовершенной. Например, большинство пациентов, умирающих от кандидемии, инфицированы изолятами, определяемыми как чувствительные к лекарственным средствам в соответствии с принятыми контрольными точками МПК. В этой связи исследования по изучению активности противогрибковых препаратов необходимо расширять.

Синергетические комбинации противогрибковых препаратов с непротивогрибковыми агентами подчеркивают прагматическую стратегию, направленную на снижение развития лекарственной устойчивости и потенциальное перепрофилирование известных соединений с другими функциями, чтобы обойти дорогостоящую и трудоемкую разработку новых лекарств.

Перспективы разработки новых лекарственных препаратов на основе тиадиазола. Многие соединения, содержащие пятичленное гетероциклическое кольцо, обладают исключительными химическими свойствами и разносторонней биологической активностью. Тиадиазолы с 2010-х годов рассматриваются как универсальный каркас для получения но-

вых препаратов с терапевтическим потенциалом [55, 56]. Тиадиазол представляет собой биоизостер пириимидина и оксадиазола, и, учитывая распространенность пириимидина в природе, неудивительно, что тиадиазолы обладают значительным терапевтическим потенциалом. Атом серы тиадиазола придает улучшенную липорастворимость, а мезоионная природа тиадиазолов позволяет этим соединениям лучше проникать через клеточные мембраны. Тиадиазолсодержащие соединения обладают разнообразной биологической активностью, которая значительно шире, чем у азолов.

Каркасы триазола и имидазола более важны для создания антимикробных соединений, чем другие производные азола, такие как бензимидазол или тетразол [45]. Конъюгаты азол-сульфонамид более активны, чем отдельные сульфонамидные фрагменты, и могут оказаться ценными указаниями для дальнейшей оптимизации в качестве новых противомикробных агентов [57]. Новые производные тиазолхинолина, наделенные фармакофорной частью фторхинолонов, из-за их антимикробного действия показали противогрибковую активность с низкой ци-

тотоксичностью в отношении здоровых клеток и небольшим количеством возможных побочных эффектов [58].

Производные имидазолилхроманов с небензильной феноксиэтилоэфирной группой доказали антифунгальную активность против дрожжевых форм, включая *Candida albicans* и *Cryptococcus gattii*, а также гифальных грибов, таких как *Aspergillus fumigatus* и *Exophiala dermatitidis*. Протестированные молекулы показали меньшую активность против *C. gattii*, чем эталонный флуконазол, но большую, чем итраконазол [59].

Синтезированное производное, содержащее каркас 5-фенилтиофена, показало улучшенную противогрибковую активность по сравнению с коммерчески доступными флуконазолом, вориконазолом и итраконазолом против *Candida albicans* (ATCC SC5314), *Candida albicans* (CPC400616), *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* и *Candida glabrata* [60].

Новые 1,2,4-триазолы на основе сульфонамидов, полученные из ацетанилина и хлорсульфоновой кислоты путем сульфонилирования, аминлиза, N-алкилирования, проявляют превосходную антибактериальную, противовирусную, фунгицидную и другие виды активности [47, 61–64]; кроме того, хорошо сочетаются с противоопухолевой терапией, противодействуя грибковым инфекциям у онкологических больных [65].

Новое семейство из 30 селенсодержащих аналогов миконазола продемонстрировало сильную противогрибковую активность, мощные ингибирующие свойства в отношении дрожжей, устойчивых к флуконазолу. Результаты показали, что 2 из 30 соединений перспективны для дальнейших клинических исследований с целью разработки новых противогрибковых препаратов [66].

Z. Jiang et al. сообщили о разработке и синтезе новой серии из 24 производных триазола, содержащих замещенные 1,2- и 3-триазол-пиперидиновые боковые цепи. Большинство синтезированных производных продемонстрировали сильный ингибирующий эффект в отношении *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*. Результаты показали, что триазолильные и пиперидинильные группы в первую очередь демонстрируют гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия с сайтами генов TYR118, LEU121, LEU376, PHE380 и MET508 [67].

X. Chai et al. синтезировали новую серию из 34 частей 1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)-2-(2,4-дифторфенил)-3-[(4-замещенный фенил)пиперазин-1-ил]пропан-2-олов. Соединения показали противогрибковую активность в отношении *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida neoformans*, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporum gypseum* и *Aspergillus fumigatus*. Показана большая эффективность, чем у флуконазола, вориконазола и итраконазола. Наиболее сильной противогрибковой

активностью (МПК-80 0,0039–16 мкг/мл) обладало соединение 9a ((E)-N-(4-(4-(2-(2,4-дифторфенил)-2-гидрокси-3-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)пропил)пиперазин-1-ил)фенил)циннамамид). Также показано, что соединения взаимодействуют с остатками активного центра, образуя координационную связь с Fe⁺² гема. В петле FGG пиперазинильные боковые цепи соединений гидрофобно и посредством сил Ван-дер-Ваальса связываются с гидрофобными остатками TYR64, ALA117, TYR118, GLY65, LEU87, LEU88, MET92, PRO230, ILE231, PHE233, VAL234, LEU376, HIS377, SER379, ILE379, PHE380 и MET508 [68].

S. Zhao et al. исследовали 26 аналогов бензогетероцикла, ингибирующих ланостерол-14 α -деметилазу (CYP51). Соединения 10 ((S)-изопропил-2-(4,5-дигидронафто[2,1-d]изоксазол-3-карбоксамидо)-3-(1H-имидазол-1-ил)пропаноат) и 11 ((S)-изопропил-3-(1H-имидазол-1-ил)-2-(нафто[2,1-d]изоксазол-3-карбоксамидо)пропаноат) с ядрами 4,5-дигидронафто[2,1-d]изоксазола проявили активность против дрожжей *Candida albicans* (ATCC SC5314), *Candida albicans* (CPC400523), *Candida neoformans* (сг мсс 2.3161) и *Aspergillus fumigatus* (комикс 3.7795). Результаты исследования стабильности плазмы *in vitro* показали, что соединения 10 и 11 обладают замечательными метаболическими профилями в плазме человека. Кроме того, пять основных изоформ CYP человека (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4-М) были оценены в отношении соединений 10 и 11, среди них CYP3A4 показал легкую ингибирующую активность в анализе ингибирования цитохрома P450 со значением IC₅₀ 7,27 мкМ и 14,6 мкМ соответственно. Кроме того, соединения были пристыкованы к активному сайту CYP51 *Candida albicans* и CYP51 *A. fumigatus*, а имидазольное кольцо взаимодействует преимущественно через гидрофобные силы и силы Ван-дер-Ваальса [69].

По данным Y. Mahmoudi et al., противогрибковая активность *in vitro* новой серии девяти 1H-1,2,4-триазольных спиртов, включая производные N-(галобензил)пиперазина карбодитиоата, была протестирована против видов *Candida*. Соединение 12a (2-(2,4-дифторфенил)-2-гидрокси-3-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)пропил-4-(4-хлорбензил)пиперазин-1-карбодитиоат) показало противогрибковую активность (МПК 0,063–0,5 мкг/мл) в 4–32 раза выше, чем у флуконазола. Более того, отличная активность получена для соединения 12b (2-(2,4-дифторфенил)-2-гидрокси-3-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)пропил-4-(4-бром-бензил)пиперазин-1-карбодитиоат) после замены хлора в соединении 12a на бром. Интересно, что эффективное соединение 12a показало биосовместимость против клеток HepG2 и эритроцитов человека [70].

T. Zhu et al. показали мощную ингибирующую активность в отношении цельноклеточного фермента HDAC (гистондеацетилазы) у одного из 13 фунгицидных соединений (13 (8-(4-(4-(2-(2,4-дифторфенил)-2-гидрокси-3-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)пропил)пиперазин-1-ил)метил)фенокси)-N-гидрокси-октанамид),

являющихся двойными ингибиторами ферментов цитохрома P450 51 (CYP51) и деацетилазы гистонов. Цитотоксичность соединения 13 против HUVEC (линия эндотелиальных клеток пупочной вены человека) показала значение IC_{50} , равное 5,9 мкг/мл, при этом противогрибковая активность *in vitro* против *C. tropicalis* оказалась примерно в 12 раз выше, чем МИК стандартного препарата – МИК-80 (0,5 мкг/мл), по сравнению с МИК-80 (64 мкг/мл). Соединение 13 обладало избирательным противогрибковым действием, но при этом относительно нетоксично для клеток человека [71].

Y. Dong et al. разработали новую серию из 24 соединений – производных ариламида с двойной мишенью на основе анализа активных центров (SE, CYP51). Эффективность против тестируемых, устойчивых к лекарственным средствам грибов показали соединения 14a (N-(1-оксо-1-((пиридин-4-илметил)амино)пропан-2-ил)-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбокса-мид) и 14c (N-(1-оксо-1-((пиридин-3-илметил)амино)пропан-2-ил)-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбоксамид); соединение 14b (N-метил-N-(2-оксо-2-((пиридин-4-илметил)амино)этил)-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбоксамид) проявляло ингибирующее действие по сравнению с препаратами сравнения (нафтифин и флуконазол). Исследования показывают, что молекулы-мишени могут образовывать стабильную связывающую конформацию с рецептором скваленэпоксидазы SEE и обладают превосходными фармакокинетическими свойствами [72].

J. Wu et al. разработали два новых класса противогрибковых препаратов, объединяющих 21 уникальное соединение на основе (2R,3R)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)-2-(2,4-дифторфенила)-3-(N-замещенного), из которых несколько соединений, 16a, 16b, 16c, 16d, оказались более эффективны против *Aspergillus fumigatus*, чем флуконазол. Соединения 16a и 16e в значительно более низкой концентрации, чем у вориконазола (0,03125 мкг/мл), эффективны против *Cryptococcus neoformans*. Интересно, что соединение 16e эффективно снижало антисоциальное поведение у мышей *in vivo*. Молекулярный докинг далее показал, что сильная водородная связь морфолинового кольца в 16e ответственна за повышенное сродство с целевым ферментом [73].

Наконец, новая серия из 18 производных бензимидазол-триазола, полученная в исследовании N.O. Can et al., показала противогрибковую активность против нескольких штаммов *Candida* spp. Интересно, что соединения 19a и 19b снижают уровень эргостерина. Исследования докинга также показали биологическую значимость таких соединений [74].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, литературный анализ современных данных о разработках новых препаратов – производных триазола показал, что это весьма перспективная платформа для разработки многочисленных

соединений, демонстрирующих высокую активность против значимых инфекционных грибковых агентов – возбудителей микозов различных типов. Значительная перспективность триазолов обусловлена в том числе и фунгицидным влиянием в отношении устойчивых штаммов. Преимуществом новых производных является и низкий уровень подавляющих грибов концентраций, низкая цитотоксичность, что позволяет в перспективе использовать их для внутривенного введения.

Актуализация информации об эффективности новых антифунгальных соединений может способствовать формированию новых векторов исследований по поиску эффективных средств борьбы с микозами в различных сферах деятельности человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gautam A. K., Verma R. K., Avasthi S., Sushma, Bohra Y., Devadatha B., Niranjana M., Suwannarach N. Current Insight into Traditional and Modern Methods in Fungal Diversity Estimates. *Journal of Fungi*. 2022;8(3):226. DOI: 10.3390/jof8030226.
2. Hawksworth D. L., Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*. 2017;5(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
3. Lücking R., Aime M. C., Robbertse B., Miller A. N., Aoki T., Ariyawansa H. A., Cardinali G., Crous P. W., Druzhinina I. S., Geiser D. M., Hawksworth D. L., Hyde K. D., Irinyi L., Jeewon R., Johnston P. R., Kirk P. M., Malosso E., May T. W., Meyer W., Nilsson H. R., Öpik M., Robert V., Stadler M., Thines M., Vu D., Yurkov A. M., Zhang N., Schoch C. L. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nature Microbiology*. 2021;6(5):540–548. DOI: 10.1038/s41564-021-00888-x.
4. Wu B., Hussain M., Zhang W., Stadler M., Liu X., Xiang M. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*. 2019;10(3):127–140. DOI: 10.1080/21501203.2019.1614106.
5. Berbee M. L., James T. Y., Strullu-Derrien C. Early diverging fungi: diversity and impact at the dawn of terrestrial life. *Annual Review of Microbiology*. 2017;71:41–60. DOI: 10.1146/annurev-micro-030117-020324.
6. Devi R., Kaur T., Kour D., Rana K. L., Yadav A., Yadav A. N. Beneficial fungal communities from different habitats and their roles in plant growth promotion and soil health. *Microbial Biosystems*. 2020;5:21–47. DOI: 10.21608/mb.2020.32802.1016.
7. Wijayawardene N. N., Hyde K. D., Al-Ani L., Tedersoo L., Haelewaters D., Rajeshkumar K. C., Zhao R. L., Aptroot A., Leontyev D. V., Saxena R. K., Tokarev Y. S., Dai D. Q., Letcher P. M., Stephenson S. L., Ertz D., Lumbsch H. T., Kukwa M., Issi I. V., Madrid H., Phillips A. J. L., Selbmann L., Pfliegler W. P., Horváth E., Bensch K., Kirk P. M., Kolaříková K., Raja H. A., Radek R., Papp V., Dima B., Ma J., Malosso E., Takamatsu S., Rambold G., Gannibal P. B., Triebel D., Gautam A. K., Avasthi S., Suetrong S., Timdal E., Fryar S. C., Delgado G., Réblová M., Doilom M., Dolatbadi S., Pawłowska J. Z., Humber R. A., Kodsueb R., Sánchez-Castro I., Goto B. T., Silva D. K. A., de Souza F. A., Oehl F., da Silva G. A., Silva I. R., Błaszowski J., Jobim K., Maia L. C., Barbosa F. R., Fiuza P. O., Divakar P. K., She-

- noy B. D., Castañeda-Ruiz R. F., Somrithipol S., Lateef A. A., Karunarathna S. C., Tibpromma S., Mortimer P. E., Wanasinghe D. N., Phookamsak R., Xu J., Wang Y., Tian F., Alvarado P., Li D. W., Kušan I., Matočec N., Mešić A., Tkalčec Z., Maharachchikumbura S. S. N., Papizadeh M., Heredia G., Wartchow F., Bakhshi M., Boehm E., Youssef N., Hustain V. P., Lawrey J. D., Santiago A. L. C. M. A., Bezerra J. D. P., Souza-Motta C. M., Firmino A. L., Tian Q., Houbraken J., Hongsanan S., Tanaka K., Dissanayake A. J., Monteiro J. S., Grossart H. P., Suija A., Weerakoon G., Etayo J., Tsurukau A., Vázquez V., Mungai P., Damm U., Li Q. R., Zhang H., Boonmee S., Lu Y. Z., Becerra A. G., Kendrick B., Brearley F. Q., Motiejūnaitė J., Sharma B., Khare R., Gaikwad S., Wijesundara D. S. A., Tang L. Z., He M. Q., Flakus A., Rodriguez-Flakus P., Zhurbenko M. P., McKenzie E. H. C., Stadler M., Bhat D. J., Liu J. K., Raza M., Jeewon R., Nassonova E. S., Prieto M., Jayalal R. G. U., Erdoğan M., Yurkov A., Schnitler M., Shchepin O. N., Novozhilov Y. K., Silva-Filho A. G. S., Gentekaki E., Liu P., Cavender J. C., Kang Y., Mohammad S., Zhang L. F., Xu R. F., Li Y. M., Dayarathne M. C., Ekanayaka A. H., Wen T. C., Deng C. Y., Pereira O. L., Navathe S., Hawksworth D. L., Fan X. L., Dissanayake L. S., Kuhnert E., Grossart H. P., Thines M. Outline of *Fungi* and fungus-like taxa. *Mycosphere*. 2020;11:1060–1456. DOI: 10.5943/mycosphere/11/1/8.
8. Литусов Н. В. Медицинская микология. Екатеринбург: Уральский государственный медицинский университет; 2022. 53 с.
9. Саданов А. К., Березин В. Э., Треножникова Л. П., Балгимбаева А. С., Султанбекова Г. Д. Микозы человека и противогрибковые препараты. Алматы: Институт микробиологии и вирусологии; 2016. 315 с.
10. Уфимцева М. А., Антонова С. Б., Бочкарев Ю. М., Вишневская И. Ф., Сорокина К. Н., Николаева К. И., Гурковская Е. П., Шубина А. С., Симонова Н. В., Савченко Н. В., Мыльникова Е. С., Ефимова М. С. Грибковые инфекции кожи у детей. Екатеринбург: Уральский государственный медицинский университет; 2022. 116 с.
11. Guthke R., Linde J., Mech F., Figge M. T. Systems Biology of Microbial Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:00328.
12. Mahdi B. M. Review of Fungal Infection in Human Beings and Role of COVID-19 Pandemic. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*. 2021;15(4):887–897. DOI: 10.37506/ijfmt.v15i4.16815.
13. Овчинников Р. С. Грибковые инфекции животных. Возбудители. Диагностика. Терапия. Москва; 2013. 100 с.
14. Новикова В. В. Поиск новых антимикотических средств: основные тенденции и проблемы. *Человек и его здоровье*. 2020;1:75–81.
15. Todorova K. The moods of the genus *Aspergillus* and their toxins-health hazards in food. Researchgate; 2020.
16. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., editors. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier. 2011. 87–110 p.
17. Dinc G., Hizlisoğlu H. Clonal diversity and antifungal susceptibility of *Candida* spp. recovered from cow milk. *Mljekarstvo*. 2020;70(1):40–50.
18. Антонова Е. А., Косякова К. Г. Грибы рода *Candida* – возбудители инфекционных состояний. *Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*. 2019;14(1):455–459.
19. Доброхотова Ю. Э., Каранашева А. Х. Вульвовагинальный кандидоз у женщин репродуктивного возраста: иммунологические аспекты современных алгоритмов обследования и лечения. *Медицинский Совет*. 2022;16:57–61.
20. Кольцов И. П., Стрельникова Н. В., Витько Е. В., Витько Л. Г., Савлюк О. Е. Микробиологические свойства условно-патогенных сахаромикетов рода *Candida* при хронических, рецидивирующих инфекционно-воспалительных процессах (обзор литературы). *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2023;1:19–26. DOI: 10.34215/1609-1175-2023-1-19-26.
21. Козлова И. В., Лекарева Л. И., Быкова А. П., Мялина Ю. Н., Островская Л. Ю. Кандидоз желудочно-кишечного тракта. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016;3:40–46.
22. Хаббус А. Г., Ключарёва С. В., Белова Е. А., Алхилова С. М., Слободских Е. О. Онихомикоз и ониходистрофия – современные подходы к терапии. *Проблемы медицинской микологии*. 2020;3:140.
23. Askun T. Perspective Chapter: *Candida* and Candidiasis – Recent Taxonomic Developments, Invasion Biology, and Novel Active Compounds. In: Askun T., editor. *Candida and Candidiasis*. London: IntechOpen Limited; 2022.
24. Satoh K., Makimura K., Hasumi Y., Nishiyama Y., Uchida K., Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunology*. 2009;53(1):41–44. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x.
25. Livério H. O., da Silva Ruiz L., Freitas, da Silva Ruiz R. S., Nishikaku A., de Souza A. C., Paula C. R., Domaneschi C. Phenotypic and genotypic detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from oral mucosa of AIDS pediatric patients. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*. 2017;59:e14.
26. Александрова Н. А., Заславская М. И., Ипатова А. О., Махрова Т. В., Игнатова Н. И. Анализ биопленкообразования *Candida albicans*, *C. auris*, *C. glabrata* и *C. krusei*. *Проблемы медицинской микологии*. 2022;24(3):48–50.
27. Petrillo F., Sinocom M., Faa A. M., Galdiero M., Maione A., Galdiero E., Guida M., Reibaldi M. *Candida* Biofilm Eye Infection: Main Aspects and Advance in Novel Agents as Potential Source of Treatment. *Antibiotics*. 2023;12(8):1277. DOI: 10.3390/antibiotics12081277.
28. Fuchi V., Cardile V., Petronio G., Furneri P. M. Biological properties and production of bacteriocin-like-inhibitory substances by the *Lactobacillus* sp. strains from human vagina. *Journal of Applied Microbiology*. 2019;126(5):1541–1550. DOI: 10.1111/jam.14164.
29. Иванова Ю. А. Клинико-эпидемиологические особенности дерматомикозов у больных ВИЧ-инфекцией. *Проблемы медицинской микологии*. 2021;23(2):27–33.
30. Акимкин В. Г., Тутельян А. В., Шулакова Н. И. Микологический айсберг: современные сдвиги в эпидемиологии микозов. *Инфекционные болезни*. 2022;20(1):120–126. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-1-120-126.
31. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A. Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. *Journal of Applied Microbiology*. 2020;129(2):212–232. DOI: 10.1111/jam.14611.
32. Köhler J. R., Casadevall A., Perfect J. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014;5(1):a019273. DOI: 10.1101/cshperspect.a019273.

33. Острейков И. Ф., Мельникова Н. И., Бабаев Б. Д., Штатов М. К. Грибковая инфекция у детей с хирургической патологией в ОИТ. *Анестезиология и реаниматология*. 2017;62(4):310–315.
34. Suleyman G., Alangaden G.J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2021;35(4):1027–1053. DOI: 10.1016/j.idc.2021.08.002.
35. Климко Н. Н. Микозы – скрытая угроза. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2018;20(3):289–292.
36. De Paulo Menezes R., da Silveira Ferreira I. C., Mendonça Lopes M. S., Alves de Jesus T., Borges de Araújo L., Dos Santos Pedroso R., Von Dolinger de Brito Röder D. Epidemiological indicators and predictors of lethality associated with fungal infections in a NICU: a historical series. *Jornal de Pediatria*. 2024;100(3):267–276. DOI: 10.1016/j.jped.2023.11.005.
37. Соколова Т. В., Малярчук А. П., Малярчук Т. А. Клинико-эпидемиологический мониторинг поверхностных микозов в России и совершенствование терапии. *Русский Медицинский Журнал*. 2011;21:1327.
38. Силкина Т. А., Псеунова Д. Р., Янбухтина Э. Р. Грибковые инфекции – актуальность и возможности лабораторной диагностики. *Лаборатория ЛПУ Спецвыпуск*. 2014;(4):56.
39. Медведева Т. В., Леина Л. М., Петунова Я. Г., Милявская М. Р., Чилина Г. А., Соболева К. И., Минеева О. К. Антропонозная трихофития: частота встречаемости, этиология, проблемы диагностики и терапии. *Проблемы медицинской микологии*. 2020;22(3):103.
40. Жучок А. Ю., Кощаев А. Г., Гугушвили Н. Н. Диагностика и методы лечения дерматофитозов собак. *Сборник научных трудов КНЦЗВ*. 2022;11(1):282–285.
41. Лобанова Е. Г., Чекалина Н. Д. Современные аспекты фармакологии противогрибковых средств и возможности их использования в онкологии. *Регистр лекарственных средств России*. 2021.
42. Cuddihy G., Wasan E. K., Di Y., Wasan K. M. The development of oral amphotericin B to treat systemic fungal and parasitic infections: has the myth been finally realized? *Pharmaceutics*. 2019;11(3):99. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030099.
43. Das S., Devarajan P. V. Enhancing safety and efficacy by altering the toxic aggregated state of amphotericin B in lipidic nanoformulations. *Molecular Pharmaceutics*. 2020;17(6):2186–2195. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00313.
44. Jayson N., Pathak A., Jain K. One Platform Comparison of Polymeric and Lipidic Nanoparticles for the Delivery of Amphotericin B. *AAPS PharmSciTech*. 2023;24(8):226. DOI: 10.1208/s12249-023-02672-y.
45. Emami L., Faghih Z., Ataollahi E., Sadeghian S., Rezaei Z., Khabnadideh S. Azole Derivatives: Recent Advances as Potent Antibacterial and Antifungal Agents. *Current Medicinal Chemistry*. 2023;30(2):220–249. DOI: 10.2174/0929867329666220407094430.
46. Ben-Ami R., Kontoyiannis D. P. Resistance to Antifungal Drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2021;35(2):279–311. DOI: 10.1016/j.idc.2021.03.003.
47. Kazeminejad Z., Marzi M., Shiroudi A., Kouhpayeh S. A., Farjam M., Zarenezhad E. Novel 1, 2, 4-Triazoles as Antifungal Agents. *BioMed Research International*. 2022;2022:4584846. DOI: 10.1155/2022/4584846.
48. Trailokya A. A., Shirsat A. B., Madhu R., Shah B. Naftifine: A Topical Allylamine for Superficial Dermatophytosis. *Journal of the Association of Physicians of India*. 2023;71(5):11–12. DOI: 10.5005/japi-11001-0241.
49. Sacher A. J., Chahine E. B., Balcer H. E. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Annals of Pharmacotherapy*. 2009;43(10):1647–1657. DOI: 10.1345/aph.1M237.
50. Vincent B. M., Lancaster A. K., Scherz-Shouval R., Whitesell L., Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLOS Biology*. 2013;11(10):e1001692. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001692.
51. Веселов А. В. Резистентность *Candida glabrata* к эхинокандинам: некоторые аспекты проблемы. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(4):324–329. DOI: 10.36488/cmasc.2019.4.324-329.
52. Nagar D., Mohite P., Lonkar A., Chidrawar V. R., Dodiya R., Uddin M. J., Singh S., Prajapati B. G. An insight into new strategies and targets to combat antifungal resistance: A comprehensive review. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2024;10:100120. DOI: 10.1016/j.ejmcr.2023.100120.
53. Li X., Yang F., Li D., Zhou M., Wang X., Xu Q. Trisomy of chromosome R confers resistance to triazoles in *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2015;53(3):302-9.
54. Anderson M. Z., Saha A., Haseeb A., Bennett R. J. A chromosome 4 trisomy contributes to increased fluconazole resistance in a clinical isolate of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2017;163(6):856–865. DOI: 10.1099/mic.0.000478.
55. Li Y., Geng J., Liu Y., Yu S., Zhao G. Thiadiazole-a promising structure in medicinal chemistry. *ChemMedChem*. 2013;8(1):27–41. DOI: 10.1002/cmdc.201200355.
56. Haider S., Alam M. S., Hamid H. 1,3,4-Thiadiazoles: a potent multi targeted pharmacological scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;92:156–177. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.12.035.
57. Periwal P., Verma V., Kumar D., Kumar A., Bhatia M., Thakur S., Parshad M. Novel azole-sulfonamide conjugates as potential antimicrobial candidates: synthesis and biological assessment. *Future Medicinal Chemistry*. 2024;16(2):157–171. DOI: 10.4155/fmc-2023-0251.
58. Evren A. E., Karaduman A. B., Sağlik B. N., Özkay Y., Yurttaş L. Investigation of Novel Quinoline-Thiazole Derivatives as Antimicrobial Agents: *In Vitro* and *In Silico* Approaches. *ACS Omega*. 2022;8(1):1410–1429. DOI: 10.1021/acsomega.2c06871.
59. Babazadeh-Qazijahani M., Badali H., Irannejad H., Afsarian M. H., Emami S. Imidazolylchromanones containing non-benzylic oxime ethers: synthesis and molecular modelling study of new azole antifungals selective against *Cryptococcus Gattii*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;76:264–273. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.02.019.
60. Yin W., Zhang Y., Cui H., Jiang H., Liu L., Zheng Y., Wu T., Zhao L., Sun Y., Su X., Li S., Zhao D., Cheng M. Design, synthesize and evaluate novel 5-phenylthiophene derivatives as potent fungicidal of *Candida Albicans* and antifungal reagents of fluconazole-resistant fungi. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;225:113740. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113740.
61. Cao X., Wang W., Wang S., Bao L. Asymmetric synthesis of novel triazole derivatives and their in vitro antiviral activity and mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;139:718–725. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.08.057.

62. Chu X.-M., Wang C., Wang W.-L., Liang L.-L., Liu W., Gong K.-K., Sun K.-L. Triazole derivatives and their antiplasmodial and antimalarial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;166:206–223. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.047.
63. He S.-C., Zhang H.-Z., Zhang H.-J., Sun Q., Zhou C.-H. Design and Synthesis of Novel Sulfonamide-Derived Triazoles and Bioactivity Exploration. *Medicinal Chemistry*. 2020; 16(1):104–118. DOI: 10.2174/1573406414666181106124852.
64. Kaproń B., Czarnomys R., Wysokiński M., Andrys R., Musilek K., Angeli A., Supuran C. T., Plech T. 1,2,4-Triazole-based anticonvulsant agents with additional ROS scavenging activity are effective in a model of pharmacoresistant epilepsy. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2020;35(1):993–1002. DOI: 10.1080/14756366.2020.1748026.
65. Azanza J. K., Mensa J., Barberan J., Vázquez L., Pérez de Oteyza J., Kwon M., Yáñez L., Aguado J. M., Cubillo Gracian A., Solano C., Ruiz Camps I., Fortún J., Salavert Lletí M., Gudíol C., Olave Rubio T., Solano C., García-Vidal C., Rovira Tarrats M., Suárez-Lledó Grande M., González-Sierra P., Dueñas Gutiérrez C. Recommendations on the use of azole antifungals in hematology-oncology patients. *Revista Espanola de Quimioterapia*. 2023;36(3):236–258. DOI: 10.37201/req/013.2023.
66. Xu H., Su X., Guo M.-B., An R., Mou Y.-H., Hou Z., Guo C. Design, synthesis, and biological evaluation of novel miconazole analogues containing selenium as potent antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;198:112360. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112360.
67. Jiang Z., Gu J., Wang C. Wang S., Liu N., Jiang Y., Dong G., Wang Y., Liu Y., Yao J., Miao Z., Zhang W., Sheng C. Design, synthesis and antifungal activity of novel triazole derivatives containing substituted 1,2,3-triazole-piperidine side chains. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;82:490–497. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.079.
68. Chai X., Zhang J., Cao Y., Zou Y., Wu Q., Zhang D., Jiang Y., Sun Q. New azoles with antifungal activity: Design, synthesis, and molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011;21(2):686–689. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.12.006.
69. Zhao S., Wei P., Wu M., Zhang X., Zhao L., Jiang X., Hao C., Su X., Zhao D., Cheng M. Design, synthesis and evaluation of benzoheterocycle analogues as potent antifungal agents targeting CYP51. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(12):3242–3253. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.04.054.
70. Mahmoudi Y., Badali H., Hashemi S. M., Ansari M., Fakhim H., Fallah M., Shokrzadeh M., Emami S. New potent antifungal triazole alcohols containing N-benzylpiperazine carbodithioate moiety: synthesis, in vitro evaluation and silico study. *Bioorganic Chemistry*. 2019;90:103060. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103060.
71. Zhu T., Chen X., Li C., Tu J., Liu N., Xu D., Sheng C. Lanosterol 14 α -demethylase (CYP51)/histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for treatment of *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* infections. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;221:113524. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113524.
72. Dong Y., Liu X., An Y., Liu M., Han J., Sun B. Potent arylamide derivatives as dual-target antifungal agents: design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies. *Bioorganic Chemistry*. 2020;99:103749. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103749.
73. Wu J., Ni T., Chai X., Wang T., Wang H., Chen J., Jin Y., Zhang D., Yu S., Jiang Y. Molecular docking, design, synthesis and antifungal activity study of novel triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;143:1840–1846. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.081.
74. Vengurlekar S., Sharma R., Trivedi P. Synthesis, antifungal evaluation and molecular docking studies on 2-thioxoimidazolidin-4-one derivatives. *Medicinal Chemistry*. 2013;9(3):459–473. DOI: 10.2174/1573406411309030016.

REFERENCES

1. Gautam A. K., Verma R. K., Avasthi S., Sushma, Bohra Y., Devadatha B., Niranjana M., Suwannarach N. Current Insight into Traditional and Modern Methods in Fungal Diversity Estimates. *Journal of Fungi*. 2022;8(3):226. DOI: 10.3390/jof8030226.
2. Hawksworth D. L., Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*. 2017;5(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
3. Lücking R., Aime M. C., Robbertse B., Miller A. N., Aoki T., Ariyawansa H. A., Cardinali G., Crous P. W., Druzhinina I. S., Geiser D. M., Hawksworth D. L., Hyde K. D., Irinyi L., Jeewon R., Johnston P. R., Kirk P. M., Malosso E., May T. W., Meyer W., Nilsson H. R., Öpik M., Robert V., Stadler M., Thines M., Vu D., Yurkov A. M., Zhang N., Schoch C. L. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nature Microbiology*. 2021;6(5):540–548. DOI: 10.1038/s41564-021-00888-x.
4. Wu B., Hussain M., Zhang W., Stadler M., Liu X., Xiang M. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*. 2019;10(3):127–140. DOI: 10.1080/21501203.2019.1614106.
5. Berbee M. L., James T. Y., Strullu-Derrien C. Early diverging fungi: diversity and impact at the dawn of terrestrial life. *Annual Review of Microbiology*. 2017;71:41–60. DOI: 10.1146/annurev-micro-030117-020324.
6. Devi R., Kaur T., Kour D., Rana K. L., Yadav A., Yadav A. N. Beneficial fungal communities from different habitats and their roles in plant growth promotion and soil health. *Microbial Biosystems*. 2020;5:21–47. DOI: 10.21608/mb.2020.32802.1016.
7. Wijayawardene N. N., Hyde K. D., Al-Ani L., Tedersoo L., Haelewaters D., Rajeshkumar K. C., Zhao R. L., Aptroot A., Leontyev D. V., Saxena R. K., Tokarev Y. S., Dai D. Q., Letcher P. M., Stephenson S. L., Ertz D., Lumbsch H. T., Kukwa M., Issi I. V., Madrid H., Phillips A. J. L., Selbmann L., Pfliegler W. P., Horváth E., Bensch K., Kirk P. M., Kolaříková K., Raja H. A., Radek R., Papp V., Dima B., Ma J., Malosso E., Takamatsu S., Rambold G., Gannibal P. B., Triebel D., Gautam A. K., Avasthi S., Suetrong S., Timdal E., Fryar S. C., Delgado G., Réblová M., Doilom M., Dolatabadi S., Pawłowska J. Z., Humber R. A., Kodsueb R., Sánchez-Castro I., Goto B. T., Silva D. K. A., de Souza F. A., Oehl F., da Silva G. A., Silva I. R., Błaszowski J., Jobim K., Maia L. C., Barbosa F. R., Fiuza P. O., Divakar P. K., Shenoy B. D., Castañeda-Ruiz R. F., Somrithipol S., Lateef A. A., Karunarathna S. C., Tibpromma S., Mortimer P. E., Wanasinghe D. N., Phookamsak R., Xu J., Wang Y., Tian F., Alvarado P., Li D. W., Kušan I., Matočec N., Mešić A., Tkalčec Z., Maharachchikumbura S. S. N., Papizadeh M., Heredia G.,

- Wartchow F., Bakhshi M., Boehm E., Youssef N., Hus-tad V. P., Lawrey J. D., Santiago A. L. C. M. A., Bezerra J. D. P., Souza-Motta C. M., Firmino A. L., Tian Q., Houbraken J., Hongsanan S., Tanaka K., Dissanayake A. J., Monteiro J. S., Grossart H. P., Suija A., Weerakoon G., Etayo J., Tsurykau A., Vázquez V., Mungai P., Damm U., Li Q. R., Zhang H., Boon-mee S., Lu Y. Z., Becerra A. G., Kendrick B., Brearley F. Q., Motiejūnaitė J., Sharma B., Khare R., Gaikwad S., Wijesun-dara D. S. A., Tang L. Z., He M. Q., Flakus A., Rodriguez-Flakus P., Zhurbenko M. P., McKenzie E. H. C., Stadler M., Bhat D. J., Liu J. K., Raza M., Jeewon R., Nassonova E. S., Prieto M., Jayalal R. G. U., Erdoğan M., Yurkov A., Schnit-ler M., Shchepin O. N., Novozhilov Y. K., Silva-Filho A. G. S., Gentekaki E., Liu P., Cavender J. C., Kang Y., Moham-mad S., Zhang L. F., Xu R. F., Li Y. M., Dayarathne M. C., Ekanayaka A. H., Wen T. C., Deng C. Y., Pereira O. L., Na-vathe S., Hawksworth D. L., Fan X. L., Dissanayake L. S., Kuhnert E., Grossart H. P., Thines M. Outline of *Fungi* and fungus-like taxa. *Mycosphere*. 2020;11:1060–1456. DOI: 10.5943/mycosphere/11/1/8.
8. Litusov N. V. Medical mycology. Ekaterinburg: Ural State Medical University; 2022. 53 p. (In Russ.)
9. Sadanov A. K., Berezin V. E., Trenzchnikova L. P., Balgim-bayeva A. S., Sultanbekova G. D. Human mycoses and anti-fungal drugs. Almaty: Institute of Microbiology and Viro-logy; 2016. 315 p. (In Russ.)
10. Ufimtseva M. A., Antonova S. B., Bochkarev Yu. M., Vishnev-skaya I. F., Sorokina K. N., Nikolaeva K. I., Gurkovskaya E. P., Shubina A. S., Simonova N. V., Savchenko N. V., Mylniko-va E. S., Efimova M. S. Fungal skin infections in children. Ekaterinburg: Ural State Medical University; 2022. 116 p. (In Russ.)
11. Guthke R., Linde J., Mech F., Figge M. T. Systems Biology of Microbial Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:00328.
12. Mahdi B. M. Review of Fungal Infection in Human Beings and Role of COVID-19 Pandemic. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*. 2021;15(4):887–897. DOI: 10.37506/ijfmt.v15i4.16815.
13. Ovchinnikov R. S. Fungal infections of animals. Pathogens. Diagnostics. Therapy. Moscow; 2013. 100 p. (In Russ.)
14. Novikova V. V. Search for new antimycotic agents: main trends and problems. *The man and his health*. 2020;1:75–81. (In Russ.)
15. Todorova K. The moods of the genus *Aspergillus* and their toxins-health hazards in food. Researchgate; 2020.
16. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and mainte-nance of yeasts. In: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., editors. The Yeasts: A Taxonomic Study. Amsterdam: Else-vier. 2011. 87–110 p.
17. Dinc G., Hizlisoy H. Clonal diversity and antifungal sus-ceptibility of *Candida* spp. recovered from cow milk. *Mlje-karstvo*. 2020;70(1):40–50.
18. Antonova E. A., Kosyakova K. G. Fungi of the genus *Can-dida* are pathogens of infectious conditions. *Health is the basis of human potential: problems and ways to solve them*. 2019;14(1):455–459. (In Russ.)
19. Dobrokhotova Yu. E., Karanasheva A. H. Vulvovaginal can-didiasis in women of reproductive age: immunological aspects of modern algorithms for examination and treat-ment. *Medical Council*. 2022;(16):57–61. (In Russ.)
20. Koltsov I. P., Strelnikova N. V., Vitko E. V., Vitko L. G., Sav-lyuk O. E. Microbiological properties of opportunistic saccharomycetes of the genus *Candida* in chronic, re-current infectious inflammatory processes (literature re-view). *Pacific Medical Journal*. 2023;(1):19–26. (In Russ.) DOI: 10.34215/1609-1175-2023-1-19-26.
21. Kozlova I. V., Lekareva L. I., Bykova A. P., Myalina J. N., Ost-rovskaja L. J. Candidiasis gastrointestinal tract. *Experimen-tal and Clinical Gastroenterology*. 2016;(3):40–46. (In Russ.)
22. Khabbus A. G., Klyuchareva S. V., Belova E. A., Alkhilo-va S. M., Slobodskikh E. O. Onychomycosis and onycho-dystrophy are modern approaches to therapy. *Problems in medical mycology*. 2020;3:140. (In Russ.)
23. Askun T. Perspective Chapter: Candida and Candidiasis – Recent Taxonomic Developments, Invasion Biology, and Novel Active Compounds. In: Askun T., editor. *Candida and Candidiasis*. London: IntechOpen Limited; 2022.
24. Satoh K., Makimura K., Hasumi Y., Nishiyama Y., Uchida K., Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomyce-tous yeast isolated from the external ear canal of an inpa-tient in a Japanese hospital. *Microbiology and Immunolo-gy*. 2009;53(1):41–44. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x.
25. Livério H. O., da Silva Ruiz L., Freitas, da Silva Ruiz R. S., Nishikaku A., de Souza A. C., Paula C. R., Domaneschi C. Phenotypic and genotypic detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from oral muco-sa of AIDS pediatric patients. *Revista Do Instituto De Medi-cina Tropical De São Paulo*. 2017;59:e14.
26. Alexandrova N. A., Zaslavskaya M. I., Ipatova A. O., Makhro-va T. V., Ignatova N. I. Biofilm formation analysis of *Can-dida albicans*, *C. auris*, *C. glabrata* and *C. krusei*. *Problems in medical mycology*. 2022;24(3):48–50. (In Russ.)
27. Petrillo F., Sinocom M., Faa A. M., Galdiero M., Maione A., Galdiero E., Guida M., Reibaldi M. *Candida* Biofilm Eye In-fection: Main Aspects and Advance in Novel Agents as Potential Source of Treatment. *Antibiotics*. 2023;12(8):1277. DOI: 10.3390/antibiotics12081277.
28. Fuchi V., Cardile V., Petronio G., Furneri P. M. Biological properties and production of bacteriocin-like-inhibito-ry substances by the *Lactobacillus* sp. strains from human vagina. *Journal of Applied Microbiology*. 2019;126(5):1541–1550. DOI: 10.1111/jam.14164.
29. Ivanova Yu. A. Clinical and epidemiological features of dermatomycosis in patients with HIV infection. *Problems in medical mycology*. 2021;23(2):27–33. (In Russ.)
30. Akimkin V. G., Tutelyan A. V., Shulakova N. I. Mycologi-cal iceberg: modern shifts in the epidemiology of myco-ses. *Infectious diseases*. 2022;20(1):120–126. (In Russ.) DOI: 10.20953/1729-9225-2022-1-120-126.
31. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A. Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of der-matophyte infections. *Journal of Applied Microbiology*. 2020;129(2):212–232. DOI: 10.1111/jam.14611.
32. Köhler J. R., Casadevall A., Perfect J. The spectrum of fun-gi that infects humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Me-dicine*. 2014;5(1):a019273. DOI: 10.1101/cshperspect.a019273.
33. Ostreykov I. F., Mel'nikova N. I., Babaev B. D., Shtatnov M. K. Fungal infection in children with surgical disease in the ICU. *Anesthesiology and Reanimatology*. 2017;62(4):310–315. (In Russ.)
34. Suleyman G., Alangaden G. J. Nosocomial Fungal Infec-tions: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2021;35(4):1027–1053. DOI: 10.1016/j.idc.2021.08.002.
35. Klimko N. N. Mycoses are the implicit threat. *Extreme Me-dicine*. 2018;20(3):282–292. (In Russ.)

36. De Paulo Menezes R., da Silveira Ferreira I.C., Mendonça Lopes M.S., Alves de Jesus T., Borges de Araújo L., Dos Santos Pedrosa R., Von Dolinger de Brito Röder D. Epidemiological indicators and predictors of lethality associated with fungal infections in a NICU: a historical series. *Jornal de Pediatria*. 2024;100(3):267–276. DOI: 10.1016/j.jpmed.2023.11.005.
37. Sokolova T.V., Malyarchuk A.P., Malyarchuk T.A. Clinical and epidemiological monitoring of superficial mycoses in Russia and improvement of therapy. *Russian Medical Journal*. 2011;21:1327. (In Russ.)
38. Silkina T.A., Pseunova D.R., Yanbukhtina E.R. Fungal infections – relevance and possibilities of laboratory diagnostics. *Laboratory LPU. Special issue*. 2014;(4):56. (In Russ.)
39. Medvedeva T.V., Leina L.M., Petunova Ya.G., Milyavskaya M.R., Chilina G.A., Soboleva K.I., Mineeva O.K. Anthropophilic trichophytosis: frequency of occurrence, etiology, problems of diagnosis and therapy. *Problems in medical mycology*. 2020;22(3):103. (In Russ.)
40. Zhuchok A.Yu., Koshchaev A.G., Gugushvili N.N. Diagnostics and treatment of dog's dermatophytosis. *Collection of scientific papers of KRCAHVM*. 2022;11(1):282–285. (In Russ.)
41. Lobanova E.G., Chekalina N.D. Modern aspects of the pharmacology of antifungal agents and the possibility of their use in oncology. *Registr lekarstvennh sredstv Rossii*. 2021. (In Russ.)
42. Cuddihy G., Wasan E.K., Di Y., Wasan K.M. The development of oral amphotericin B to treat systemic fungal and parasitic infections: has the myth been finally realized? *Pharmaceutics*. 2019;11(3):99. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030099.
43. Das S., Devarajan P.V. Enhancing safety and efficacy by altering the toxic aggregated state of amphotericin B in lipidic nanoformulations. *Molecular Pharmaceutics*. 2020;17(6): 2186–2195. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00313.
44. Jayson N., Pathak A., Jain K. One Platform Comparison of Polymeric and Lipidic Nanoparticles for the Delivery of Amphotericin B. *AAPS PharmSciTech*. 2023;24(8):226. DOI: 10.1208/s12249-023-02672-y.
45. Emami L., Faghih Z., Ataollahi E., Sadeghian S., Rezaei Z., Khabnadideh S. Azole Derivatives: Recent Advances as Potent Antibacterial and Antifungal Agents. *Current Medicinal Chemistry*. 2023;30(2):220–249. DOI: 10.2174/0929867329666220407094430.
46. Ben-Ami R., Kontoyiannis D.P. Resistance to Antifungal Drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2021;35(2):279–311. DOI: 10.1016/j.idc.2021.03.003.
47. Kazeminejad Z., Marzi M., Shiroudi A., Kouhpayeh S.A., Farjam M., Zarenezhad E. Novel 1, 2, 4-Triazoles as Antifungal Agents. *BioMed Research International*. 2022;2022:4584846. DOI: 10.1155/2022/4584846.
48. Trailokya A.A., Shirsat A.B., Madhu R., Shah B. Naftifine: A Topical Allylamine for Superficial Dermatophytosis. *Journal of the Association of Physicians of India*. 2023;71(5):11–12. DOI: 10.5005/japi-11001-0241.
49. Sacher A.J., Chahine E.B., Balcer H.E. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Annals of Pharmacotherapy*. 2009;43(10):1647–1657. DOI: 10.1345/aph.1M237.
50. Vincent B.M., Lancaster A.K., Scherz-Shouval R., Whitesell L., Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLOS Biology*. 2013;11(10):e1001692. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001692.
51. Veselov A.V. Some issues of the resistance of *Candida glabrata* to echinocandins. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(4):324–329. (In Russ.) DOI: 10.36488/cmacc.2019.4.324-329.
52. Nagar D., Mohite P., Lonkar A., Chidrawar V.R., Dodiya R., Uddin M.J., Singh S., Prajapati B. G. An insight into new strategies and targets to combat antifungal resistance: A comprehensive review. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2024;10:100120. DOI: 10.1016/j.ejmcr.2023.100120.
53. Li X., Yang F., Li D., Zhou M., Wang X., Xu Q. Trisomy of chromosome R confers resistance to triazoles in *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2015;53(3):302-9.
54. Anderson M.Z., Saha A., Haseeb A., Bennett R.J. A chromosome 4 trisomy contributes to increased fluconazole resistance in a clinical isolate of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2017;163(6):856–865. DOI: 10.1099/mic.0.000478.
55. Li Y., Geng J., Liu Y., Yu S., Zhao G. Thiadiazole-a promising structure in medicinal chemistry. *ChemMedChem*. 2013;8(1):27–41. DOI: 10.1002/cmdc.201200355.
56. Haider S., Alam M.S., Hamid H. 1,3,4-Thiadiazoles: a potent multi targeted pharmacological scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;92:156–177. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.12.035.
57. Periwal P., Verma V., Kumar D., Kumar A., Bhatia M., Thakur S., Parshad M. Novel azole-sulfonamide conjugates as potential antimicrobial candidates: synthesis and biological assessment. *Future Medicinal Chemistry*. 2024;16(2):157–171. DOI: 10.4155/fmc-2023-0251.
58. Evren A.E., Karaduman A.B., Sağlık B.N., Özkay Y., Yurttaş L. Investigation of Novel Quinoline-Thiazole Derivatives as Antimicrobial Agents: *In Vitro* and *In Silico* Approaches. *ACS Omega*. 2022;8(1):1410–1429. DOI: 10.1021/acsomega.2c06871.
59. Babazadeh-Qazijahani M., Badali H., Irannejad H., Afsarian M.H., Emami S. Imidazolylchromanones containing non-benzylic oxime ethers: synthesis and molecular modelling study of new azole antifungals selective against *Cryptococcus Gattii*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;76:264–273. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.02.019.
60. Yin W., Zhang Y., Cui H., Jiang H., Liu L., Zheng Y., Wu T., Zhao L., Sun Y., Su X., Li S., Zhao D., Cheng M. Design, synthesize and evaluate novel 5-phenylthiophene derivatives as potent fungicidal of *Candida Albicans* and antifungal reagents of fluconazole-resistant fungi. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;225:113740. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113740.
61. Cao X., Wang W., Wang S., Bao L. Asymmetric synthesis of novel triazole derivatives and their in vitro antiviral activity and mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;139:718–725. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.08.057.
62. Chu X.-M., Wang C., Wang W.-L., Liang L.-L., Liu W., Gong K.-K., Sun K.-L. Triazole derivatives and their antiplasmodial and antimalarial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;166:206–223. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.047.
63. He S.-C., Zhang H.-Z., Zhang H.-J., Sun Q., Zhou C.-H. Design and Synthesis of Novel Sulfonamide-Derived Triazoles and Bioactivity Exploration. *Medicinal Chemistry*. 2020;16(1):104–118. DOI: 10.2174/1573406414666181106124852.
64. Kaproń B., Czarnomys R., Wysocki M., Andrys R., Musilek K., Angeli A., Supuran C.T., Plech T. 1,2,4-Triazole-based anticonvulsant agents with additional ROS scavenging ac-

- tivity are effective in a model of pharmaco-resistant epilepsy. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2020;35(1):993–1002. DOI: 10.1080/14756366.2020.1748026.
65. Azanza J. K., Mensa J., Barberan J., Vázquez L., Pérez de Oteyza J., Kwon M., Yáñez L., Aguado J. M., Cubillo Gracian A., Solano C., Ruiz Camps I., Fortún J., Salavert Lletí M., Gudiol C., Olave Rubio T., Solano C., García-Vidal C., Rovira Tarrats M., Suárez-Lledó Grande M., González-Sierra P., Dueñas Gutiérrez C. Recommendations on the use of azole antifungals in hematology-oncology patients. *Revista Espanola de Quimioterapia*. 2023;36(3):236–258. DOI: 10.37201/req/013.2023.
66. Xu H., Su X., Guo M.-B., An R., Mou Y.-H., Hou Z., Guo C. Design, synthesis, and biological evaluation of novel miconazole analogues containing selenium as potent antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;198:112360. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112360.
67. Jiang Z., Gu J., Wang C. Wang S., Liu N., Jiang Y., Dong G., Wang Y., Liu Y., Yao J., Miao Z., Zhang W., Sheng C. Design, synthesis and antifungal activity of novel triazole derivatives containing substituted 1,2,3-triazole-piperidine side chains. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;82:490–497. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.079.
68. Chai X., Zhang J., Cao Y., Zou Y., Wu Q., Zhang D., Jiang Y., Sun Q. New azoles with antifungal activity: Design, synthesis, and molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011;21(2):686–689. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.12.006.
69. Zhao S., Wei P., Wu M., Zhang X., Zhao L., Jiang X., Hao C., Su X., Zhao D., Cheng M. Design, synthesis and evaluation of benzoheterocycle analogues as potent antifungal agents targeting CYP51. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(12):3242–3253. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.04.054.
70. Mahmoudi Y., Badali H., Hashemi S. M., Ansari M., Fakhim H., Fallah M., Shokrzadeh M., Emami S. New potent antifungal triazole alcohols containing N-benzylpiperazine carbodithioate moiety: synthesis, in vitro evaluation and silico study. *Bioorganic Chemistry*. 2019;90:103060. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103060.
71. Zhu T., Chen X., Li C., Tu J., Liu N., Xu D., Sheng C. Lanosterol 14 α -demethylase (CYP51)/histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for treatment of *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* infections. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;221:113524. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113524.
72. Dong Y., Liu X., An Y., Liu M., Han J., Sun B. Potent arylamide derivatives as dual-target antifungal agents: design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies. *Bioorganic Chemistry*. 2020;99:103749. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103749.
73. Wu J., Ni T., Chai X., Wang T., Wang H., Chen J., Jin Y., Zhang D., Yu S., Jiang Y. Molecular docking, design, synthesis and antifungal activity study of novel triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;143:1840–1846. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.081.
74. Vengurlekar S., Sharma R., Trivedi P. Synthesis, antifungal evaluation and molecular docking studies on 2-thioxoimidazolidin-4-one derivatives. *Medicinal Chemistry*. 2013;9(3):459–473. DOI: 10.2174/1573406411309030016.



Перспективные клеточные системы для таргетной доставки нано- и микроносителей, нагруженных лекарственными или биологическими молекулами (обзор)

Л. А. Мирошниченко¹, Т. Ю. Полякова¹, И. А. Хлусов¹, Е. Ю. Авдеева¹,
В. Г. Лужанин²✉, Е. И. Молохова², А. Л. Голованенко², М. Ю. Хлусова¹, М. В. Белоусов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России). 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России). 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

✉ Контактное лицо: Лужанин Владимир Геннадьевич. E-mail: vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

ORCID: Л. А. Мирошниченко – <https://orcid.org/0000-0002-3684-5510>;

Т. Ю. Полякова – <https://orcid.org/0000-0003-0971-7844>;

И. А. Хлусов – <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>;

Е. Ю. Авдеева – <https://orcid.org/0000-0001-7061-9843>;

В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>;

Е. И. Молохова – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>;

А. Л. Голованенко – <https://orcid.org/0000-0002-1781-353X>;

М. Ю. Хлусова – <https://orcid.org/0000-0001-9583-5358>;

М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 13.08.2024

Статья принята в печать: 11.11.2024

Статья опубликована: 15.11.2024

Резюме

Введение. Клеточные системы целевой доставки лекарственных и биологических молекул (drug delivery systems, DDSs) рассматриваются в настоящее время как перспективное решение проблем нано- и микроразмерных носителей лекарственных препаратов.

Текст. В обзоре в сжатом виде рассмотрены фундаментальные и прикладные вопросы разработки клеточных DDSs, морфофункциональное разнообразие которых теоретически позволяет решать задачи фармакотерапии различных заболеваний. Представлены источники, суммирующие клинические протоколы применения клеточных DDSs, которые ограничены тем не менее противоопухолевой и противовоспалительной терапией. Описываются достоинства, а также частные и общие недостатки использования тех или иных клеток (клетки крови, иммунocyты, стволовые клетки) как перспективных платформ для трансляции в клиническую практику средств доставки различных лекарственных препаратов (антибиотики, цитостатики, моноклональные антитела, ферменты и т. п.), загруженных в нано- и микроразмерные DDSs.

Заключение. Несмотря на очевидные и впечатляющие успехи фундаментальных и прикладных исследований в данной области, впереди непростой путь оптимизации процессов таргетной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных и биологических молекул с помощью клеточных DDSs.

Ключевые слова: таргетная доставка лекарств и биомолекул, клеточные платформы, достижения, проблемы

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

Вклад авторов. Л. А. Мирошниченко, Т. Ю. Полякова, И. А. Хлусов проработали литературные источники, участвовали в написании текста статьи. Е. Ю. Авдеева проработала графический материал, участвовала в написании текста статьи. М. Ю. Хлусова осуществила поиск литературных источников, участвовала в написании и утверждении текста статьи. В. Г. Лужанин, М. В. Белоусов, Е. И. Молохова, А. Л. Голованенко участвовали в написании и утверждении текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» Сибирского государственного медицинского университета.

© Мирошниченко Л. А., Полякова Т. Ю., Хлусов И. А., Авдеева Е. Ю., Лужанин В. Г., Молохова Е. И., Голованенко А. Л., Хлусова М. Ю., Белоусов М. В., 2024

© Miroshnichenko L. A., Polyakova T. Yu., Khlusov I. A., Avdeeva E. Yu., Luzhanin V. G., Molokhova E. I., Golovanenko A. L., Khlusova M. Yu., Belousov M. V., 2024

Для цитирования: Мирошниченко Л. А., Полякова Т. Ю., Хлусов И. А., Авдеева Е. Ю., Лужанин В. Г., Молохова Е. И., Голованенко А. Л., Хлусова М. Ю., Белоусов М. В. Перспективные клеточные системы для таргетной доставки нано- и микроносителей, нагруженных лекарственными или биологическими молекулами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):45–59. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1897>

Promising cell systems for targeted delivery of nano- and microcarriers loaded with drugs or biomolecules (review)

Larisa A. Miroshnichenko¹, Tatiana Yu. Polyakova¹, Igor A. Khlusov¹, Elena Yu. Avdeeva¹, Vladimir G. Luzhanin²✉, Elena I. Molokhova², Anna L. Golovanenko², Marina Yu. Khlusova¹, Mikhail V. Belousov¹

¹ Siberian State Medical University, SSMU. 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

✉ **Corresponding author:** Vladimir G. Luzhanin. **E-mail:** vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

ORCID: Larisa A. Miroshnichenko – <https://orcid.org/0000-0002-3684-5510>;

Tatiana Yu. Polyakova – <https://orcid.org/0000-0003-0971-7844>;

Igor A. Khlusov – <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>;

Elena Yu. Avdeeva – <https://orcid.org/0000-0001-7061-9843>;

Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>;

Elena I. Molokhova – <https://orcid.org/0000-0003-0334-8590>;

Anna L. Golovanenko – <https://orcid.org/0000-0002-1781-353X>;

Marina Yu. Khlusova – <https://orcid.org/0000-0001-9583-5358>;

Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 13.08.2024

Accepted: 11.11.2024

Published: 15.11.2024

Abstract

Introduction. Cellular systems for targeted delivery of drug and biological molecules (drug delivery systems, DDSs) are currently considered as a promising solution to the problems of nano- and micro-sized drug carriers.

Text. The review briefly examines fundamental and applied issues in the development of cellular DDSs, the morphofunctional diversity of which theoretically makes it possible to solve the problems of pharmacotherapy of various diseases. Sources are presented summarizing clinical protocols for the use of cellular DDSs, which are, however, limited to antitumor and anti-inflammatory therapy. The advantages, as well as particular and general disadvantages of using certain cells (blood cells, immunocytes, stem cells) as promising platforms for translation into clinical practice of delivery vehicles for various drugs (antibiotics, cytostatics, monoclonal antibodies, enzymes, etc.) loaded into nano- and micro-sized DDSs.

Conclusion. Despite the obvious and impressive successes of fundamental and applied research in this area, a difficult path lies ahead in optimizing the processes of targeted delivery and controlled release of drug and biological molecules using cellular DDSs.

Keywords: targeted delivery of drugs and biomolecules, cellular platforms, achievements, problems

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. Larisa A. Miroshnichenko, Tatiana Yu. Polyakova, Igor A. Khlusov studied literary sources, participated in writing the text. Elena Yu. Avdeeva created graphic material, participated in writing the text. Marina Yu. Khlusova searched for literary sources, participated in writing and approving the text. Vladimir G. Luzhanin, Mikhail V. Belousov, Elena I. Molokhova, Anna L. Golovanenko participated in writing and approving the text.

Funding. The investigation was supported by the Siberian State Medical University development program Priority 2030.

For citation: Miroshnichenko L. A., Polyakova T. Yu., Khlusov I. A., Avdeeva E. Yu., Luzhanin V. G., Molokhova E. I., Golovanenko A. L., Khlusova M. Yu., Belousov M. V. Promising cell systems for targeted delivery of nano- and microcarriers loaded with drugs or biomolecules. *Drug development & registration*. 2024;13(4):45–59. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1897>

ВВЕДЕНИЕ

Системы доставки лекарств и биологических молекул являются одним из наиболее перспективных и изучаемых научно-практических направлений фармации, фармакологии и биотехнологии. С 1945 года

в базе данных Pubmed¹ количество публикаций по ключевому словосочетанию «системы доставки лекарств» (drug delivery systems, DDSs) превысило уже

¹ PubMed®. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed: 13.08.2024.

204 тысячи ссылок с максимумом в 2020 году (более 13 тысяч опубликованных статей).

Однако с 2021 года отмечается определенный спад интереса, достигший в 2023 году в абсолютном выражении только 9711 опубликованных статей (75 % от уровня 2020 года). По теме «целевые системы доставки лекарств» (targeted DDSs) наблюдается во многом схожая тенденция: максимум публикаций (4674) в 2020 году и снижение до 3729 статей (80 % от уровня 2020 года) к 2023 году. Среди причин подобной закономерности может быть, конечно, пандемия COVID-19 и, возможно, временное разочарование, обусловленное нерешенными проблемами DDS, включая нежелательные побочные эффекты, токсичность, незначительную терапевтическую эффективность, плохую контролируемость распределения в организме и низкую проницаемость тканевых барьеров [1].

В этом плане с 2000 года стали уделять повышенное внимание клеточным системам как потенциальным носителям DDSs для устранения ограничений классических нано- и микроносителей, основанных на достижениях медицинского материаловедения, для достижения продолжительной циркуляции в организме [2]. Тем не менее по ключевому словосочетанию «cell-based drug delivery systems» база Pubmed содержит с 1990 года всего 958 ссылок (0,5 % от всех статей по DDSs), что может быть частично связано с новыми технологическими, биомедицинскими и этическими барьерами практического применения клеточно-опосредованных DDSs [3].

В связи с этим краткий критический обзор публикаций (в основном за последние 5–10 лет), касающихся применения клеток как потенциальных DDSs для различных лекарственных и биологических молекул, их достоинств, недостатков и перспектив применения в клинической практике, представляется актуальным и своевременным.

Клетки, перспективные для доставки нано- и микроносителей лекарственных средств и биологических молекул

Современные методы микро-, нано- и биотехнологии, развивающиеся на стыке биологии, генетики, химии и физики, позволили создать новые, инновационные системы доставки лекарственных веществ и биомолекул на основе нано- и микроразмерных частиц, лишенных многих нежелательных побочных эффектов и гипотетически способных к направленному транспорту в патологический очаг [4–6].

В настоящее время разрабатываются и исследуются носители лекарственных и биологических молекул на основе биосовместимых материалов различной размерности, в том числе:

- ✓ полиэлектролитные нано- и микрокапсулы;
- ✓ полимерные нано- и микроматериалы (микро- и нановолоконные каркасы, нановолокна, микро- и

наночастицы, микро- и наносферы, нанодиски и наностержни, полимерные мицеллы, дендримеры, полиплексы);

- ✓ липосомы и липосомальные системы;
- ✓ гидрогели;
- ✓ биологические и биогенные наночастицы (белки, проникающие в клетки пептиды, ферменты, рибосомы, вирусы);
- ✓ перфторуглеродные наночастицы (наночастицы, состоящие из жидкого перфторуглеродного ядра, покрытого липидным монослоем);
- ✓ углеродные наночастицы (углеродные нанотрубки, фуллерен, графен и наноалмазы);
- ✓ неорганические материалы (золото, серебро, платина, титан, цинк, железо, оксиды металлов и неметаллов);
- ✓ магнитные наночастицы (магнетит (Fe_3O_4), маггемит/гематит (Fe_2O_3), смешанные оксиды железа и других переходных металлов);
- ✓ квантовые точки и полупроводниковые нанокристаллы;
- ✓ циклодекстриновые наночастицы;
- ✓ наноматериалы на основе керамики [наногидроксипатит, нанобиоактивные стекла, наносиликаты и наночастицы кремнезема (SiNP)];
- ✓ наноэмульсии.

Тем не менее существующие DDSs, несмотря на свои несомненные преимущества, не могут полностью реализовать свой терапевтический потенциал [2, 7–9]. В связи с этим в качестве потенциальной стратегии усиления таргетной доставки и воздействия лекарственных средств (облегчение захвата и переноса активных веществ к конкретным органам и тканям), а также уменьшения их побочных эффектов предложена система клеточно-опосредованной доставки лекарств [10], или «биогибридная» внутриклеточная система адресной доставки, включающая, наряду с биосовместимыми искусственными или природными материалами, клетки крови (нейтрофилы, эритроциты, тромбоциты, лимфоциты, естественные клетки-киллеры, моноциты/макрофаги), стволовые и опухолевые клетки. В современной фармацевтической нанотехнологии такие клетки известны также под названием «фармакоциты» [2, 8, 10–15].

Эритроциты

Одной из популярных клеточных культур, используемых в качестве природных систем доставки различных лекарственных препаратов, являются аутологичные эритроциты [11, 16]. По запросу «erythrocyte drug delivery systems» поисковая система Pubmed показала с 1964 года 1812 результатов; максимум ежегодных статей (124) по этой тематике отмечен в 2019 году. Эритроциты и их мембрана полностью биосовместимы и нетоксичны, методологически доступны с помощью малоинвазивной процедуры забора венозной крови, хорошо хранятся в клеточных банках, способны к длительной (до 3 ме-

сяцев) циркуляции в системе кровообращения. При конъюгации с полиэтиленгликолем (ПЭГ) эритроциты способны медленно и с постоянной скоростью высвобождать включенный объект. Препараты, включенные в эритроциты, не оказывают системных побочных эффектов, поскольку они выделяются в основном только при фагоцитировании иммунными клетками. При этом мембраны эритроцитов экспрессируют трансмембранный белок CD47, который связывается с сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α , signal regulatory protein α) и блокирует реорганизацию клеточного цитоскелета, необходимого для фагоцитоза [17–21]. Кроме того, для таргетной доставки лекарственного препарата может быть использована мембрана эритроцитов [22]. Так, наночастицы, покрытые мембранами эритроцитов, оказывают значительный терапевтический эффект при лечении сепсиса, тромбоза, атеросклероза и других сосудистых заболеваний [22–26].

Одним из наиболее перспективных направлений в использовании эритроцитов в качестве систем доставки является терапия рака. В то же время, несмотря на ожидания, клинические приложения DDSs на основе эритроцитов в настоящее время мало распространены [27]. Возможно, это обусловлено недостатками данной клеточной DDSs: необходимостью специальных условий хранения (срок, замораживание, контроль pH среды для уменьшения гемолиза), необходимостью разработки четкой методики, позволяющей уменьшить изменения свойств эритроцитов, связанных с процедурой включения лекарственного препарата [11].

Тромбоциты

По запросу «platelet drug delivery systems» поисковая система Pubmed обнаружила с 1967 года 1833 публикации. Максимум ежегодных статей (114) по направлению пришелся на 2017 год.

Как и эритроциты, безъядерные неактивированные тромбоциты обладают преимуществами перед конвенциональными DDSs с многообещающим потенциалом для лечения опухолевых, сердечно-сосудистых, инфекционных заболеваний и при вялотекущем заживлении ран [28, 29]. При этом предпочтение для доставки DDSs (фактор некроза опухоли на частицах кремния при раке; ванкомицин, дексаметазон или доцетаксел на PLGA-носителе при инфекции или атеросклерозе соответственно) отдается платформам на основе тромбоцитарных мембран [30], поскольку системное применение живых тромбоцитов несет угрозу тромбоза. Например, были созданы тромбоцитоподобные наночастицы (НЧ) для доставки противовоспалительного препарата (такролимус) при коллаген-индуцированном артрите [12, 31].

Существует ряд проблем, которые требуется решить перед клиническим применением тромбоцитов и их мембран: поддержание стабильности живых

тромбоцитов во время хранения и транспортировки; относительно низкая концентрация тромбоцитов в крови, которая требует крупномасштабного производства недорогих биомиметических материалов на основе тромбоцитов; риск активации метастазирования опухолей при контакте с активированными тромбоцитами; отдельные разрешения на клиническое применение материалов мембранных покрытий, вводящих в организм синтетические и биологические компоненты [30, 32, 33].

Нейтрофилы

По запросу «neutrophil drug delivery systems» поисковая система Pubmed обнаружила с 1967 года 712 результатов. Максимум ежегодных статей (72) по направлению отмечен в 2021 году. Использование в качестве таргетных систем доставки активированных нейтрофилов и нановезикул, полученных из мембран нейтрофилов, является многообещающим подходом к лечению рака, инсульта и воспаления [34–36]. Это связано с тем, что нейтрофилы одними из первых реагируют на сигналы цитокинов и провоспалительные факторы и накапливаются в очаге воспаления и злокачественной трансформации. При этом нейтрофилез всегда сопровождается острым воспалительным процессом, а нейтрофилы, являясь идеальными иммунными транспортными клетками, способны значительно повысить эффективность доставки лекарственных средств. Кроме того, нейтрофилы способны привлекать в очаг воспаления дополнительные циркулирующие нейтрофилы посредством факторов хемотаксиса [37–40].

Наночастицы или лекарственные вещества, доставляемые нейтрофилами, могут быть либо предварительно загружены в клетки *in vitro* перед инъекцией, либо интернализированы нейтрофилами непосредственно в кровотоке [34, 41, 42]. Многочисленные исследования показали, что нейтрофилы могут поглощать различные типы НЧ, такие как НЧ альбумина, полилактидгликолида (PLGA), липосомы и НЧ магнитного мезопористого кремнезема [34, 41, 43, 44]. При этом эндоцитоз НЧ зависит от нескольких параметров, включая размер и форму частиц, концентрацию, тип материала (липосомы, золото, альбумин), химический состав поверхности, а также наличие/отсутствие белковой короны сыворотки [7, 41].

Было показано, что нейтрофилы, нагруженные липосомами, содержащими химиотерапевтические препараты, не только нивелируют ограничения, связанные с применением липосом в качестве средств доставки лекарств (прежде всего, риск эмболии микроциркуляторного русла), но также обеспечивают точное нацеливание на опухоль [7].

Например, нейтрофилы, нагруженные катионными липосомами, содержащими паклитаксел (PTX-CL/NE), значительно ингибировали рецидив опухолей глиомы у мышей, у которых опухолевая масса была удалена хирургическим путем, и улучшали выжи-

ваемость мышей почти на 50 % [42, 45]. Внутривенно вводимые PTX-CL/NE реагировали на послеоперационные провоспалительные цитокины (IL-8 и CXCL1/KC) и мигрировали по градиенту хемоаттрактантов, достигая оставшихся клеток глиомы [146]. Использование лейкоцитов для доставки лекарств не ограничивается профилактикой опухолевых рецидивов, но также может использоваться для доставки терапевтических препаратов к метастатическим циркулирующим опухолевым клеткам (ЦОК) [7, 47].

Тем не менее применение нейтрофилов в клинических целях в качестве метода клеточной доставки лекарств сталкивается с рядом проблем: выделение и очистка нейтрофилов из крови пациентов требует дополнительных процедур, активность многих лекарств и терапевтических средств внутри нейтрофилов *in vivo* до сих пор неизвестна [7, 48, 49]. Прямое использование нейтрофилов также ограничивается их коротким периодом жизни (1–5 дней) и сложностью культивирования *in vitro*, поскольку они представляют собой терминально дифференцированные клетки с периодом полураспада всего 7 часов. Нейтрофилы ограниченно рекрутируются в неоперированную опухолевую ткань, возможно, из-за невыраженного воспаления, что ограничивает терапевтическую эффективность данной системы доставки лекарств [7, 48, 50]. Гипотетически острое воспаление в опухолевой ткани, вызванное фотодинамической терапией с использованием фотосенсибилизаторов, позволит решить данную проблему и может стать альтернативой хирургическому вмешательству, позволяющему осуществлять доставку лекарственных средств, опосредованную нейтрофилами [7, 51]. Более того, введение большого количества дополнительных нейтрофилов повышает вероятность возникновения хронического воспаления [7].

Нановезикулы, полученные из мембран нейтрофилов, или биомиметические НЧ, являются новыми платформами для доставки лекарств, позволяющими избежать иммунного надзора и обеспечивающими таргетное воздействие [34, 52, 53]. Применение данных наночастиц специфически усиливает ингибирование ЦОК, предотвращает раннее метастазирование и, возможно, уменьшает развитие уже сформировавшихся метастазов [7, 54]. Нановезикулы, полученные из мембран нейтрофилов, являются лучшим выбором для лечения воспаления и рака, поскольку нейтрофильная инфильтрация может ускорить прогрессирование этих процессов, а мембранные везикулы не обладают большей частью биологических функций нейтрофилов [34]. Так, нановезикулы, полученные из нейтрофилоподобных клеток (клетки HL-60), улучшали доставку противовоспалительного агента пилеатаннола в легкие [40].

Для загрузки лекарственных средств внутрь нановезикул был предложен новый подход с использованием градиента pH [40, 55], а вставка полимерных НЧ в нановезикулы позволила решить проблему низкой загрузки [40, 56].

В нескольких исследованиях данные нановезикулы были модифицированы путем добавления различных лигандов, направленных на активацию рецептор-опосредованного эндоцитоза и улучшение интернализации нановезикул [7, 57, 58]. Биомиметические НЧ на основе лейкоцитов, а также тромбоцитов, нагруженные рапамицином, уже применяются для экспериментального лечения атеросклероза, поскольку способны ингибировать пролиферацию макрофагов [59, 60].

Однако для получения биомиметических НЧ с использованием клеточных мембран требуются высокосинтетические методы и сложные процедуры, которые в процессе синтеза оказывают влияние на физико-химические, биологические свойства наночастиц и их нацеливание [61, 62]. Например, обнаружено, что большинство нановезикул из мембран нейтрофилов после системной инъекции накапливается в печени [40].

Лимфоциты

По запросу «lymphocyte drug delivery systems» поисковая система Pubmed показала с 1976 года 892 результата. Максимум ежегодных статей (71) по направлению отмечен в 2021 году.

В связи с прогрессом в иммунотерапии рака основным направлением использования лимфоцитов, как иммунокомпетентных клеток, является противоопухолевая терапия. При терапии Т-клетками проблемой является параллельное с введением клеток назначение системной адъювантной терапии, поскольку трансплантированные иммунциты быстро теряют свою иммуногенность. В свою очередь, системная фармакотерапия несет выраженные побочные эффекты. Поэтому адекватным решением кажется использование лимфоцитов для доставки наночастиц и липосом, нагруженных требуемыми лекарственными средствами и биомолекулами (нуклеиновые кислоты, цитокины, моноклональные антитела, вакцины и др.) [63, 64]. Адоптивная иммунотерапия с использованием технологии химерного антигенного рецептора (chimeric antigen receptor, CAR) активно продвигается в отношении гематологических новообразований. Вместе с тем CAR-T-лимфоциты имеют ограниченный потенциал при доклинических исследованиях на солидных опухолях вследствие иммуносупрессивного действия их микроокружения [65].

Моноциты/макрофаги

База Pubmed по словосочетанию «macrophage drug delivery systems» продемонстрировала с 1969 года 5296 публикаций. Максимум ежегодных статей (464) по направлению пришелся на 2019 год. Таким образом, моноциты/макрофаги являются самой изучаемой клеточной системой целевой доставки из всех приведенных в обзоре.

Недавние достижения, относящиеся к живым макрофагам [66], их экзосомам [87] и мембранным покрытиям на наночастицах [68], касаются, прежде всего, разработок, направленных на коррекцию опухолевых (глиома, рак, метастазы рака), сердечно-сосудистых (атеросклероз), нейродегенеративных (болезнь Паркинсона) и инфекционных (сепсис, микробная антибиотикорезистентность, внутриклеточные паразиты) заболеваний, а также иммунных расстройств (вирус иммунодефицита человека, ревматоидный артрит). Соответственно, спектр тестируемых лекарственных и биологических молекул (цитостатики (паклитаксел, доксорубин, цисплатин), каталаза, оксид азота, такролимус, atorvastatin, амфотерицин В и др.), их микро- и наноносителей (липосомы, наночастицы различной природы, микрокапсулы), доставляемых макрофагазависимыми платформами, очень широк.

Как все клеточные системы, макрофаги имеют уже отмеченные определенные преимущества перед обычными DDSs. Однако гетерогенность макрофагов (M1- и M2-поляризация), судьба препаратов и DDSs после их фагоцитоза, структурно-функциональная сохранность мембран после их экстракции, длительное хранение клеток остаются до сих пор серьезным препятствием для крупномасштабного производства и клинического применения [66]. Так, приобретение макрофагами провоспалительного M1-фенотипа улучшает результаты противоопухолевой терапии в сравнении с противовоспалительной клеточной M2-поляризацией [69].

Мезенхимные стволовые клетки

В Pubmed выявлено 1393 публикации с 1990 года по словосочетанию «mesenchymal stem cell drug delivery systems». Максимум ежегодных статей (147–148) по направлению пришелся на 2019 и 2021 годы. В то же время выявлено всего 435 статей, имеющих отношение к клиническому использованию данных клеток.

Мезенхимные стволовые клетки человека (МСК) считаются перспективными клеточными системами доставки лекарств и биологических молекул [8, 13, 70–72] благодаря их высокой пролиферативной способности, мультипотентности, способности к расширению *ex vivo*, а также противовоспалительным и иммуномодулирующим свойствам [8, 13, 73, 74]. Наличие таких свойств, как миграция МСК из кровотока к очагам воспаления и опухолевого роста в тканях посредством хемотаксиса и трансэндотелиальной эмиграции [2, 8, 75], активная инвазия во внеклеточный матрикс и устойчивость к гипоксии, характерная для центральной зоны опухолевой ткани [8, 76], отсутствие внутренней иммуногенности (возможность использования аллогенных МСК) [8], а также фагоцитоз значительного числа наночастиц (до 1500 на клетку) [8, 77] и микрокапсул (диаметром ~2–5 микрон) [8, 13] без фатальной потери жизнедея-

тельности в течение некоторого времени, позволяет рассматривать МСК в качестве переносчиков противоопухолевых и противовоспалительных препаратов как в свободной форме, так и инкапсулированными в микро- и наноконтейнеры [8, 13, 75].

Существенным ограничением клинического применения МСК для доставки ЛС может стать их иммуносупрессивная активность и стимуляции метастазирования [2, 8], риск опухолевой трансформации и потенциальная туморогенность СК [8, 78, 79] вследствие их активной пролиферации, а также отсутствие надежной доставки МСК к тканям-мишеням, что приводит к их распространению по организму, несмотря на все существующие манипуляции по адресной доставке [8, 73, 80]. Для устранения негативных характеристик МСК предложены сложные биотехнологические подходы, включающие поверхностную или генетическую модификацию клеток [8, 75, 81] и даже удаление их ядерного материала [8, 82]. Кроме того, МСК чувствительны к интернализации внешних синтетических микрочастиц, например, наблюдается дозозависимая гибель клеток [8, 13, 70]. При этом ряд исследователей указывает на возможность дозозависимого контроля поведения МСК (жизнеспособность, подвижность и пролиферация), что позволит успешно импрегнировать микрокапсулы без нарушения структурной целостности и подвижности клеток [8, 13]. МСК с интернализованными микрокапсулами обладают ограниченным сроком жизнеспособности, достаточным для целевой доставки терапевтического средства в зону интереса и предотвращающим дальнейшую непредсказуемую жизнедеятельность МСК в очаге воспаления или опухолевого роста [123]. Однако интернализованные частицы могут высвобождаться из клеток путем экзоцитоза, поэтому противоопухолевый или проопухолевый эффект выживших МСК непредсказуем [8, 83]. Некоторые группы авторов предлагают иммортализировать МСК, чтобы продлить их ограниченную продолжительность жизни и усилить их полезные свойства (пролиферацию, секреторную активность) для клеточно-опосредованной доставки лекарственных средств [84]. С указанных выше позиций иммортализованные стволовые клетки требуют дополнительных длительных и дорогостоящих испытаний в плане возможной опухолевой трансформации.

В связи с этим в последние годы широкое распространение получили везикулы эндогенного происхождения, характеризующиеся отсутствием иммуногенности. К ним относятся экзосомы, выделяемые в межклеточное пространство нормальными и опухолевыми клетками и представляющие собой фосфолипидные наноразмерные (30–100 нм) пузырьки, содержащие различные белки клеточной протоплазмы (ГТФазы, аннексины, белки теплового шока, тетраспанины и др.), а также РНК (миРНК и мРНК) [11, 85–89]. Экзосомы могут использовать-

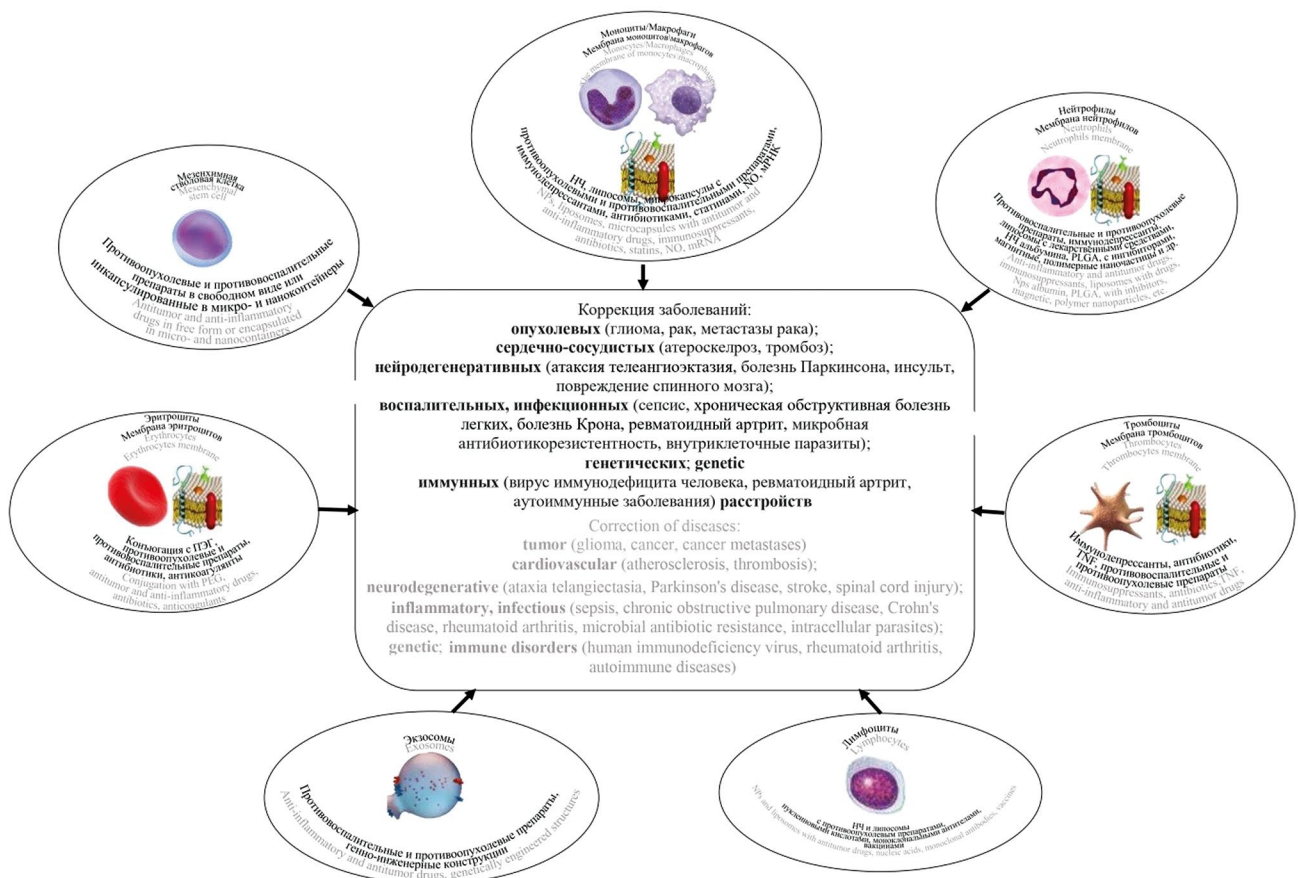
ся в качестве средств доставки через биологические барьеры противовоспалительных и противоопухолевых препаратов, а также генно-инженерных конструкций [11, 88–90]. В то же время вариации их поверхностных белков и неспецифичность, трудоемкий и кропотливый процесс изготовления с невысокой воспроизводимостью затрудняют стабильное использование данных везикул в качестве систем доставки лекарств.

Клинические фармакотерапевтические варианты клеточных систем доставки лекарственных средств и биомолекул, загруженных в составе нано- и микроносителей

Клеточные системы, преимущественно клетки системы крови (включая иммунные клетки) и стволовые клетки, рассматриваются как перспективные платформы для трансляции в клиническую практику в качестве средства доставки различных лекарственных препаратов (антибиотики, цитостатики, моноклональные антитела, ферменты и т. п.), загруженных в нано- и микроразмерные DDSs, и использования при пато-

логических состояниях, трудно поддающихся стандартной фармакологической коррекции, прежде всего при опухолевых, воспалительных и нейродегенеративных заболеваниях (рисунок 1) [91].

В настоящее время большинство известных нано- и микроразмерных DDSs в составе живых клеток тестируется в клинике для адресной доставки противоопухолевых препаратов [92]. Например, в обзоре Choi et al. (2023) только 4 из 20 представленных клинических протоколов применялись для заболеваний, не связанных с опухолевой патологией [хроническая обструктивная болезнь легких; атаксия телеангиоэктазия; болезнь Крона (2 протокола)] [91]. При этом основными носителями являются эритроциты: авторы отметили 7 клинических протоколов для доставки моноклонального антитела (Pembrolizumab) или L-аспарагиназы при фармакотерапии лейкозов и солидных опухолей и 3 – для доставки дексаметазона 21-фосфата в случае хронической обструктивной болезни легких и атаксии телеангиоэктазии. В 5 протоколах использовались препараты MCK как самостоятельные терапевтические средства (PROCHYMAL и Cx601), а также нейрональные стволовые клетки для доставки цитоста-



НЧ – наночастицы; ПЭГ – полиэтиленгликоль; PLGA – полилактидгликолид; TNF – фактор некроза опухоли
 NPs – nanoparticles; PEG – polyethylene glycol; PLGA – polylactide glycolide; TNF – tumor necrosis factor

Рисунок 1. Фармакотерапевтические варианты клеточных систем доставки лекарственных средств и биомолекул
Figure 1. Pharmacotherapeutic options for cellular delivery systems of drugs and biomolecules

тиков (5-фторурацил; SN-38) при лечении болезни Крона и глиобластомы соответственно.

Моноциты и макрофаги клинически апробируются для доставки мРНК в составе цитомегаловирусных векторов и антител к рецептору эпидермального фактора роста 2 типа при глиобластоме и аденокарциноме. В плане перспективы представляет интерес разработка и клинические испытания эффективности клеточных DDSs в отношении патологии неопухолевой природы, включая инфекционные, аутоиммунные и генетические заболевания [91].

В связи с этим интересен обзор Guo et al. (2024), в котором представлен более расширенный список клинических испытаний макрофагов как самостоятельно в плане клеточной терапии, так и для доставки лекарственных и биологических молекул не только при опухолевой патологии (4 протокола при глиобластоме и раке яичника). Подробно рассмотрены 4 протокола при коррекции инсульта, альвеолярного протеиноза (генетически модифицированные лентивирусом клетки в отношении рецептора колониестимулирующего фактора 2 типа), повреждении спинного мозга и постковидном фиброзе легкого [93]. Другие клинические исследования посвящены эффективности DDSs (паклитаксел, метотрексат, преднизолон в липосомах и в составе наночастиц) с использованием макрофагов в отношении атеросклероза [69].

С 2017 FDA разрешены 6 клинических протоколов лечения В-клеточных гемобластозов и множественной миеломы. Аутологичные CAR-T-лимфоциты индуцированы против антигена лимфоцитов CD19 или антигена созревания В-лимфоцитов (при миеломе) с помощью трансфекции ретровирусом или лентивирусом. Все протоколы показали общие побочные эффекты, включая панцитопению [65]. Кроме того, авторы представили информацию о 17 клинических протоколах CAR-T-клеточной и 7 протоколов CAR-NK-клеточной терапии при солидных опухолях.

Проблема клинического приложения Т-лимфоцитов и других клеток для доставки лекарств связана с тем, что многие DDSs, показавшие себя в доклинических исследованиях, еще не разрешены для трансляции в клинику, например мРНК-платформы [63]. В этом плане наночастицы на основе сополимеров молочной и гликолиевой кислот, разрешенные FDA к применению [94], могут быть удачными носителями лекарств и биомолекул для применения в составе клеточных DDSs.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря своим физико-химическим и биологическим свойствам микро- и наноразмерные биоматериалы активно разрабатываются и тестируются для применения в качестве систем доставки лекарственных средств и биомолекул для лечения и диагностики многих заболеваний. Однако, несмотря на мно-

гочисленные исследования в данной области, большинству разработанных DDSs не удается достичь стадии клинического применения, поскольку нежелательные побочные эффекты и определенные проблемы (токсичность, точность дозирования, таргетность, незначительная терапевтическая эффективность, плохая контролируемость распределения в организме и низкая проницаемость тканевых барьеров) остаются нерешенными.

Клеточная и внутриклеточная доставка DDSs является одним из перспективных путей решения проблемы, дошедшим до стадии клинических испытаний. Клеточные системы доставки (cell-based DDSs) можно позиционировать как гибридные носители представителей из всех известных поколений DDSs [95] на основе природных везикул, обладающих уникальной биосовместимостью, низкой иммуногенностью, длительной циркуляцией в организме, способностью к направленной миграции в ткани-мишени и к проникновению через тканевые барьеры [96] для улучшения таргетной доставки и снижения системной токсичности лекарств и биомолекул.

С одной стороны, разнообразие морфофункциональных особенностей клеток, которые могут применяться в качестве носителей микро- и наноразмерных DDSs (см. рисунок 1), в перспективе позволит решить задачи фармакотерапии разнообразных заболеваний. В то же время существующие клинические протоколы ограничены преимущественно противоопухолевой и противовоспалительной терапией. Каждая клеточная DDSs имеет свои особенности, отмеченные выше. Вместе с тем общими недостатками для клеток и их частей как носителей лекарственных средств и биомолекул является высокая стоимость, связанная с трудоемкостью биотехнологических процедур выделения, изготовления, воспроизводимости свойств, хранения, доставки, применения, требующих высокой квалификации и специализированных условий.

В связи с этим, несмотря на очевидные и впечатляющие успехи фундаментальных и прикладных исследований в данной области, впереди непростой путь оптимизации процессов таргетной доставки и управляемого высвобождения лекарственных и биологических молекул с помощью клеточных DDSs.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhao Z., Ukidve A., Kim J., Mitragotri S. Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell*. 2020;181(1):151–167. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.001.
2. Banskota S., Yousefpour P., Chilkoti A. Cell-Based Biohybrid Drug Delivery Systems: The Best of the Synthetic and Natural Worlds. *Macromolecular Bioscience*. 2017;17(1). DOI: 10.1002/mabi.201600361.
3. Lu Q., Liu T., Han Z., Zhao J., Fan X., Wang H., Song J., Ye H., Sun J. Revolutionizing cancer treatment: The power of cell-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2023;361:604–620. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.08.023.

4. Соснов А. В., Иванов Р. В., Балакин К. В., Шоболов Д. Л., Федотов Ю. А., Калмыков Ю. М. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц. *Качественная клиническая практика*. 2008;(2):4–12.
5. Zhao Z., Ukidve A., Krishnan V., Mitragotri S. Effect of physicochemical and surface properties on *in vivo* fate of drug nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:3–21. DOI: 10.1016/j.addr.2019.01.002.
6. Cheng X., Xie Q., Sun Y. Advances in nanomaterial-based targeted drug delivery systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1177151.
7. Hosseinalizadeh H., Mahmoodpour M., Razaghi Bahabadi Z., Hamblin M. R., Mirzaei H. Neutrophil mediated drug delivery for targeted glioblastoma therapy: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;156:113841. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113841 20,94.
8. Khlusov I., Yurova K., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Kudryavtseva V., Khlusova M., Sukhorukov G., Litvinova L. Microcapsule-Based Dose-Dependent Regulation of the Lifespan and Behavior of Adipose-Derived MSCs as a Cell-Mediated Delivery System: In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(1):292. DOI: 10.3390/ijms24010292.
9. Taiarol L., Formicola B., Magro R. D., Sesana S., Re F., An update of nanoparticle-based approaches for glioblastoma multiforme immunotherapy. *Nanomedicine*. 2020;15(19):1861–1871. DOI: 10.2217/nnm-2020-0132.
10. Timin A. S., Litvak M. M., Gorin D. A., Atochina-Vasserman E. N., Atochin D. N., Sukhorukov G. B. Cell-Based Drug Delivery and Use of Nano- and Microcarriers for Cell Functionalization. *Advanced Healthcare Materials*. 2018;7(3):1700818. DOI: 10.1002/adhm.201700818.
11. Попова Е. В., Бельтюков П. П., Радилов А. С. Современные тенденции в разработке и производстве наноразмерных систем для доставки лекарственных соединений. *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. 2020;20(2):206–222. DOI: 10.17586/2226-1494-2020-20-2-206-222.
12. Xiao Q., Li X., Li Y., Wu Z., Xu C., Chen Z., He W. Biological drug and drug delivery-mediated immunotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(4):941–960. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.12.018.
13. Litvinova L. S., Shupletsova V. V., Khaziakhmatova O. G., Daminova A. G., Kudryavtseva V. L., Yurova K. A., Malashchenko V. V., Todosenko N. M., Popova V., Litvinov R. I., Korotkova E. I., Sukhorukov G. B., Gow A. J., Weissman D., Atochina-Vasserman E. N., Khlusov I. A. Human Mesenchymal Stem Cells as a Carrier for a Cell-Mediated Drug Delivery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10. DOI: 10.3389/fbioe.2022.796111.
14. Постнов В. Н., Наумышева Е. Б., Королев Д. В., Галагудза М. М. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов. *Биотехносфера*. 2013;6(30):16–27.
15. Гулий О. И., Староверов С. А., Фомин А. С., Жничкова Е. Г., Козлов С. В., Ловцова Л. Г., Дыкман Л. А. Полимерные мицеллы для адресной доставки лекарств (Обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2022;58(6):578–591.
16. Алексеев К. В., Кедик С. А. Фармацевтическая технология. М.: АОИФТ; 2019. 570 с.
17. Villa C. H., Anselmo A. C., Mitragotri S., Muzykantov V. Red blood cells: supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;106:88–103. DOI: 10.1016/j.addr.2016.02.007.
18. Zhang Y., Gao W., Chen Y., Escajadillo T., Ungerleider J., Fang R. H., Christman K., Nizet V., Zhang L. Self-assembled colloidal gel using cell membrane-coated nanosponges as building blocks. *ACS Nano*. 2017;11(12):11923–11930. DOI: 10.1021/acsnano.7b06968.
19. Тринеева О. В., Халахаун А. Д., Сливкин А. И. Клеточные носители как системы доставки противоопухолевых лекарственных средств (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):43–57. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-43-57.
20. Alapan Y., Yasa O., Schauer O., Giltinan J., Tabak A. F., Sourjik V., Sitti M. Soft erythrocyte-based bacterial microswimmers for cargo delivery. *Science Robotics*. 2018;3(17):aar4423. DOI: 10.1126/scirobotics.aar4423.
21. Wang H., Liu Y., He R., Xu D., Zang J., Weeranoppant N., Dong H., Li Y. Cell membrane biomimetic nanoparticles for inflammation and cancer targeting in drug delivery. *Biomaterials Science*. 2020;8(2):552–568. DOI: 10.1039/c9bm01392j.
22. Xia Q., Zhang Y., Li Z., Hou X., Feng N. Red blood cell membrane-camouflaged nanoparticles: a novel drug delivery system for antitumor application. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2019;9(4):675–689. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.01.011.
23. Wang Y., Zhang K., Qin X., Li T., Qiu J., Yin T., Huang J., McGinty S., Pontrelli G., Ren J., Wang Q., Wu W., Wang G. Biomimetic nanotherapies: Red blood cell based core-shell structured nanocomplexes for atherosclerosis management. *Advanced Science*. 2019;6(12):1900172. DOI: 10.1002/advs.201900172.
24. Ben-Akiva E., Meyer R. A., Yu H., Smith J. T., Pardoll D. M., Green J. J. Biomimetic anisotropic polymeric nanoparticles coated with red blood cell membranes for enhanced circulation and toxin removal. *Science Advances*. 2020;6(16):aay9035. DOI: 10.1126/sciadv.aay9035.
25. Zhao Y., Xie R., Yodsanit N., Ye M., Wang Y., Gong S. Biomimetic fibrin-targeted and H₂O₂-responsive nanocarriers for thrombus therapy. *Nano Today*. 2020;35:100986. DOI: 10.1016/j.nantod.2020.100986.
26. Liang X., Li H., Zhang A., Tian X., Guo H., Zhang H., Yang J., Zeng Y. Red blood cell biomimetic nanoparticle with anti-inflammatory, anti-oxidative and hypolipidemia effect ameliorated atherosclerosis therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2022;41:102519. DOI: 10.1016/j.nano.2022.102519.
27. Jiang Y., Yuan Y., Peng F., Deng Y., Ren C., Liu C., Dong H., Tu T. Erythrocyte-based Drug Delivery: How Far from Clinical Application? *Current Drug Delivery*. 2024;21(1):52–64. DOI: 10.2174/1567201820666230320103529.
28. Zhu Y., Xu L., Kang Y., Cheng Q., He Y., Ji X. Platelet-derived drug delivery systems: Pioneering treatment for cancer, cardiovascular diseases, infectious diseases, and beyond. *Biomaterials*. 2024;306:122478. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122478.

29. Wu M., Shi Y., Zhao J., Kong M. Engineering unactivated platelets for targeted drug delivery. *Biomaterials Science*. 2024;12(9):2244–2258. DOI: 10.1039/d4bm00029c.
30. Li Z., Hu S., Cheng K. Platelets and their biomimetics for regenerative medicine and cancer therapies. *Journal of Materials Chemistry B*. 2018;6(45):7354–7365. DOI: 10.1039/C8TB02301H.
31. He Y., Li R., Liang J., Zhu Y., Zhang S., Zheng Z., Qin J., Pang Z., Wang J. Drug targeting through platelet membrane-coated nanoparticles for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nano Research*. 2018;11:6086–6101. DOI: 10.1007/s12274-018-2126-5.
32. Guo J., Cui B., Zheng J., Yu C., Zheng X., Yi L., Zhang S., Wang K. Platelet-derived microparticles and their cargos: The past, present and future. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2024;19(2):100907. DOI: 10.1016/j.ajps.2024.100907.
33. Li S., Lu Z., Wu S., Chu T., Li B., Qi F., Zhao Y., Nie G. The dynamic role of platelets in cancer progression and their therapeutic implications. *Nature Reviews Cancer*. 2024;24(1):72–87. DOI: 10.1038/s41568-023-00639-6.
34. Chu D., Dong X., Shi X., Zhang C., Wang Z. Neutrophil-Based Drug Delivery Systems. *Advanced Materials*. 2018;30(22):e1706245. DOI: 10.1002/adma.201706245.
35. Pan J., Wang Z., Huang X., Xue J., Zhang S., Guo X., Zhou S. Bacteria-Derived Outer-Membrane Vesicles Hitchhike Neutrophils to Enhance Ischemic Stroke Therapy. *Advanced Materials*. 2023;35(38):e2301779. DOI: 10.1002/adma.202301779.
36. Garanina A. S., Vishnevskiy D. A., Chernysheva A. A., Valikhov M. P., Malinovskaya J. A., Lazareva P. A., Semkina A. S., Abakumov M. A., Naumenko V. A. Neutrophil as a Carrier for Cancer Nanotherapeutics: A Comparative Study of Liposome, PLGA, and Magnetic Nanoparticles Delivery to Tumors. *Pharmaceutics*. 2023;16(11):1564. DOI: 10.3390/ph16111564.
37. Kolaczowska E., Kuberski P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(3):159–175. DOI: 10.1038/nri3399.
38. Chow M. T., Luster A. D. Chemokines in cancer. *Cancer Immunology Research*. 2014;2(12):1125–1131. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0160.
39. Han Y., Zhao R., Xu F. Neutrophil-Based Delivery Systems for Nanotherapeutics. *Small*. 2018;14(42):e1801674. DOI: 10.1002/smll.201801674.
40. Combes F., Meyer E., Sanders N. N. Immune cells as tumor drug delivery vehicles. *Journal of Controlled Release*. 2020;327:70–87. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.043.
41. Chu D., Gao J., Wang Z. Neutrophil-mediated delivery of therapeutic nanoparticles across blood vessel barrier for treatment of inflammation and infection. *ACS Nano*. 2015;9(12):11800–11811. DOI: 10.1021/acsnano.5b05583.
42. Xue J., Zhao Z., Zhang L., Xue L., Shen S., Wen Y., Wei Z., Wang L., Kong L., Sun H., Ping Q., Mo R., Zhang C. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence. *Nature Nanotechnology*. 2017;12(7):692–700. DOI: 10.1038/nnano.2017.54.
43. Wu M., Zhang H., Tie C., Yan C., Deng Z., Wan Q., Liu X., Yan F., Zheng H. MR imaging tracking of inflammation-activatable engineered neutrophils for targeted therapy of surgically treated glioma. *Nature Communications*. 2018;9(1):4777. DOI: 10.1038/s41467-018-07250-6.
44. Lee C., Hwang H. S., Lee S., Kim B., Kim J. O., Oh K. T., Lee E. S., Choi H.-G., Youn Y. S. Rabies virus-inspired silica-coated gold nanorods as a photothermal therapeutic platform for treating brain tumors. *Advanced Materials*. 2017;29(13). DOI: 10.1002/adma.201605563.
45. Iturrioz-Rodríguez N., Bertorelli R., Ciofani G., Lipid-based nanocarriers for the treatment of glioblastoma. *Advanced NanoBiomed Research*. 2021;1(2):2000054. DOI: 10.1002/anbr.202000054.
46. De Filippo K., Dudeck A., Hasenberg M., Nye E., van Rooijen N., Hartmann K., Gunzer M., Roers A., Hogg N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*. 2013;121(24):4930–4937. DOI: 10.1182/blood-2013-02-486217.
47. Mitchell M. J., Wayne E., Rana K., Schaffer C. B., King M. R. TRAIL-coated leukocytes that kill cancer cells in the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(3):930–935. DOI: 10.1073/pnas.1316312111.
48. Schneider J. R., Kwan K., Boockvar J. A. Neutrophil-guided drug delivery for targeting residual glioma cells. *Neurosurgery*. 2018;82(1):N7–N9. DOI: 10.1093/neuros/nyx531.
49. Wu R., Hu X., Wang J. Concise review: optimized strategies for stem cell-based therapy in myocardial repair: clinical translatability and potential limitation. *Stem cells*. 2018;36(4):482–500. DOI: 10.1002/stem.2778.
50. Li M., Li S., Zhou H., Tang X., Wu Y., Jiang W., Tian Z., Zhou X., Yang X., Wang Y. Chemotaxis-driven delivery of nano-pathogenoids for complete eradication of tumors post-phototherapy. *Nature Communications*. 2020;11(1):1126. DOI: 10.1038/s41467-020-14963-0.
51. Chu D., Dong X., Zhao Q., Gu J., Wang Z., Photosensitization priming of tumor microenvironments improves delivery of nanotherapeutics via neutrophil infiltration. *Advanced Materials*. 2017;29(27). DOI: 10.1002/adma.201701021.
52. Jin K., Luo Z., Zhang B., Pang Z. Biomimetic nanoparticles for inflammation targeting. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(1):23–33. DOI: 10.1016/j.apsb.2017.12.002.
53. Tan S., Wu T., Zhang D., Zhang Z. Cell or cell membrane-based drug delivery systems. *Theranostics*. 2015;5(8):863–881. DOI: 10.7150/thno.11852.
54. Hosseinalizadeh H., Mahmoodpour M., Ebrahimi A. The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Annals of Cancer Research and Therapy*. 2021;29(2):169–177.
55. Gao J., Wang S., Wang Z. High yield, scalable and remotely drug-loaded neutrophil-derived extracellular vesicles (EVs) for anti-inflammation therapy. *Biomaterials*. 2017;135:62–73. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.05.003.
56. Hu C.-M. J., Zhang L., Aryal S., Cheung C., Fang R. H., Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(27):10980–10985. DOI: 10.1073/pnas.1106634108.
57. Kim J. S., Shin D. H., Kim J.-S. Dual-targeting immunoliposomes using angiopoietin-2 and CD133 antibody for glioblastoma stem cells. *Journal of Controlled Release*. 2018;269:245–257. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.026.

58. Wang J., Ouyang Y., Chu L., Xu M., Wang K., Tong X. Engineering of Neutrophil Membrane Camouflaging Nanoparticles Realizes Targeted Drug Delivery for Amplified Antitumor Therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2021;16:1175-1187. DOI: 10.2147/IJN.S288636.
59. Song Y., Huang Z., Liu X., Pang Z., Chen J., Yang H., Zhang N., Cao Z., Liu M., Cao J., Li C., Yang X., Gong H., Qian J., Ge J. Platelet membrane-coated nanoparticle-mediated targeting delivery of Rapamycin blocks atherosclerotic plaque development and stabilizes plaque in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019;15(1):13-24. DOI: 10.1016/j.nano.2018.08.002.
60. Boada C., Zinger A., Tsao C., Zhao P., Martinez J. O., Hartman K., Naoi T., Sukhoveshin R., Sushnitha M., Molinaro R., Trachtenberg B., Cokke J. P., Tasciotti E. Rapamycin-loaded biomimetic nanoparticles reverse vascular inflammation. *Circulation Research*. 2020;126(1):25-37. DOI: 10.1161/circresaha.119.315185.
61. Molinaro R., Evangelopoulos M., Hoffman J. R., Corbo C., Taraballi F., Martinez J. O., Hartman K. A., Cosco D., Costa G., Romeo I., Sherman M., Paolino D., Alcaro S., Tasciotti E. Design and development of biomimetic nanovesicles using a microfluidic approach. *Advanced Materials*. 2018;30(15):e1702749. DOI: 10.1002/adma.201702749.
62. Zinger A., Sushnitha M., Naoi T., Baudo G., De Rosa E., Chang J., Tasciotti E., Taraballi F. Enhancing inflammation targeting using tunable leukocyte-based biomimetic nanoparticles. *ACS Nano*. 2021;15(4):6326-6339. DOI: 10.1021/acsnano.0c05792.
63. Riley R. S., June C. H., Langer R., Mitchell M. J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019;18(3):175-196. DOI: 10.1038/s41573-018-0006-z.
64. Han B., Song Y., Park J., Doh J. Nanomaterials to improve cancer immunotherapy based on ex vivo engineered T cells and NK cells. *Journal of Controlled Release*. 2022;343:379-391. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.01.049.
65. Shin M. H., Oh E., Kim Y., Nam D.-H., Jeon S. Y., Yu J. H., Minn D. Recent Advances in CAR-Based Solid Tumor Immunotherapy. *Cells*. 2023;12(12):1606. DOI: 10.3390/cells12121606.
66. Liang T., Zhang R., Liu X., Ding Q., Wu S., Li C., Lin Y., Ye Y., Zhong Z., Zhou M. Recent Advances in Macrophage-Mediated Drug Delivery Systems. *International Journal of Nanomedicine*. 2021;16:2703-2714. DOI: 10.2147/IJN.S298159.
67. Xu W.-J., Cai J. X., Li Y.-J., Wu J.-Y., Xiang D. Recent progress of macrophage vesicle-based drug delivery systems. *Drug Delivery and Translational Research*. 2022;12(10):2287-2302. DOI: 10.1007/s13346-021-01110-5.
68. Wu Y., Wan S., Yang S., Hu H., Zhang C., Lai J., Zhou J., Chen W., Tang X., Luo J., Zhou X., Yu L., Wang L., Wu A., Fan Q., Wu J. Macrophage cell membrane-based nanoparticles: a new promising biomimetic platform for targeted delivery and treatment. *Journal of Nanobiotechnology*. 2022;20(1):542. DOI: 10.1186/s12951-022-01746-6.
69. Liu H., Lv H., Duan X., Du Y., Tang Y., Xu W. Advancements in Macrophage-Targeted Drug Delivery for Effective Disease Management. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:6915-6940. DOI: 10.2147/IJN.S430877.
70. Lepik K. V., Muslimov A. R., Timin A. S., Sergeev V. S., Romanuk D. S., Moiseev I. S., Popova E. V., Radchenko I. L., Vilesov A. D., Galibin O. V., Sukhorukov G. B., Afanasyev B. V. Mesenchymal Stem Cell Magnetization: Magnetic Multi-layer Microcapsule Uptake, Toxicity, Impact on Functional Properties, and Perspectives for Magnetic Delivery. *Advanced Healthcare Materials*. 2016;5(24):3182-3190. DOI: 10.1002/adhm.201600843.
71. Park J. S., Suryaprakash S., Lao Y.-H., Leong K. W. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods*. 2015;84:3-16. DOI: 10.1016/j.jymeth.2015.03.002.
72. Sherman L. S., Shaker M., Mariotti V., Rameshwar P. Mesenchymal stromal/stem cells in drug therapy: New perspective. *Cytotherapy*. 2017;19(1):19-27. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.09.007.
73. Krueger T. E. G., Thorek D. L. J., Denmeade S. R., Isaacs J. T., Brennen W. N. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise. *Stem Cells Translational Medicine*. 2018;7(9):651-663. DOI: 10.1002/sctm.18-0024.
74. Jiang W., Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. 2020;53(1):e12712. DOI: 10.1111/cpr.12712.
75. Cheng S., Nethi S. K., Rathi S., Layek B., Prabha S. Engineered Mesenchymal Stem Cells for Targeting Solid Tumors: Therapeutic Potential beyond Regenerative Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019;370(2):231-241. DOI: 10.1124/jpet.119.259796.
76. Lang T., Yin Q., Li Y. Progress of Cell-Derived Biomimetic Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Advanced Therapeutics*. 2018;1:1800053. DOI: 10.1002/adtp.201800053.
77. Li L., Guan Y., Liu H., Hao N., Liu T., Meng X., Fu C., Li Y., Qu Q., Zhang Y., Ji S., Chen L., Chen D., Tang F. Silica Nanorattle-Doxorubicin-Anchored Mesenchymal Stem Cells for Tumor-Tropic Therapy. *ACS Nano*. 2011;5(9):7462-7470. DOI: 10.1021/nn202399w.
78. Kooreman N. G., Wu J. C. Tumorigenicity of pluripotent stem cells: Biological insights from molecular imaging. *Journal of The Royal Society Interface*. 2010;7:S753-S763. DOI: 10.1098/rsif.2010.0353.focus.
79. Dai L.-J., Moniri M. R., Zeng Z.-R., Zhou J. X., Rayat J., Warnock G. L. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer Letters*. 2011;305(1):8-20. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.02.012.
80. Toma C., Wagner W. R., Bowry S., Schwartz A., Villanueva F. Fate Of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells in The Microvasculature: In vivo observations of cell kinetics. *Circulation Research*. 2009;104(3):398-402. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.187724.
81. Kim H., Shin K., Park O. K., Choi D., Kim H. D., Baik S., Lee S. H., Kwon S.-H., Yarema K. J., Hong J., Hyeon T., Hwang N. S. General and Facile Coating of Single Cells via Mild Reduction. *Journal of the American Chemical Society*. 2018;140(4):1199-1202. DOI: 10.1021/jacs.7b08440.
82. Furman N. E. T., Lupu-Haber Y., Bronshtein T., Kaneti L., Letko N., Weinstein E., Baruch L., Machluf M. Reconstructed Stem Cell Nanoghosts: A Natural Tumor Targeting Platform. *Nano Letters*. 2013;13(7):3248-3255. DOI: 10.1021/nl401376w.

83. Carrillo-Carrion C., Bocanegra A.I., Arnaiz B., Feliu N., Zhu D., Parak W.J. Triple-Labeling of Polymer-Coated Quantum Dots and Adsorbed Proteins for Tracing their Fate in Cell Cultures. *ACS Nano*. 2019;13(4):4631–4639. DOI: 10.1021/acsnano.9b00728.
84. Cocce V., Balducci L., Falchetti M.L., Pascucci L., Ciusani E., Brini A.T., Sisto F., Piovani G., Alessandri G., Parati E., Cabeza L., Pessina A. Fluorescent Immortalized Human Adipose Derived Stromal Cells (hASCs-TS/GFP+) for Studying Cell Drug Delivery Mediated by Microvesicles. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2017;17(11):1578–1585. DOI: 10.2174/1871520617666170327113932.
85. Madni A., Sarfraz M., Rehman M., Ahmad M., Akhtar N., Ahmad S., Tahir N., Ijaz S., Al-Kassas R., Löbenberg R. Liposomal drug delivery: A versatile platform for challenging clinical applications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;17(3):401–426. DOI: 10.18433/J3CP55.
86. Muller L., Hong C.-S., Stolz D.B., Watkins S.C., Whiteside T.L. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *Journal of Immunological Methods*. 2014;411:55–65. DOI: 10.1016/j.jim.2014.06.007.
87. Zeringer E., Barta T., Li M., Vlasov A.V. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015;4:319–323. DOI: 10.1101/pdb.top074476.
88. Yang T., Martin P., Fogarty B., Brown A., Schurman K., Phipps R., Yin V.P., Lockman P., Bai S. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio. *Pharmaceutical Research*. 2015;32(6):2003–2014. DOI: 10.1007/s11095-014-1593-y.
89. Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J., Gupta R.C. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Letters*. 2016;371(1):48–61. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.020.
90. Fatima F., Nawaz M. Stem cell-derived exosomes: roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy. *Chinese Journal of Cancer*. 2015;34(12):46. DOI: 10.1186/s40880-015-0051-5.
91. Choi A., Javius-Jones K., Hong S., Park H. Cell-Based Drug Delivery Systems with Innate Homing Capability as a Novel Nanocarrier Platform. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:509–525. DOI: 10.2147/IJN.S394389.
92. Fan X., Wang K., Lu Q., Lu Y., Sun J. Cell-Based Drug Delivery Systems Participate in the Cancer Immunity Cycle for Improved Cancer Immunotherapy. *Small*. 2023;19(4):e2205166. DOI: 10.1002/smll.202205166.
93. Guo Q., Qian Z.-M. Macrophage based drug delivery: Key challenges and strategies. *Bioactive Materials*. 2024;38:55–72. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2024.04.004.
94. Danhier F., Ansorena E., Silva J.M., Coco R., Le Breton A., Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):505–522. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
95. Тринеева О.В., Халахакун А.Д., Сливкин А.И. Клеточные носители как системы доставки противоопухолевых лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):43–57. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-43-57.
96. Yang L., Yang Y., Chen Y., Xu Y., Peng J. Cell-based drug delivery systems and their in vivo fate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;187:114394. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114394.

REFERENCES

1. Zhao Z., Ukidve A., Kim J., Mitragotri S. Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell*. 2020;181(1):151–167. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.001.
2. Banskota S., Yousefpour P., Chilkoti A. Cell-Based Biohybrid Drug Delivery Systems: The Best of the Synthetic and Natural Worlds. *Macromolecular Bioscience*. 2017;17(1). DOI: 10.1002/mabi.201600361.
3. Lu Q., Liu T., Han Z., Zhao J., Fan X., Wang H., Song J., Ye H., Sun J. Revolutionizing cancer treatment: The power of cell-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2023;361:604–620. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.08.023.
4. Sosnov A.V., Ivanov R.V., Balakin K.V., Shobolov D.L., Fedotov Yu.A., Kalmykov Yu.M. Development of drug delivery systems using micro- and nanoparticles. *Good Clinical Practice*. 2008;(2):4–12. (In Russ.)
5. Zhao Z., Ukidve A., Krishnan V., Mitragotri S. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:3–21. DOI: 10.1016/j.addr.2019.01.002.
6. Cheng X., Xie Q., Sun Y. Advances in nanomaterial-based targeted drug delivery systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1177151.
7. Hosseinalizadeh H., Mahmoodpour M., Razaghi Bahabadi Z., Hamblin M.R., Mirzaei H. Neutrophil mediated drug delivery for targeted glioblastoma therapy: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;156:113841. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113841 20,94.
8. Khlusov I., Yurova K., Shupletsova V., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Kudryavtseva V., Khlusova M., Sukhorukov G., Litvinova L. Microcapsule-Based Dose-Dependent Regulation of the Lifespan and Behavior of Adipose-Derived MSCs as a Cell-Mediated Delivery System: In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(1):292. DOI: 10.3390/ijms24010292.
9. Taiarol L., Formicola B., Magro R.D., Sesana S., Re F., An update of nanoparticle-based approaches for glioblastoma multiforme immunotherapy. *Nanomedicine*. 2020;15(19):1861–1871. DOI: 10.2217/nnm-2020-0132.
10. Timin A.S., Litvak M.M., Gorin D.A., Atochina-Vasserman E.N., Atochin D.N., Sukhorukov G.B. Cell-Based Drug Delivery and Use of Nano- and Microcarriers for Cell Functionalization. *Advanced Healthcare Materials*. 2018;7(3):1700818. DOI: 10.1002/adhm.201700818.
11. Popova E.V., Beltyukov P.P., Radilov A.S. Current trends in the development and production of nanosized drug delivery systems. *Scientific and technical bulletin of information technologies, mechanics and optics*. 2020;20(2):206–222. (In Russ.) DOI: 10.17586/2226-1494-2020-20-2-206-222.
12. Xiao Q., Li X., Li Y., Wu Z., Xu C., Chen Z., He W. Biological drug and drug delivery-mediated immunotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021;11(4):941–960. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.12.018.
13. Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Daminova A.G., Kudryavtseva V.L., Yurova K.A., Malashchenko V.V., Todosenko N.M., Popova V., Litvinov R.I., Korotkova E.I., Sukhorukov G.B., Gow A.J., Weissman D., Atochina-Vasserman E.N., Khlusov I.A. Human Mesen-

- chymal Stem Cells as a Carrier for a Cell-Mediated Drug Delivery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10. DOI: 10.3389/fbioe.2022.796111.
14. Postnov V.N., Naumysheva E.B., Korolev D.V., Galagudza M.M. Nanosized carriers for drug delivery. *Biotehnosfera*. 2013;6(30):16–27. (In Russ.).
15. Guliy O.I., Staroverov S.A., Fomin A.S., Zhnichkova E.G., Kozlov S.V., Lovtsova L.G., Dykman L.A. Polymeric micelles for targeted drug delivery system (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2022;58(6):578–591. (In Russ.).
16. Alekseev K.V., Kedik S.A. Pharmaceutical technology. Moscow: AOIFT; 2019. 570 p. (In Russ.).
17. Villa C.H., Anselmo A.C., Mitragotri S., Muzykantov V. Red blood cells: supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;106:88–103. DOI: 10.1016/j.addr.2016.02.007.
18. Zhang Y., Gao W., Chen Y., Escajadillo T., Ungerleider J., Fang R.H., Christman K., Nizet V., Zhang L. Self-assembled colloidal gel using cell membrane-coated nanosponges as building blocks. *ACS Nano*. 2017;11(12):11923–11930. DOI: 10.1021/acsnano.7b06968.
19. Trineeva O.V., Halahakoon A.J., Slivkin A.I. Cell carriers as systems of delivery of antitumor drugs (review). *Drug development & registration*. 2019;8(1):43–57. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-43-57.
20. Alapan Y., Yasa O., Schauer O., Giltinan J., Tabak A.F., Sourjik V., Sitti M. Soft erythrocyte-based bacterial microswimmers for cargo delivery. *Science Robotics*. 2018;3(17):aar4423. DOI: 10.1126/scirobotics.aar4423.
21. Wang H., Liu Y., He R., Xu D., Zang J., Weeranoppant N., Dong H., Li Y. Cell membrane biomimetic nanoparticles for inflammation and cancer targeting in drug delivery. *Biomaterials Science*. 2020;8(2):552–568. DOI: 10.1039/c9bm01392j.
22. Xia Q., Zhang Y., Li Z., Hou X., Feng N. Red blood cell membrane-camouflaged nanoparticles: a novel drug delivery system for antitumor application. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2019;9(4):675–689. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.01.011.
23. Wang Y., Zhang K., Qin X., Li T., Qiu J., Yin T., Huang J., McGinty S., Pontrelli G., Ren J., Wang Q., Wu W., Wang G. Biomimetic nanotherapies: Red blood cell based core-shell structured nanocomplexes for atherosclerosis management. *Advanced Science*. 2019;6(12):1900172. DOI: 10.1002/advs.201900172.
24. Ben-Akiva E., Meyer R.A., Yu H., Smith J.T., Pardoll D.M., Green J.J. Biomimetic anisotropic polymeric nanoparticles coated with red blood cell membranes for enhanced circulation and toxin removal. *Science Advances*. 2020;6(16):aay9035. DOI: 10.1126/sciadv.aay9035.
25. Zhao Y., Xie R., Yodsanit N., Ye M., Wang Y., Gong S. Biomimetic fibrin-targeted and H₂O₂-responsive nanocarriers for thrombus therapy. *Nano Today*. 2020;35:100986. DOI: 10.1016/j.nantod.2020.100986.
26. Liang X., Li H., Zhang A., Tian X., Guo H., Zhang H., Yang J., Zeng Y. Red blood cell biomimetic nanoparticle with anti-inflammatory, anti-oxidative and hypolipidemia effect ameliorated atherosclerosis therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2022;41:102519. DOI: 10.1016/j.nano.2022.102519.
27. Jiang Y., Yuan Y., Peng F., Deng Y., Ren C., Liu C., Dong H., Tu T. Erythrocyte-based Drug Delivery: How Far from Clinical Application? *Current Drug Delivery*. 2024;21(1):52–64. DOI: 10.2174/1567201820666230320103529.
28. Zhu Y., Xu L., Kang Y., Cheng Q., He Y., Ji X. Platelet-derived drug delivery systems: Pioneering treatment for cancer, cardiovascular diseases, infectious diseases, and beyond. *Biomaterials*. 2024;306:122478. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122478.
29. Wu M., Shi Y., Zhao J., Kong M. Engineering unactivated platelets for targeted drug delivery. *Biomaterials Science*. 2024;12(9):2244–2258. DOI: 10.1039/d4bm00029c.
30. Li Z., Hu S., Cheng K. Platelets and their biomimetics for regenerative medicine and cancer therapies. *Journal of Materials Chemistry B*. 2018;6(45):7354–7365. DOI: 10.1039/C8TB02301H.
31. He Y., Li R., Liang J., Zhu Y., Zhang S., Zheng Z., Qin J., Pang Z., Wang J. Drug targeting through platelet membrane-coated nanoparticles for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nano Research*. 2018;11:6086–6101. DOI: 10.1007/s12274-018-2126-5.
32. Guo J., Cui B., Zheng J., Yu C., Zheng X., Yi L., Zhang S., Wang K. Platelet-derived microparticles and their cargos: The past, present and future. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2024;19(2):100907. DOI: 10.1016/j.ajps.2024.100907.
33. Li S., Lu Z., Wu S., Chu T., Li B., Qi F., Zhao Y., Nie G. The dynamic role of platelets in cancer progression and their therapeutic implications. *Nature Reviews Cancer*. 2024;24(1):72–87. DOI: 10.1038/s41568-023-00639-6.
34. Chu D., Dong X., Shi X., Zhang C., Wang Z. Neutrophil-Based Drug Delivery Systems. *Advanced Materials*. 2018;30(22):e1706245. DOI: 10.1002/adma.201706245.
35. Pan J., Wang Z., Huang X., Xue J., Zhang S., Guo X., Zhou S. Bacteria-Derived Outer-Membrane Vesicles Hitchhike Neutrophils to Enhance Ischemic Stroke Therapy. *Advanced Materials*. 2023;35(38):e2301779. DOI: 10.1002/adma.202301779.
36. Garanina A.S., Vishnevskiy D.A., Chernysheva A.A., Valikhov M.P., Malinovskaya J.A., Lazareva P.A., Semkina A.S., Abakumov M.A., Naumenko V.A. Neutrophil as a Carrier for Cancer Nanotherapeutics: A Comparative Study of Liposome, PLGA, and Magnetic Nanoparticles Delivery to Tumors. *Pharmaceuticals*. 2023;16(11):1564. DOI: 10.3390/ph16111564.
37. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(3):159–175. DOI: 10.1038/nri3399.
38. Chow M.T., Luster A.D. Chemokines in cancer. *Cancer Immunology Research*. 2014;2(12):1125–1131. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0160.
39. Han Y., Zhao R., Xu F. Neutrophil-Based Delivery Systems for Nanotherapeutics. *Small*. 2018;14(42):e1801674. DOI: 10.1002/smll.201801674.
40. Combes F., Meyer E., Sanders N.N. Immune cells as tumor drug delivery vehicles. *Journal of Controlled Release*. 2020;327:70–87. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.043.
41. Chu D., Gao J., Wang Z. Neutrophil-mediated delivery of therapeutic nanoparticles across blood vessel barrier for treatment of inflammation and infection. *ACS Nano*. 2015;9(12):11800–11811. DOI: 10.1021/acsnano.5b05583.

42. Xue J., Zhao Z., Zhang L., Xue L., Shen S., Wen Y., Wei Z., Wang L., Kong L., Sun H., Ping Q., Mo R., Zhang C. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence. *Nature Nanotechnology*. 2017;12(7):692–700. DOI: 10.1038/nnano.2017.54.
43. Wu M., Zhang H., Tie C., Yan C., Deng Z., Wan Q., Liu X., Yan F., Zheng H. MR imaging tracking of inflammation-activatable engineered neutrophils for targeted therapy of surgically treated glioma. *Nature Communications*. 2018;9(1):4777. DOI: 10.1038/s41467-018-07250-6.
44. Lee C., Hwang H. S., Lee S., Kim B., Kim J. O., Oh K. T., Lee E. S., Choi H.-G., Youn Y. S. Rabies virus-inspired silica-coated gold nanorods as a photothermal therapeutic platform for treating brain tumors. *Advanced Materials*. 2017;29(13). DOI: 10.1002/adma.201605563.
45. Iturrioz-Rodríguez N., Bertorelli R., Ciofani G., Lipid-based nanocarriers for the treatment of glioblastoma. *Advanced NanoBiomed Research*. 2021;1(2):2000054. DOI: 10.1002/anbr.202000054.
46. De Filippo K., Dudeck A., Hasenberg M., Nye E., van Rooijen N., Hartmann K., Gunzer M., Roers A., Hogg N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*. 2013;121(24):4930–4937. DOI: 10.1182/blood-2013-02-486217.
47. Mitchell M. J., Wayne E., Rana K., Schaffer C. B., King M. R. TRAIL-coated leukocytes that kill cancer cells in the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(3):930–935. DOI: 10.1073/pnas.1316312111.
48. Schneider J. R., Kwan K., Boockvar J. A. Neutrophil-guided drug delivery for targeting residual glioma cells. *Neurosurgery*. 2018;82(1):N7–N9. DOI: 10.1093/neuros/nyx531.
49. Wu R., Hu X., a Wang J. Concise review: optimized strategies for stem cell-based therapy in myocardial repair: clinical translatability and potential limitation. *Stem cells*. 2018;36(4):482–500. DOI: 10.1002/stem.2778.
50. Li M., Li S., Zhou H., Tang X., Wu Y., Jiang W., Tian Z., Zhou X., Yang X., Wang Y. Chemotaxis-driven delivery of nano-pathogenoids for complete eradication of tumors post-phototherapy. *Nature Communications*. 2020;11(1):1126. DOI: 10.1038/s41467-020-14963-0.
51. Chu D., Dong X., Zhao Q., Gu J., Wang Z., Photosensitization priming of tumor microenvironments improves delivery of nanotherapeutics via neutrophil infiltration. *Advanced Materials*. 2017;29(27). DOI: 10.1002/adma.201701021.
52. Jin K., Luo Z., Zhang B., Pang Z. Biomimetic nanoparticles for inflammation targeting. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(1):23–33. DOI: 10.1016/j.apsb.2017.12.002.
53. Tan S., Wu T., Zhang D., Zhang Z. Cell or cell membrane-based drug delivery systems. *Theranostics*. 2015;5(8):863–881. DOI: 10.7150/thno.11852.
54. Hosseinalizadeh H., Mahmoodpour M., Ebrahimi A. The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Annals of Cancer Research and Therapy*. 2021;29(2):169–177.
55. Gao J., Wang S., Wang Z. High yield, scalable and remotely drug-loaded neutrophil-derived extracellular vesicles (EVs) for anti-inflammation therapy. *Biomaterials*. 2017;135:62–73. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.05.003.
56. Hu C.-M. J., Zhang L., Aryal S., Cheung C., Fang R. H., Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(27): 10980–10985. DOI: 10.1073/pnas.1106634108.
57. Kim J. S., Shin D. H., Kim J.-S. Dual-targeting immunoliposomes using angiopep-2 and CD133 antibody for glioblastoma stem cells. *Journal of Controlled Release*. 2018;269:245–257. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.026.
58. Wang J., Ouyang Y., Chu L., Xu M., Wang K., Tong X. Engineering of Neutrophil Membrane Camouflaging Nanoparticles Realizes Targeted Drug Delivery for Amplified Antitumor Therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2021;16:1175–1187. DOI: 10.2147/IJN.S288636.
59. Song Y., Huang Z., Liu X., Pang Z., Chen J., Yang H., Zhang N., Cao Z., Liu M., Cao J., Li C., Yang X., Gong H., Qian J., Ge J. Platelet membrane-coated nanoparticle-mediated targeting delivery of Rapamycin blocks atherosclerotic plaque development and stabilizes plaque in apolipoprotein E-deficient (ApoE(-/-)) mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019;15(1):13–24. DOI: 10.1016/j.nano.2018.08.002.
60. Boada C., Zinger A., Tsao C., Zhao P., Martinez J. O., Hartman K., Naoi T., Sukhoveshin R., Sushnitha M., Molinaro R., Trachtenberg B., Cokke J. P., Tasciotti E. Rapamycin-loaded biomimetic nanoparticles reverse vascular inflammation. *Circulation Research*. 2020;126(1):25–37. DOI: 10.1161/circresaha.119.315185.
61. Molinaro R., Evangelopoulos M., Hoffman J. R., Corbo C., Taraballi F., Martinez J. O., Hartman K. A., Cosco D., Costa G., Romeo I., Sherman M., Paolino D., Alcaro S., Tasciotti E. Design and development of biomimetic nanovesicles using a microfluidic approach. *Advanced Materials*. 2018;30(15):e1702749. DOI: 10.1002/adma.201702749.
62. Zinger A., Sushnitha M., Naoi T., Baudo G., De Rosa E., Chang J., Tasciotti E., Taraballi F. Enhancing inflammation targeting using tunable leukocyte-based biomimetic nanoparticles. *ACS Nano*. 2021;15(4):6326–6339. DOI: 10.1021/acsnano.0c05792.
63. Riley R. S., June C. H., Langer R., Mitchell M. J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019;18(3):175–196. DOI: 10.1038/s41573-018-0006-z.
64. Han B., Song Y., Park J., Doh J. Nanomaterials to improve cancer immunotherapy based on ex vivo engineered T cells and NK cells. *Journal of Controlled Release*. 2022;343:379–391. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.01.049.
65. Shin M. H., Oh E., Kim Y., Nam D.-H., Jeon S. Y., Yu J. H., Minn D. Recent Advances in CAR-Based Solid Tumor Immunotherapy. *Cells*. 2023;12(12):1606. DOI: 10.3390/cells12121606.
66. Liang T., Zhang R., Liu X., Ding Q., Wu S., Li C., Lin Y., Ye Y., Zhong Z., Zhou M. Recent Advances in Macrophage-Mediated Drug Delivery Systems. *International Journal of Nanomedicine*. 2021;16:2703–2714. DOI: 10.2147/IJN.S298159.
67. Xu W.-J., Cai J. X., Li Y.-J., Wu J.-Y., Xiang D. Recent progress of macrophage vesicle-based drug delivery systems. *Drug Delivery and Translational Research*. 2022;12(10):2287–2302. DOI: 10.1007/s13346-021-01110-5.
68. Wu Y., Wan S., Yang S., Hu H., Zhang C., Lai J., Zhou J., Chen W., Tang X., Luo J., Zhou X., Yu L., Wang L., Wu A., Fan Q., Wu J. Macrophage cell membrane-based nanoparticles: a new promising biomimetic platform for targeted delivery and treatment. *Journal of Nanobiotechnology*. 2022;20(1):542. DOI: 10.1186/s12951-022-01746-6.

69. Liu H., Lv H., Duan X., Du Y., Tang Y., Xu W. Advancements in Macrophage-Targeted Drug Delivery for Effective Disease Management. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:6915–6940. DOI: 10.2147/IJN.S430877.
70. Lepik K. V., Muslimov A. R., Timin A. S., Sergeev V. S., Romanuk D. S., Moiseev I. S., Popova E. V., Radchenko I. L., Vilesov A. D., Galibin O. V., Sukhorukov G. B., Afanasyev B. V. Mesenchymal Stem Cell Magnetization: Magnetic Multi-layer Microcapsule Uptake, Toxicity, Impact on Functional Properties, and Perspectives for Magnetic Delivery. *Advanced Healthcare Materials*. 2016;5(24):3182–3190. DOI: 10.1002/adhm.201600843.
71. Park J. S., Suryaprakash S., Lao Y.-H., Leong K. W. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods*. 2015;84:3–16. DOI: 10.1016/j.jymeth.2015.03.002.
72. Sherman L. S., Shaker M., Mariotti V., Rameshwar P. Mesenchymal stromal/stem cells in drug therapy: New perspective. *Cytotherapy*. 2017;19(1):19–27. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.09.007.
73. Krueger T. E. G., Thorek D. L. J., Denmeade S. R., Isaacs J. T., Brennen W. N. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise. *Stem Cells Translational Medicine*. 2018;7(9):651–663. DOI: 10.1002/sctm.18-0024.
74. Jiang W., Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. 2020;53(1):e12712. DOI: 10.1111/cpr.12712.
75. Cheng S., Nethi S. K., Rath S., Layek B., Prabha S. Engineered Mesenchymal Stem Cells for Targeting Solid Tumors: Therapeutic Potential beyond Regenerative Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019;370(2):231–241. DOI: 10.1124/jpet.119.259796.
76. Lang T., Yin Q., Li Y. Progress of Cell-Derived Biomimetic Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Advanced Therapeutics*. 2018;1:1800053. DOI: 10.1002/adtp.201800053.
77. Li L., Guan Y., Liu H., Hao N., Liu T., Meng X., Fu C., Li Y., Qu Q., Zhang Y., Ji S., Chen L., Chen D., Tang F. Silica Nanorattle-Doxorubicin-Anchored Mesenchymal Stem Cells for Tumor-Tropic Therapy. *ACS Nano*. 2011;5(9):7462–7470. DOI: 10.1021/nn202399w.
78. Kooreman N. G., Wu J. C. Tumorigenicity of pluripotent stem cells: Biological insights from molecular imaging. *Journal of The Royal Society Interface*. 2010;7:S753–S763. DOI: 10.1098/rsif.2010.0353.focus.
79. Dai L.-J., Moniri M. R., Zeng Z.-R., Zhou J. X., Rayat J., Warnock G. L. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer Letters*. 2011;305(1):8–20. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.02.012.
80. Toma C., Wagner W. R., Bowry S., Schwartz A., Villanueva F. Fate Of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells in The Microvasculature: In vivo observations of cell kinetics. *Circulation Research*. 2009;104(3):398–402. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.187724.
81. Kim H., Shin K., Park O. K., Choi D., Kim H. D., Baik S., Lee S. H., Kwon S.-H., Yarema K. J., Hong J., Hyeon T., Hwang N. S. General and Facile Coating of Single Cells via Mild Reduction. *Journal of the American Chemical Society*. 2018;140(4):1199–1202. DOI: 10.1021/jacs.7b08440.
82. Furman N. E. T., Lupu-Haber Y., Bronshtein T., Kaneti L., Letko N., Weinstein E., Baruch L., Machluf M. Reconstructed Stem Cell Nanoghosts: A Natural Tumor Targeting Platform. *Nano Letters*. 2013;13(7):3248–3255. DOI: 10.1021/nl401376w.
83. Carrillo-Carrion C., Bocanegra A. I., Arnaiz B., Feliu N., Zhu D., Parak W. J. Triple-Labeling of Polymer-Coated Quantum Dots and Adsorbed Proteins for Tracing their Fate in Cell Cultures. *ACS Nano*. 2019;13(4):4631–4639. DOI: 10.1021/acsnano.9b00728.
84. Cocce V., Balducci L., Falchetti M. L., Pascucci L., Ciusani E., Brini A. T., Sisto F., Piovani G., Alessandri G., Parati E., Cabeza L., Pessina A. Fluorescent Immortalized Human Adipose Derived Stromal Cells (hASCs-TS/GFP+) for Studying Cell Drug Delivery Mediated by Microvesicles. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2017;17(11):1578–1585. DOI: 10.2174/1871520617666170327113932.
85. Madni A., Sarfraz M., Rehman M., Ahmad M., Akhtar N., Ahmad S., Tahir N., Ijaz S., Al-Kassas R., Löbenberg R. Liposomal drug delivery: A versatile platform for challenging clinical applications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;17(3):401–426. DOI: 10.18433/J3CP55.
86. Muller L., Hong C.-S., Stolz D. B., Watkins S. C., Whiteside T. L. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *Journal of Immunological Methods*. 2014;411:55–65. DOI: 10.1016/j.jim.2014.06.007.
87. Zeringer E., Barta T., Li M., Vlasov A. V. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015;4:319–323. DOI: 10.1101/pdb.top074476.
88. Yang T., Martin P., Fogarty B., Brown A., Schurman K., Phipps R., Yin V. P., Lockman P., Bai S. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio. *Pharmaceutical Research*. 2015;32(6):2003–2014. DOI: 10.1007/s11095-014-1593-y.
89. Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J., Gupta R. C. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Letters*. 2016;371(1):48–61. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.020.
90. Fatima F., Nawaz M. Stem cell-derived exosomes: roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy. *Chinese Journal of Cancer*. 2015;34(12):46. DOI: 10.1186/s40880-015-0051-5.
91. Choi A., Javius-Jones K., Hong S., Park H. Cell-Based Drug Delivery Systems with Innate Homing Capability as a Novel Nanocarrier Platform. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:509–525. DOI: 10.2147/IJN.S394389.
92. Fan X., Wang K., Lu Q., Lu Y., Sun J. Cell-Based Drug Delivery Systems Participate in the Cancer Immunity Cycle for Improved Cancer Immunotherapy. *Small*. 2023;19(4):e2205166. DOI: 10.1002/smll.202205166.
93. Guo Q., Qian Z.-M. Macrophage based drug delivery: Key challenges and strategies. *Bioactive Materials*. 2024;38:55–72. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2024.04.004.
94. Danhier F., Ansorena E., Silva J. M., Coco R., Le Breton A., Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):505–522. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
95. Trineeva O. V., Halahakoon A. J., Slivkin A. I. Cell carriers as systems of delivery of antitumor drugs. *Drug development & registration*. 2019;8(1):43–57. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-43-57.
96. Yang L., Yang Y., Chen Y., Xu Y., Peng J. Cell-based drug delivery systems and their in vivo fate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;187:114394. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114394.



Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: классификация, составные компоненты, способы изготовления и стабилизации. Часть 1 (обзор)

С. С. Осочук¹, Ю. М. Коцур²✉, О. Н. Пожарицкая³, Е. В. Флисюк², И. Е. Смехова²,
С. Д. Малков², К. О. Зарифи², И. А. Титович², Е. К. Красова², А. Н. Шиков²

¹ Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». 210009, Республика Беларусь, г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, литера А

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Российской академии наук (ММБИ РАН). 183038, Россия, г. Мурманск, ул. Владимирская, д. 17

✉ Контактное лицо: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliya.kocur@spcru.ru

ORCID: С. С. Осочук – <https://orcid.org/0000-0003-2074-3832>;
Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;
О. Н. Пожарицкая – <https://orcid.org/0000-0003-1061-0665>;
Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
И. Е. Смехова – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>;
С. Д. Малков – <https://orcid.org/0009-0002-5678-672X>;
К. О. Зарифи – <https://orcid.org/0009-0001-1190-5839>;
И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>;
Е. К. Красова – <https://orcid.org/0000-0001-7785-4256>;
А. Н. Шиков – <https://orcid.org/0000-0003-4351-0695>.

Статья поступила: 08.07.2024

Статья принята в печать: 22.10.2024

Статья опубликована: 25.10.2024

Резюме

Введение. В данном обзоре рассмотрены вопросы современной классификации липосом, методов их изготовления, стабилизации и роли составных компонентов, визуализации, фармакокинетики. В первой части обсуждены первые три вышеупомянутых аспекта.

Текст. Липосомы являются не только перспективными наноконтейнерами для адресной доставки лекарственных средств, но и метаболически активными комплексами с широким спектром активности. Липидные компоненты липосом могут оказать выраженное действие на органы и ткани-мишени. Продукты метаболизма основных компонентов липосом обладают собственной биологической активностью, зависящей от их сочетания и дозировки. Все вышесказанное свидетельствует о перспективности использования липосом не только в качестве носителей ЛС, но и в качестве самостоятельных эффекторов, способных оказать значительное влияние на метаболизм человека при различных заболеваниях. Проведено сравнение преимуществ и ограничений методов получения липосом, рассмотрены особенности изготовления стелс-липосом. Отдельно обсуждены вопросы стабилизации липосом.

Заключение. Обсужденная в обзоре информация может быть полезна при разработке лекарственных средств в форме липосом.

Ключевые слова: липосомы, фосфолипиды, метаболизм, стабилизация липосом

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

Вклад авторов. С. Д. Малков и К. О. Зарифи проводили сбор и систематизацию материала, работали с табличным материалом, участвовали в написании текста. Ю. М. Коцур осуществляла сбор данных из литературных источников, проводила сбор и анализ полученных данных, отвечала за написание. С. С. Осочук, О. Н. Пожарицкая, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова и А. Н. Шиков отвечали за концепцию обзора, редактирование текста статьи, научное консультирование

© Осочук С. С., Коцур Ю. М., Пожарицкая О. Н., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Малков С. Д., Зарифи К. О., Титович И. А., Красова Е. К., Шиков А. Н., 2024
© Osochuk S. S., Kotsur Yu. M., Pozharitskaya O. N., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Malkov S. D., Zarifi K. O., Titovich I. A., Krasova E. K., Shikov A. N., 2024

и утверждение окончательного варианта статьи для публикации. Е. К. Красова и И. А. Титович осуществляли редактирование и оформление текста статьи.

Для цитирования: Осочук С. С., Коцур Ю. М., Пожарицкая О. Н., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Малков С. Д., Зарифи К. О., Титович И. А., Красова Е. К., Шиков А. Н. Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: классификация, составные компоненты, способы изготовления и стабилизации. Часть 1. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):60–77. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1867>

Liposomes – metabolically active drug transport systems: classification, components, preparation methods, and stabilization. Part 1 (review)

Sergey S. Osochuk¹, Yuliya M. Kotsur²✉, Olga N. Pozharitskaya³, Elena V. Flisyuk², Irina E. Smekhova², Sergey D. Malkov², Kseniya O. Zarifi², Irina A. Titovich², Elena K. Krasova², Alexander N. Shikov²

¹ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University. 27, Frunze avenue, Vitebsk, 210009, Republic of Belarus

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

³ Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences (MMBI RAS). 17, Vladimirskaia str., Murmansk, 183038, Russia

✉ **Corresponding author:** Yuliya M. Kotsur. **E-mail:** uliya.kocur@spcpcu.ru

ORCID: Sergey S. Osochuk – <https://orcid.org/0000-0003-2074-3832>;
Yuliya M. Kotsur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;
Olga N. Pozharitskaya – <https://orcid.org/0000-0003-1061-0665>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
Irina E. Smekhova – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>;
Sergey D. Malkov – <https://orcid.org/0009-0002-5678-672X>;
Kseniya O. Zarifi – <https://orcid.org/0009-0001-1190-5839>;
Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>;
Elena K. Krasova – <https://orcid.org/0000-0001-7785-4256>;
Alexander N. Shikov – <https://orcid.org/0000-0003-4351-0695>.

Received: 08.07.2024

Accepted: 22.10.2024

Published: 25.10.2024

Abstract

Introduction. This review article is focused on the modern classification of liposomes, preparation methods, stabilization and the role of structural components, visualization, and pharmacokinetics. Part 1 discusses the first three aspects mentioned above.

Text. Depending on the size and number of bilayers, liposomes are classified into simple, long-circulating, cationic, immuno-liposomes, and sterically stabilized. The lipid components of liposomes can have a pronounced effect on target organs and tissues. Metabolites of the main components of liposomes have their biological activity, depending on their combination and dosage. All of the above indicates the promise of using liposomes not only as carriers of drugs but also as independent effectors that can have a significant impact on human metabolism in various diseases. The advantages and limitations of methods for preparing liposomes, and the features for manufacturing stealth liposomes are discussed. A special section of the article is dedicated to liposome stabilization.

Conclusions. The information discussed in the review article may be useful in the development of pharmaceutical formulations in liposomes. Liposomes are not only promising nanocontainers for targeted drug delivery, but also metabolically active complexes with a wide spectrum of activity.

Keywords: liposomes, phospholipids, metabolism, liposomes stabilization

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

Contribution of the authors. Sergey D. Malkov and Kseniya O. Zarifi collected and systematized the material, worked with tabular material, and participated in writing the text. Yuliya M. Kozur collected data from literary sources, collected and analyzed the data obtained, and was responsible for writing. Sergey S. Osochuk, Olga N. Pozharitskaya, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova and Alexander N. Shikov were responsible for the concept of the review, editing the text of the article, scientific consulting, and approval of the final version of the article for publication. Elena K. Krasova and Irina A. Titovich carried out editing and design of the text of the article.

For citation: Osochuk S. S., Kotsur Yu. M., Pozharitskaya O. N., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Malkov S. D., Zarifi K. O., Titovich I. A., Krasova E. K., Shikov A. N. Liposomes – metabolically active drug transport systems: classification, components, preparation methods, and stabilization. Part 1. *Drug development & registration*. 2024;13(4):60–77. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1867>

ВВЕДЕНИЕ

Создание новых систем и средств доставки активных фармацевтических субстанций (АФС) имеет важное значение, направленное на решение основных проблем клинической практики – повышение терапевтической эффективности, переносимости и безопасности лекарственной терапии. Контролируя процесс доставки лекарственных средств (ЛС), можно управлять фармакологическим действием, избежать передозировки, при этом сократив кратность введения и повысив комплаентность больных к терапии.

Липосомы стали применять в медицине не только как модели мембран, но и в качестве носителей фармацевтических субстанций в 70-е гг. прошлого столетия. Они представляют собой бислойную жидкокристаллическую липидную мембрану, формирующую замкнутую везикулу, во внутренней полости которой и снаружи находится водная фаза.

Популярность липосом основывается, в частности, на сходстве с природными мембранами, которым обладают и многие другие носители ЛС, например эритроциты, нейтрофилы, гепатоциты и т. п., и на уникальном свойстве универсальности. Липосомы можно варьировать по размерам, поверхностным характеристикам, составу и др. Особый интерес к ним обусловлен совокупностью их физико-химических и биологических свойств. Химическая инертность, универсальность, биосовместимость, биodeградируемость, отсутствие токсичных, антигенных и аллергических реакций в ответ на их введение, способность целенаправленно взаимодействовать с определенными клетками макроорганизма, доставляя АФС внутрь клеток и обеспечивая пролонгированное биологическое действие соединений, открывают широкие возможности для получения разнообразных липосомальных препаратов.

Липосомы как системы доставки известны с середины XX века и достаточно хорошо изучены, однако в настоящее время они приобрели новую популярность в связи с развитием генотерапевтических лекарственных средств и зарекомендовали себя в качестве перспективной транспортной системы, позволяющей эффективно удерживать и защищать генетическую информацию, а также быстро ее высвобождать внутри клетки.

Вновь возникающей проблемой на этом фоне является изучение стабильности и методов стабилизации липосом, а также липидных наночастиц, изучение условий и факторов, которые влияют на сохранность липосом как в упаковке, так и в процессе введения в организм.

Целью настоящего обзора является представление современного состояния решения вопросов стабилизации липосом.

Классификация липосом

Липосомы в основном классифицируют по размеру и количеству бислоев (ламеллярности). По признаку ламеллярности выделяют однослойные (unilamellar vesicles, ULV), олиголамеллярные (oligolamellar vesicles, OLV), мультиламеллярные везикулы (multilamellar vesicles, MLV) и мультивезикулярные липосомы (multivesicular liposomes, MVL) (рисунок 1) [1]. OLV и MLV имеют анионоподобную структуру и содержат 2–5 и более 5 концентрических липидных бислоев соответственно. В отличие от MLV, MVL включают сотни неконцентрических водных камер, ограниченных одной двухслойной липидной мембраной, и имеют соттовую структуру [2]. В зависимости от размера частиц ULV делят на малые (small unilamellar vesicles, SUV, 20–100 нм), большие (large unilamellar vesicles, LUV, >100 нм) и гигантские однослойные везикулы (giant unilamellar vesicles, GUV, >1000 нм) (таблица 1).

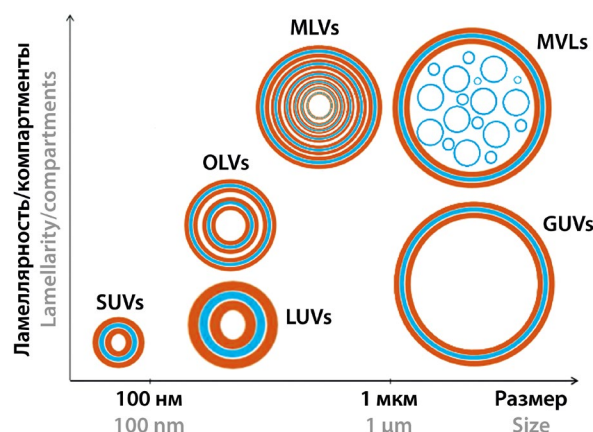


Рисунок 1. Классификация липосомальных везикул в зависимости от их ламеллярности/слоев и размера частиц

Figure 1. Classification of liposomal vesicles depending on their lamellarity/layers and particle size

Поскольку LUVs имеют сравнительно больший захватываемый объем водного раствора, чем SUVs и MLVs, они чаще всего используются для включения гидрофильных молекул. Наоборот, наличие у MLVs нескольких гидрофобных бислоев делает их хорошим выбором для включения гидрофобных молекул. Большинство коммерческих липосомальных препаратов являются SUVs (например, Doxil, AmBisome, Onivyde и др.), их размер частиц и структура приведены в работах [2, 3].

Составные компоненты липосом и их метаболическая активность

Одним из бесспорных преимуществ липосомальных транспортных систем является их превосходная биосовместимость и безопасность. Однако при этом

Таблица 1. Размер и ламеллярность разных типов липосом

Table 1. Size and lamellarity of different types of liposomes

Название Title	Обозначение Designation	Размер Size	Количество бислоев Number of bilayers	Тип липосом Type of liposomes
Малые однослойные везикулы Small single-layer vesicles	МОВ SUV	20–100 нм 20–100 nm	1	Простые Simple
Большие однослойные везикулы Large single-layer vesicles	БОВ LUV	>100 нм >100 nm	1	Длительно циркулирующие Long-term circulating
Гигантские однослойные везикулы Giant single-layered vesicles	ГОВ GUV	>1 мкм >1 μm	1	Катионные Cationic
Мультиламеллярные везикулы Multilamellar vesicles	МЛВ MLV	>0.5 мкм >0.5 μm	>5	Иммунолипосомы Immunoliposomes
Олиголамеллярные везикулы Oligolamellar vesicles	ОЛВ OLV	0.1–1 мкм 0.1–1 μm	2–5	Стерически стабилизированные Sterically stabilized
Мультивезикулярные липосомы Multivesicular liposomes	МВЛ MVL	>1 мкм >1 μm	Сотовая структура Honeycomb structure	

не стоит забывать и об их самостоятельной метаболической активности. Моделируя состав липосом, можно добиться высокой эффективности их применения не только за счет транспортируемого в их составе ЛС, но и за счет компонентов, формирующих саму липосому.

Для выпускаемых и разрабатываемых липосомальных ЛС основными компонентами их производства являются глицерофосфолипиды: сфингомиелин и холестерол [2] (рисунок 2).

Природа остатков жирных кислот в каждой молекуле липида (их длина и количество двойных свя-

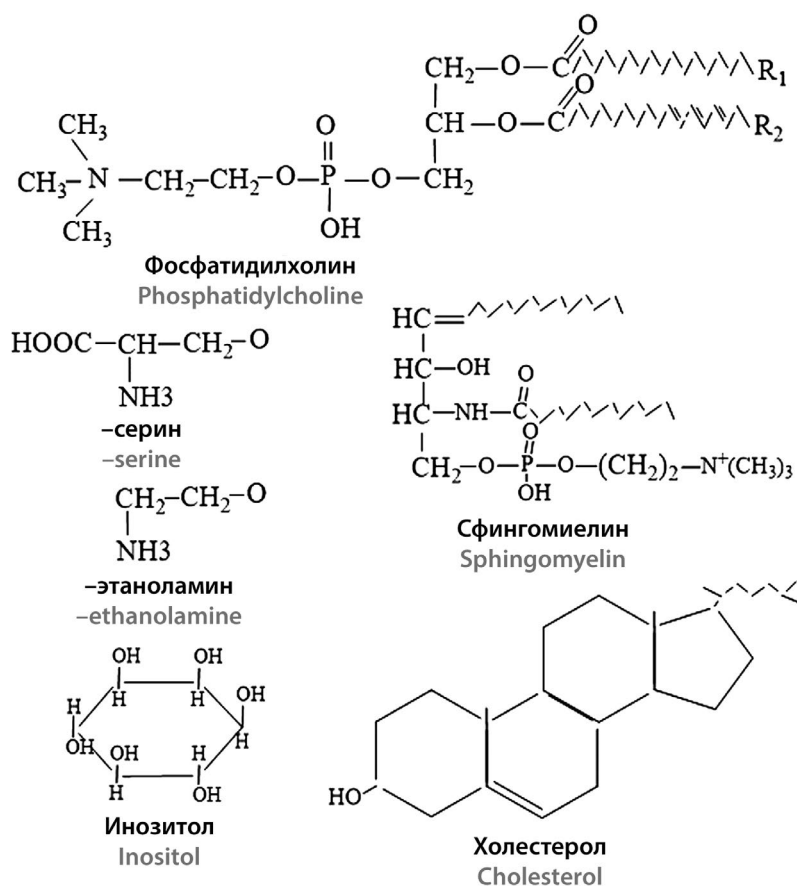


Рисунок 2. Основные компоненты липосом

Figure 2. The main components of liposomes

зей в цепи) отвечает за фундаментальные биофизические свойства билипидного слоя, такие как микровязкость, микротекущность, эластичность [4]. При этом текучесть билипидного слоя липосом оказывает существенное влияние на их проникновение через кожные покровы [5], ряд клеточных функций, включая опосредованный переносчиками трансмембранный перенос веществ, эндоцитоз, свойства мембраносвязанных ферментов и рецепторных комплексов [6].

Основные компоненты липосом в макроорганизме подвергаются ферментативной деградации, а образующиеся при этом продукты способны оказывать значительное влияние на метаболизм в целом и конкретные функции органов и тканей в частности. Так, глицерофосфолипиды гидролизуются в клетках под действием фосфолипаз: A1 (КФ 3.1.1.32), A2 (КФ 3.1.1.4), C (КФ 3.1.4.3) и D (КФ 3.1.4.4) (рисунок 3) – с образованием свободных жирных кислот (насыщенных, моно- и полиненасыщенных), лизофосфатидов, остатков фосфорной кислоты, холина, этаноламина, инозитола [7].

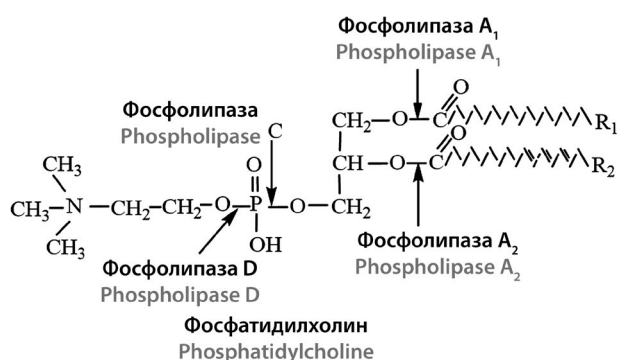


Рисунок 3. Локализация действия ферментов деградации глицерофосфолипидов

Figure 3. Localization of the action of glycerophospholipid degradation enzymes

Субстратами для фосфолипазы A1 являются глицерофосфолипиды и фосфатидная кислота. В результате ее действия образуются sn-2-ацил-лизофосфатиды, а также sn-2-ацил-лизофосфатидная кислота, обладающая рецепторопосредованной митогенной активностью [8]. Sn-2-ацил-лизофосфатидилсерин регулирует созревание Т-клеток, макрофагов дендритных и тучных клеток [9]. Предположительно, фосфолипаза A1 участвует в цикле Ландса, предназначенном для обновления спектра жирных кислот в составе глицерофосфолипидов [10].

Информация о метаболической активности большинства sn-2-ацил-лизофосфатидов в литературе ограничена. По данным авторов [11], активностью фосфолипазы A1 обладает токсин, содержащийся в

яде ос и шершней, а образующиеся под его действием лизофосфатиды обладали высокой гемолитической активностью и летальностью в эксперименте на мышах. Sn-2-ацил-лизофосфатиды являются липидным медиатором Т-клеток, тучных и нервных клеток, участвуют в регуляции опухолевого роста, гемостазе, метаболизме соединительной ткани, при этом их эффекты зависят от жирной кислоты, входящей в их состав [9]. Эффекты sn-2-ацил-лизофосфатидов продолжают изучаться, однако в литературе основное внимание уделяется проявлению свойств фосфолипазы A1 и лишь вторично – самим эффектам sn-2-ацил-лизофосфатидов.

Как и для фосфолипазы A1, субстратами для фосфолипазы A2 являются также глицерофосфолипиды, реже – фосфатидная кислота [12]. Образующиеся в ходе реакции sn-1-ацил-лизофосфатиды обладают широким спектром метаболической активности. Sn-1-ацил-лизофосфатидилхолины участвуют в патогенезе формирования синдрома хронической боли [13], демиелинизации нервных клеток [14], вместе с sn-1-ацил-лизофосфатидилинозитолами – в регуляции опухолевого роста и секреции инсулина [15]. Sn-1-ацил-лизофосфатидилэтанолламины задействованы в регуляции выработки интерлейкина-17 (IL-17) и программы транскрипции, необходимой для дифференцировки клеток TH17 [16]; в регуляции развития стеатоза печени [17] и активности воспалительного процесса [18].

В настоящее время известно 13 представителей группы фосфолипазы C, принимающих активное участие в регуляции клеточных функций через продукты деградации фосфолипидов [19].

Фосфатидилинозитол-специфичная фосфолипаза C, частичное ингибирование которой в клеточных культурах *Tetrahimena* ингибитором U 73122 с низкой плотностью приводит к выживанию клеток и слабой пролиферативной активности, а высокие концентрации – к гибели клеток, предотвращаемой добавлением фосфатидилинозитола. В то же время другие фосфолипиды не оказывают аналогичного действия. Авторы считают, что именно фосфатидилинозитол является триггерным элементом, приводящим к решению о переходе клеток к гибели или к пролиферации [20]. Образующийся под действием фосфолипазы C холин является эндогенным агонистом Sig-1R, связывающим внеклеточные стимулы и синаптическую активность с сигналами Ca⁺⁺ [20].

Фосфолипаза D не только разрушает сложноэфирную связь в фосфатидилхолине с образованием фосфатидной кислоты и холина, но и вступает в реакцию трансфосфатидилирования, перенося фосфатидную кислоту на аминокислоту серин с образованием фосфатидилсерина (ФС) [21]. Интересно отметить, что ФС и в меньшей степени фосфатидилэтанолламин (ФЭА) способны восстанавливать окисленный α-токоферол, потенцируя таким образом его антиоксидантную активность [22]. образу-

яущаяся под влиянием фосфолипазы D фосфатидная кислота является необходимым компонентом для сборки протеинкиназы mTOR, фосфорилирующей белки, ответственные за переключение клетки на путь апоптоза, и, таким образом, предотвращает самоуничтожение клетки [23].

Сфингомиелин разрушается сфингомиелиназой (КФ 3.1.4.-) до фосфохолина и церамида, из которого, в свою очередь, под действием церамидазы (КФ 3.1.5.-) образуются жирная кислота и сфингозин-1-фосфат [24], гидролизуемый сфингозин-1-фосфатлиазой (КФ 4.1.2.27) до палмитальдегида и фосфоэтаноламина [25] (рисунок 4).

Церамиды, являясь вторичными мессенджерами, регулируют клеточный гомеостаз [26]. Значительное их количество образуется в нейронах, где церамиды могут участвовать в регуляции энергетического баланса как в гипоталамических, так и в экстрагипоталамических областях, а также в патогенезе диабета 2 типа, связанного с деятельностью головного мозга [27, 28]. Избыточное накопление церамидов в нервной ткани обусловлено окислительным стрессом и нейродегенерацией [29].

Фосфохолин участвует в регуляции термогенеза в бурой жировой ткани [30], обладает иммуномоделирующей активностью [31], его образование в клетках возбудителей способствует реализации механизмов защиты микроорганизма от организма хозяина [32].

Сфингозин-1-фосфат участвует в регуляции адаптивного транспорта иммунных клеток, развитии сосудов и гомеостазе [33], пролиферации клеток, их дифференцировке, подавлении апоптоза, играет важную роль в метаболизме скелетной мышечной ткани [34].

Исследования последних лет установили связь холестерина (ХС) и активности иммунной системы. Показано, что макрофаги в ответ на активацию Toll-подобных рецепторов синтезируют 25-гидроксихолестерол (25-ГХС), который обеспечивает защиту от микробных патогенов, блокируя слияние мембран

вируса и клетки-хозяина и, таким образом, подавляя рост вируса. Установлено, что 7 α ,25-дигидроксихолестерол (7,25-ДГХС) играет важную роль в координации действий В-, Т- и дендритных клеток во вторичной лимфоидной ткани [35]. Недавние работы показали, что подавление репликации как коронавируса (SARS-CoV), так и SARS-CoV-2 (COVID-19) при их проникновении в клетку обусловлено 25-ГХС [36]. Появляется все больше доказательств того, что многие изомеры этих оксистеролов необходимы для правильного функционирования иммунной системы [37].

Таким образом, активность иммунной системы в значительной степени зависит от количества ХС и его метаболических преобразований. Холестерол не подвергается полной деградации, однако происходит его окисление 7 α -гидроксилазой (СYP4507A1 КФ 1.14-) до 7 α -гидроксихолестерола (классический путь синтеза желчных кислот, в котором фермент является ключевым) [38]. Кроме этого, происходит окисление и под действием СYP3A4 (25-гидроксилаза) с образованием 25-гидроксихолестерола, являющегося нейрозащитным агентом в небольших количествах и нейротоксическим соединением при высоких концентрациях [38], а также регулятором продукции интерферона и активности воспалительного процесса [39]. Гидроксилирование холестерина СYP27A1 катализирует образование 25(R)-26-гидроксихолестерола, обладающего достаточно выраженной гепатотоксичностью [40]. СYP46A1 (24-гидроксилаза) приводит к образованию 24-гидроксихолестерола [41], играющего важную физиологическую роль в поддержании гомеостаза холестерина в мозге [42].

Помимо этого, холестерол может быть источником биосинтеза витамина D в кожных покровах [43].

Холестерол является переносчиком эссенциальных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в ткани от фосфатидилхолинов липопroteинов высокой плотности (ЛПВП) через лецитинхолестеролацилтрансферазы (ЛХАТ КФ 2.3.1.43), белка, переносящего эфиры холестерина и апо-B100/E-рецептора клеток.

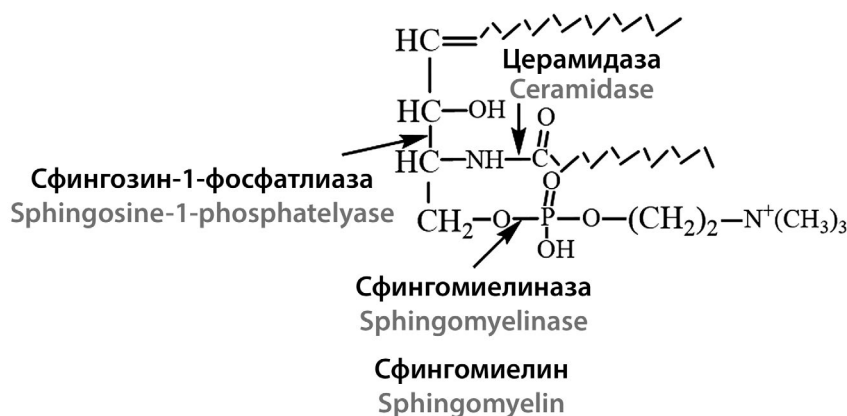


Рисунок 4. Локализация действия ферментов деградации сфинголипидов

Figure 4. Localization of the action of sphingolipid degradation enzymes

Нарушение этого взаимодействия способно привести к проатерогенному росту содержания холестерина при дефиците эссенциальных ПНЖК и лежит в основе антиатерогенного действия ω -3-ПНЖК [44].

Спектр жирных кислот, образующихся под действием фосфолипазы A1, A2 и церамидазы, достаточно широк. Наиболее изученными являются линолевая (C18:2n6), γ -линоленовая (C18:3n6), арахидоновая (C20:4n6), α -линоленовая (C18:3n3), эйкозапентаеновая (C20:5n3), докозагексаеновая (C22:6n3) и ряд других полиненасыщенных жирных кислот. Хорошо исследованными продуктами арахидоновой кислоты являются простагландины, лейкотриены, липоксины [45], а также энандамиды и каннабиноиды [46], резольвины, протектины и марезины [47]. Короткоцепочечные жирные кислоты, особенно ацетат, пропионат и бутират, активно участвуют в регуляции энергетического обмена, деятельности кишечника, продукции и регуляции активности инсулина [48]. Жирные кислоты могут служить и источником энергии, окисляясь в митохондриях до углекислого газа и воды [49].

В настоящее время изучение биологической активности церамидов, метаболической активности фосфохолина, спектр эффектов sn-1-ацил-лизифосфатидов и других компонентов липосом продолжается.

Таким образом, продукты деградации основных компонентов липосом обладают чрезвычайно широким спектром действия, во многом зависящим от их сочетания и дозировки. Все вышесказанное свидетельствует о высокой перспективности использования липосом не только в качестве носителей ЛС, но и в качестве самостоятельных эффекторов, способных оказать значительное влияние на метаболизм человека при различных заболеваниях.

Способы получения липосом

В литературе описаны как традиционные, так и относительно новые методы получения липосом. К традиционным относятся методы Бангхэма [50], удаления детергента [51], инъекции растворителя (спирта или эфира) [52], обратноточного испарения [53], а также методы образования двойных [54] и множественных [55] эмульсий. Более современными считаются сублимационная сушка, технологии с применением сверхкритических жидкостей, а также микрофлюидные методы. В таблице представлены некоторые из них (таблица 2) [60–62].

Стабильность липосом после регидратации

Одной из проблем, ограничивающих широкое применение липосом как систем доставки ЛС, является вопрос их стабильности. Одним из перспективных методов повышения стабильности липосом при хранении и транспортировке является лиофилизация. Лиофилизация нашла широкое применение в качестве метода «консервации» фармацевтических препаратов, которые не способны к продолжительному хра-

нению в нативном виде и теряют свои физико-химические и фармакологические свойства при воздействии факторов окружающей среды.

При разработке технологии лиофилизации липосомальные препараты являются одним из объектов научных и практических исследований [67, 68]. Однако замораживание может вызывать изменения фазового перехода, осмотический стресс и расширение бислоев из-за образования льда [69], что, в свою очередь, может привести к разрушению бислоя, слиянию и агрегации везикул, к потере захваченного материала и изменению распределения липосом по размерам. Такие эффекты можно свести к минимуму путем включения в состав липосом криопротекторов, например дисахаридных сахаров [70]. Поэтому важнейшими технологическими критериями лиофилизации являются тип криопротектора, температура вторичной сушки и продолжительность всего процесса [71]. Авторами [72] показано, что оптимальным является содержание трегалозы дигидрата 8 % (мас.), при этом снижение инкапсуляции при лиофилизации составляло 13 %, а при исследовании режимов лиофилизации сиринотеканом установлена оптимальная температура досушивания 15 °С.

После лиофилизации и хранения может нарушаться и ресуспендируемость липосомальных дисперсий. Способность лиофилизированных липосом восстанавливаться при добавлении соответствующей среды зависит от нескольких факторов. Нежелательные поверхностные свойства лиофилизированного порошка (например, степень разрушения или обратного расплавления, площадь поверхности и неоднородность высушенной матрицы и т. д.) могут привести к плохому смачиванию, дисперсии и капиллярности, агрегации, образованию нежелательных частиц во время восстановления или к продолжительному времени восстановления. Кроме того, способы восстановления важны и для получения желаемого распределения частиц липосом по размеру без образования агрегатов [73]. В настоящее время в литературе не описаны процедуры для мониторинга восстановления лиофилизированных фармацевтических составов.

Дестабилизацию восстановленной коллоидной суспензии липосом можно оценить с помощью динамического рассеяния света (ДРС), которое является наиболее удобным методом и дает относительно точные и последовательные результаты за короткий период времени. Показателями слияния и/или агрегации частиц являются различия в их распределении по размерам, индекс полидисперсности, близкий к 1, и высокие коэффициенты вариации. В то же время отмечается, что ДРС имеет ряд недостатков. Размер частиц определяется по флуктуациям интенсивности рассеянного света из-за броуновского движения частиц, а поскольку учитывается интенсивность света, рассеянного сферическими частицами, метод не чувствителен для высокополидисперсных и несферических коллоидных систем [74].

Таблица 2. Отдельные методы получения липосом
Table 2. Some methods of liposome production

Метод Method	Описание Description	Преимущества Advantages	Недостатки Disadvantages
Конвекционный метод (метод гидратации тонкой пленки, метод Бенгхэма) Convection method (thin film hydration method, Bingham method)	Суть метода заключается в получении тонкой липидной пленки посредством растворения липидной композиции в подходящем растворителе или их комбинации с последующим удалением последних под глубоким вакуумом в роторно-пленочном испарителе или другом подходящем для этих целей оборудовании. Полученную липидную пленку гидратируют раствором субстанции или другого включаемого внутрь липосом вещества и тщательно перемешивают. Для повышения стабильности липосомальных комплексов метод осуществляют в токе азота или аргона [56, 58, 63, 64] The essence of the method consists in obtaining a thin lipid film by dissolving the lipid composition in a suitable solvent or a combination thereof, followed by removal of the latter under deep vacuum in a rotary film evaporator or other suitable equipment. The resulting lipid film is hydrated with a solution of the substance or other substance to be incorporated inside the liposomes and thoroughly mixed. To increase the stability of the liposomal complexes, the method is carried out in a nitrogen or argon current [56, 58, 63, 64]	Простой метод, не требующий сложного аппаратного оформления A simple method that does not require complex instrumentation	Непригоден для масштабирования. Относительно крупный размер липосом. Низкий процент включения вещества. Образование гетерогенных липосом Unsuitable for scale-up. Relatively large size of liposomes. Low percentage of substance incorporation; Formation of heterogeneous liposomes
Метод испарения с обращением фаз Phase reversal evaporation method	По данной методике водный раствор лекарственного вещества быстро вводится в органический раствор липидов. Одновременно смесь подвергают звуковой обработке, что приводит к образованию эмульсии – капель воды в органическом растворителе. Далее полученную эмульсию высушивают до полутвёрдого геля с использованием роторного испарителя. После геля подвергается сильному механическому воздействию до получения фазового изменения из дисперсии «вода в масле» в «масло в воде» (т.е. водную суспензию везикул). В ходе механического воздействия некоторые капли воды образуют внешнюю фазу, в то время как другие – замкнутый внутри везикул водный объем. При использовании этого метода становится возможным получение однослойных везикул диаметром от 0,1 до 1 мкм [57, 60] In this technique, an aqueous solution of a drug is quickly introduced into an organic lipid solution. At the same time, the mixture is subjected to sonic treatment, which leads to the formation of an emulsion - drops of water in an organic solvent. The resulting emulsion is then dried to a semi-solid gel using a rotary evaporator. The gel is then subjected to strong mechanical stress until a phase change is obtained from a water-in-oil dispersion to an oil-in-water dispersion (i.e., an aqueous suspension of vesicles). During mechanical action, some water droplets form an external phase, while others form an aqueous volume closed inside the vesicles. Using this method, it becomes possible to obtain single-layer vesicles with a diameter of 0.1 to 1 µm [57, 60]		Долгая выдержка материала, подлежащего инкапсуляции, в органических растворителях не всегда возможна. Механическая обработка может привести к денатурации некоторых белков или разрыву цепей ДНК Long exposure of the material to be encapsulated in organic solvents is not always possible. Mechanical treatment may result in denaturation of some proteins or DNA strand breaks

Продолжение таблицы 2

Метод Method	Описание Description	Преимущества Advantages	Недостатки Disadvantages
Метод растворения и удаления детергента. Dissolution and detergent re- moval method.	В данном методе липиды растворяют в растворе детергента, при этом детергент связывается с фосфолипидами, экранируя гидрофобные головки от прямого взаимодействия с водной фазой, и при этом образуются смешанные (детергент/липид) мицеллы. При удалении детергента смешанные мицеллы обогащаются липидами, что приводит к образованию однослойных везикул. Детергент удаляют разбавлением буфером или диализом [63, 64] In this method, lipids are dissolved in a detergent solution where the detergent binds to the phospholipids, shielding the hydrophobic heads from direct interaction with the aqueous phase, and mixed (detergent/lipid) micelles are formed. When the detergent is removed, the mixed micelles are enriched with lipids, resulting in the formation of single-layer vesicles. The detergent is removed by dilution with buffer or dialysis [63, 64]	Контролируемость размера частиц и однородности продукта, которые в значительной мере зависят от скорости удаления детергента и исходного соотношения детергент/фосфолипид Controllable particle size and product uniformity, which are highly dependent on the rate of detergent removal and the initial detergent/phospholipid ratio	Медленное уравнивание промежуточных мицеллярных структур, наличие остатков детергента и сложность удаления органического растворителя. Возможно получение дисперсии с низкой концентрацией липосом и низкой эффективностью включения гидрофобных соединений Slow equilibration of intermediate micellar structures, presence of detergent residues and difficulty in removing organic solvent Dispersion with low liposome concentration and low efficiency of hydrophobic compounds incorporation is possible
Метод впрыска (инъекции) растворителя Solvent Injection (Injection) method	Органическую фазу быстро вводят в большой объем хорошо перемешанной, предварительно нагретой водной фазы, что приводит к самонагреванию липидов и спонтанному образованию МЛВ. На свойства везикул влияют такие параметры, как скорость впрыска, температура органической и водной фазы, концентрация липидов и другие [65] The organic phase is rapidly injected into a large volume of well-mixed, preheated aqueous phase, resulting in lipid self-aggregation and spontaneous formation of MLVs. The properties of vesicles are influenced by parameters such as injection rate, temperature of the organic and aqueous phase, lipid concentration and others [65]	Простота и быстрота выполнения, высокий уровень воспроизводимости, а также возможность масштабирования продукта с высокой эффективностью включения активного вещества Easy and fast execution, high level of reproducibility, and scalability product with high active ingredient incorporation efficiency	Сложность удаления растворителей, в том числе этанола, за счет образования азеотропной смеси с водой. Формирование гетерогенной (от 30 до 110 нм) популяции липосом. Риск инактивации биологически активных макромолекул в присутствии даже небольших количеств этанола Difficulty in removing solvents, including ethanol, due to the formation of azeotropic mixture with water. Formation of heterogeneous (from 30 to 110 nm) population of liposomes. Risk of inactivation of biologically active macromolecules in the presence of even small amounts of ethanol

Окончание таблицы 2

Метод Method	Описание Description	Преимущества Advantages	Недостатки Disadvantages
Микрофлюидные технологии Microfluidic technologies	Микрофлюидный метод получения липосом предполагает пропускание раствора фосфолипидов в органическом растворителе через микрофлюидные каналы, которые представляют собой стеклянные капилляры с диаметром отверстий от 5 до 500 мкм, в водную среду под высоким давлением. Липосомы образуются в результате локальной диффузии фосфолипидов в воду [59, 61, 64, 66] The microfluidic method of liposome production involves passing a solution of phospholipids in an organic solvent through microfluidic channels, which are glass capillaries with aperture diameters ranging from 5 to 500 µm, into an aqueous medium under high pressure. Liposomes are formed as a result of local diffusion of phospholipids into water [59, 61, 64, 66]	Возможность получения монодисперсных везикул. Высокая воспроизводимость и пригодность для масштабирования. Размер частиц от 50 нм. Возможность регулирования размера. Сферическая форма липосом. Широкий диапазон загрузки веществ The possibility of obtaining monodisperse vesicles. High reproducibility and suitability for scaling. Particle size from 50 nm. Possibility to adjust the size. Spherical shape of liposomes. Wide range of loading of substances	Дорогостоящее оборудование. Длительный подбор условий для каждого отдельного состава Expensive equipment. Long selection of conditions for each individual formulation.

В рекомендациях FDA указано, что для оценки распределения липосомальной суспензии по размерам как во время исследований, так и при обычном контроле качества можно использовать анализ отслеживания наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA). Учитывая, что NTA предоставляет и количественную информацию [75], метод можно использовать для оценки концентрации липосом в известном объеме среды для восстановления.

Наряду с размером частиц для систем доставки ЛС важно гарантировать, что морфология и/или структура липосом не изменяются после восстановления. Ламеллярность липосом влияет на кинетику высвобождения ЛС, а также на стабильность липосом по отношению к белку после инъекции и в более общем плане – на их характеристики *in vivo*. Структуру липосомы после восстановления можно исследовать с помощью визуализационного анализа, обычно с использованием трансмиссионной электронной или криоэлектронной микроскопии, а для более глубокого понимания тонкой структуры бислоя использовать метод малоуглового рассеяния нейтронов [76].

Для гарантии загрузки терапевтической дозы ЛС в липосому после сушки вымораживанием необходимо провести анализ инкапсулированного в везикулах ЛС. Для этого липосомальный садок промывают, а незахваченное ЛС удаляют из восстановленной дисперсии с помощью соответствующего метода очистки (например, разделения колонки) [73].

Важнейшими показателями качества липосомальных дисперсий являются химическая стабильность инкапсулированного вещества и термодинамическая стабильность коллоидной системы. Термодинамическая стабильность системы после регидратации влияет на сохранность инкапсуляции и размер липосом [74].

Везикулы стабилизируются за счет образования различных сил: Ван-дер-Ваальса между фосфолипидами, отталкивания между заряженными группами молекул фосфолипидов, отталкивания головных групп фосфолипидов, а также сил отталкивания короткого действия. При добавлении заряженных ингредиентов в двойной слой между везикулами образуются электростатические силы отталкивания, повышающие стабильность системы [60].

Сохранность коллоидного состояния без признаков коагуляции является одним из показателей качества ЛС. Одной из характеристик устойчивости липосомальной дисперсии является дзета-потенциал (ζ -потенциал), характеризующий заряд на границе раздела диэлектрического слоя. Потенциал возникает на границе раздела ионных оболочек наночастицы и имеет электростатическую природу [78].

Взаимодействие электрически заряженных частиц может сильно влиять на физическую стабильность, реологическое поведение, седиментацию, редисперсию и фильтрацию липосомальной дисперсии. Из-

менение значения ζ -потенциала в восстановленной дисперсии можно объяснить агрегацией частиц, наличием абсорбированного слоя на границе раздела, а также потерей ЛС, что является наиболее известным недостатком процесса сублимационной сушки липосом. Потеря ЛС в основном связана со слиянием везикул и/или фазовым переходом геля в жидкокристаллические липиды мембран во время высыхания липосом с последующей потерей инкапсулированного материала.

В настоящее время признано, что ζ -потенциал ниже 30 мВ , оптимум $>60\text{ мВ}$, необходим для полной электростатической стабилизации; потенциалы между 5 мВ и 15 мВ находятся в области ограниченной флокуляции, а между 5 мВ и 3 мВ – максимальной флокуляции [79]. Таким образом, агрегация частиц менее вероятна для заряженных частиц (высокий ζ -потенциал) из-за электрического отталкивания. Однако это правило не применимо к системам, содержащим стерические стабилизаторы, поскольку адсорбция последних приведет к уменьшению ζ -потенциала из-за смещения плоскости сдвига частицы. Кроме того, следует учитывать и сильную зависимость ζ -потенциала от ионов, находящихся в среде. Варьируя молекулярный состав диэлектрического слоя, можно влиять на ζ -потенциал как в сторону его уменьшения и стремления к 0, что ведет к снижению устойчивости системы, так и увеличения (без учета заряда), что повышает термодинамическую стабильность липосомальных препаратов.

А. В. Стадниченко с соавт. (2017 г.), изучая стабильность липосом с цитостатиками и уменьшение степени инкапсуляции после цикла лиофилизации – регидратации, показали, что при увеличении содержания холестерина в липидной мембране с 15 до 30 % происходило замедление снижения степени инкапсуляции липосом с 18 до 10 %, что свидетельствовало о повышении жесткости липидной мембраны. Сравнительное изучение модификации двойного электрического слоя L-аминокислотами, включая L-глицин, L-лизин и L-аргинин, показало, что эффективным является содержание 0,012 % L-лизина [80], повышающего ζ -потенциал до $-5,1\text{ мВ}$, достаточных для стабилизации липосомальной системы в течение не менее 5 ч, т. е. времени, достаточного для проведения инфузии препарата. На примере липосом с оксалиплатином было показано, что заряженные липиды дипальмитоилфосфатидилглицерола придавали необходимую седиментационную устойчивость липосомальной системе при использовании воды в качестве среды ресуспендирования и обеспечивали ζ -потенциал $-62,4\text{ мВ}$, достаточный для стабильности липосом после регидратации в течение 5 ч [81].

На стабильность липосом после регидратации оказывает влияние и растворитель. В работе [82] было показано, что использование в качестве растворителя свежеприготовленного изотонического раствора натрия хлорида сохраняло исходную концентра-

цию производного индокарбазола в течение 3 ч. Авторы [83] изучали влияние добавления конъюгированной линолевой кислоты и регидратационной среды (пищевая модельная система и раствор этанол:вода 1:9) на стабильность липосом после лиофилизации и регидратации в процессе получения и хранения в течение 30 дней при 4 °С. Было установлено, что размер везикул лиофилизированных образцов зависел от состава бислой, в отличие от среды для регидратации, что объяснялось структурными различиями в бислое, содержащем конъюгированную линолевую кислоту, способствующую лучшей регидратации липидных полярных головок.

Стабильность суспензий липосом требует отталкивающего взаимодействия, сравнимого с диапазоном и величиной силы Ван-дер-Ваальса. Увеличение поверхностного заряда за счет добавления заряженных молекул в бислой (т.е. индуктора положительно заряда, такого как дидецилдиметиламмония бромид, ДДАБ) приводит к электростатическому отталкиванию. Другой метод – стерическая стабилизация, достигаемая путем покрытия поверхности адсорбированным слоем длинных объемных молекул для предотвращения сближения липосом (т.е. лигандов, таких как ПЭГ). Сочетание обоих методов, называемое электростерической стабилизацией, и приводит к получению стабильных дисперсий [84]. ПЭГ, наиболее широко используемый стабилизатор в фармацевтической технологии, не поддается биологическому разложению, хорошо растворим в водных растворах, связывается с большим количеством молекул воды, обладает высокой гибкостью полимерной цепи и ограниченным накоплением в клетках ретикулярной эндотелиальной системы (RES) [85].

Таким образом, стабилизация липосомальных носителей через лиофилизацию является актуальным и современным методом, который позволит решить многие вопросы, связанные с транспортировкой и хранением. Существенные ограничения распространения данного метода обусловлены необходимостью замораживания продукта, что в случае липосом является критическим фактором, влияющим на сохранение структуры. Различные исследования свидетельствуют о том, что добавление криопротекторов не всегда позволяет решать данную проблему, и требуется поиск новых подходов к реализации такого метода, а также определение вспомогательных веществ, которые способствовали бы эффективной регидратации, повышали бы стабильность после нее, а также не оказывали бы негативного воздействия на включение и высвобождение активных ингредиентов из липосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липосомы являются не только перспективными наноконтейнерами для адресной доставки лекарственных средств, но и метаболически активными комплексами с широким спектром активности, подбор со-

става которых может оказать выраженное действие на органы и ткани-мишени.

В связи с развитием фармацевтической промышленности и генной терапии липосомы как носитель приобрели новую популярность. В связи с этим вопрос стабилизации липосом стал как никогда актуальным. Перспективным методом, требующим дополнительного изучения, является лиофилизация готовых липосом. Ограничения метода связаны с замораживанием продукта, которое непосредственно влияет на сохранность структуры. Для решения данной проблемы требуется поиск новых эффективных подходов к лиофилизации, а также поиск вспомогательных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pattni B.S., Chupin V.V., Torchilin V.P. New developments in liposomal drug delivery. *Chemical Reviews*. 2015;115(19): 10938–10966. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00046.
2. Liu P., Chen G., Zhang J. A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*. 2022;27(4):1372. DOI: 10.3390/molecules27041372.
3. Бурдаев Н.И., Николаева Л.Л., Косенко В.В., Шпрах З.С., Бунятян Н.Д. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2–1):316–332. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508.
4. Jesorka A., Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2008;1: 801–832. DOI: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747.
5. Tokudome Y., Saito Y., Sato F., Kikuchi M., Hinokitani T., Goto K. Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and high membrane fluidity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;73(1):92–96. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.002.
6. Spector A.A., Yorek M.A. Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research*. 1985;26(9):1015–1035.
7. Kiss Z. Determination of phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine. *Lipids*. 1991;26:321–323. DOI: 10.1007/BF02537144.
8. Richmond G.S., Smith T.K. Phospholipases A₁. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(1):588–612. DOI: 10.3390/ijms12010588.
9. Zhao Y., Hasse S., Bourgoignie S.G. Phosphatidylserine-specific phospholipase A1: A friend or the devil in disguise. *Progress in Lipid Research*. 2021;83:101112. DOI: 10.1016/j.plipres.2021.101112.
10. Lands W.E. Metabolism of glycerolipids: II. The enzymatic acylation of lysolecithin. *Journal of Biological Chemistry*. 1960;235(8):2233–2237.
11. Ho C.-L., Lin Y.-L., Li S.-F. Three toxins with phospholipase activity isolated from the yellow-legged hornet (*Vespa verutina*) venom. *Toxicon*. 1999;37(7):1015–1024. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00229-3.
12. Thomson F.J., Clark M.A. Purification of a phosphatidic-acid-hydrolysing phospholipase A₂ from rat brain. *Biochemical Journal*. 1995;306(1):305–309. DOI: 10.1042/bj3060305.

13. Ren J., Lin J., Yu L., Yan M. Lysophosphatidylcholine: Potential Target for the Treatment of Chronic Pain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(15):8274. DOI: 10.3390/ijms23158274.
14. Plemel J.R., Michaels N.J., Weishaupt N., Capriarello A.V., Keough M.B., Rogers J.A., Yukseloglu A., Lim J., Patel V.V., Rawji K.S., Jensen S.K., Teo W., Heyne B., Whitehead S.N., Stys P.K., Yong V.W. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: A primary lipid disrupting myelinopathy. *Glia*. 2018;66(2):327–347. DOI: 10.1002/glia.23245.
15. Drzazga A., Sowińska A., Koziółkiewicz M. Lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylinositol—novel promising signaling molecules and their possible therapeutic activity. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71(6):887–899.
16. Endo Y., Kanno T., Nakajima T., Ikeda K., Taketomi Y., Yokoyama S., Sasamoto S., Asou H.K., Miyako K., Hasegawa Y., Kawashima Y., Ohara O., Murakami M., Nakayama T. 1-Oleoyl-lysophosphatidylethanolamine stimulates ROR γ t activity in TH17 cells. *Science Immunology*. 2023;8(86):eadd4346. DOI: 10.1126/sciimmunol.add4346.
17. Yamamoto Y., Sakurai T., Chen Z., Inoue N., Chiba H., Hui S.-P. Lysophosphatidylethanolamine Affects Lipid Accumulation and Metabolism in a Human Liver-Derived Cell Line. *Nutrients*. 2022;14(3):579. DOI: 10.3390/nu14030579.
18. Park S.-J., Im D.-S. 2-Arachidonyl-lysophosphatidylethanolamine Induces Anti-Inflammatory Effects on Macrophages and in Carrageenan-Induced Paw Edema. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4865. DOI: 10.3390/ijms22094865.
19. Bill C.A., Vines C.M. Phospholipase C. Calcium signaling. 2002;1131:215–242. DOI: 10.1007/978-3-030-12457-1_9.
20. Takaoka R., Kurosaki H., Nakao H., Ikeda K., Nakano M. Formation of asymmetric vesicles via phospholipase D-mediated transphosphatidylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2018;1860(2):245–249. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.10.011.
21. Hou H.-J., Gong J.-S., Dong Y.-X., Qin J., Li H., Li H., Lu Z.-M., Zhang X.-M., Xu Z.-H., Shi J.-S. Phospholipase D engineering for improving the biocatalytic synthesis of phosphatidylserine. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2019;42(7):1185–1194. DOI: 10.1007/s00449-019-02116-7.
22. Arora H., Culler M.D., Decker E.A. Production of a High-Phosphatidylserine Lecithin That Synergistically Inhibits Lipid Oxidation with α -Tocopherol in Oil-in-Water Emulsions. *Foods*. 2022;11(7):1014. DOI: 10.3390/foods11071014.
23. Guertin D.A., Sabatini D.M. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 2005;11(8):353–361. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.06.007.
24. Литвинко Н.М. Межфазный катализ липолитических реакций в биоорганической химии: особенности и практическое применение. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук*. 2015;(4): 109–121.
25. Aguilar A., Saba J.D. Truth and consequences of sphingosine-1-phosphate lyase. *Advances in Biological Regulation*. 2012;52(1):17–30. DOI: 10.1016/j.advenzreg.2011.09.015.
26. Iqbal J., Walsh M.T., Hammad S.M., Hussain M.M. Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2017;28(7):506–518. DOI: 10.1016/j.tem.2017.03.005.
27. Gulbins A., Grassmé H., Hoehn R., Wilker B., Soddemann M., Kohnen M., Edwards M.J., Kornhuber J., Gulbins E. Regulation of Neuronal Stem Cell Proliferation in the Hippocampus by Endothelial Ceramide. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;39(2):790–801. DOI: 10.1159/000447789.
28. Cruciani-Guglielmacci C., López M., Campana M., Le Stunff H. Brain Ceramide Metabolism in the Control of Energy Balance. *Frontiers in Physiology*. 2017;8:787. DOI: 10.3389/fphys.2017.00787.
29. Jana A., Hogan E.L., Pahan K. Ceramide and neurodegeneration: susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *Journal of the Neurological Sciences*. 2009;278(1–2):5–15. DOI: 10.1016/j.jns.2008.12.010.
30. Jiang M., Chavarria T.E., Yuan B., Lodish H.F., Huang N.-J. Phosphocholine accumulation and PHOSPHO1 depletion promote adipose tissue thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(26):15055–15065. DOI: 10.1073/pnas.1916550117.
31. Grabitzki J., Lochnit G. Immunomodulation by phosphocholine—biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes. *Molecular Immunology*. 2009;47(2–3):149–163. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.09.035.
32. Clark S.E., Weiser J.N. Microbial modulation of host immunity with the small molecule phosphorylcholine. *Infection and Immunity*. 2013;81(2):392–401. DOI: 10.1128/IAI.01168-12.
33. Cartier A., Hla T. Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science*. 2019;366(6463):eaar5551. DOI: 10.1126/science.aar5551.
34. Hodun K., Chabowski A., Baranowski M. Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2021;31(5):945–955. DOI: 10.1111/sms.13907.
35. Blanc M., Hsieh W.Y., Robertson K.A., Kropp K.A., Forster T., Shui G., Lacaze P., Watterson S., Griffiths S.J., Spann N.J., Meljon A., Talbot S., Krishnan K., Covey D.F., Wenk M.R., Craigmiles M., Ruzsics Z., Haas J., Angulo A., Griffiths W.J., Glass C.K., Wang Y., Ghazal P. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity*. 2013;38(1):106–118. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.11.004.
36. Zang R., Case J.B., Yutuc E., Ma X., Shen S., Gomez Castro M.F., Liua Z., Zeng Q., Zhao H., Son J., Rothlauf P.W., Kreutzberger A.J.B., Hou G., Zhang H., Bosem S., Wang X., Vahey M.D., Mani K., Griffiths W.J., Kirchhausen T., Fremont D.H., Guo H., Diwane A., Wang Y., Diamond M.S., Whelan S.P.J., Ding S. Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(50):32105–32113. DOI: 10.1073/pnas.2012197117.
37. Griffiths W.J., Wang Y. Cholesterol metabolism: from lipidomics to immunology. *Journal of Lipid Research*. 2022;63(2):100165. DOI: 10.1016/j.jlr.2021.100165.
38. Chambers K.F., Day P.E., Aboufarrag H.T., Kroon P.A. Polyphenol effects on cholesterol metabolism via bile acid biosynthesis, CYP7A1: A Review. *Nutrients*. 2019;11(11):2588. DOI: 10.3390/nu11112588.
39. Zhang J., Zhu Y., Wang X., Wang J. 25-hydroxycholesterol: an integrator of antiviral ability and signaling. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1268104. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1268104.
40. Kakiyama G., Minowa K., Rodriguez-Agudo D., Martin R., Takei H., Mitamura K., Ikegawa S., Suzuki M., Nittano H., Fuchs M., Heuman D.M., Zhou H., Pandak W.M. Coffee

- modulates insulin-hepatocyte nuclear factor-4 α -Cyp7b1 pathway and reduces oxysterol-driven liver toxicity in a nonalcoholic fatty liver disease mouse model. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2022;323(5):G488–G500. DOI: 10.1152/ajpgi.00179.2022.
41. Chiang J.Y.L., Ferrell J.M. Up to date on cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in bile acid synthesis. *Liver Research*. 2020;4(2):47–63. DOI: 10.1016/j.livres.2020.05.001.
42. Noguchi N., Saito Y., Urano Y. Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;446(3):692–696. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.010.
43. Bikle D., Christakos S. New aspects of vitamin D metabolism and action – addressing the skin as source and target. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020;16(4):234–252. DOI: 10.1038/s41574-019-0312-5.
44. Титов В.Н. Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы теории атерогенеза. Москва: Клиника XXI века; 2002. 495 с.
45. Wang B., Wu L., Chen J., Dong L., Chen C., Wen Z., Hu J., Fleming I., Wang D.W. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):94. DOI: 10.1038/s41392-020-00443-w.
46. Biernacki M., Skrzydlewska E. Metabolism of endocannabinoids. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2016;70(0):830–843. DOI: 10.5604/17322693.1213898.
47. Serhan C.N., Levy B.D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(7):2657–2669. DOI: 10.1172/JCI97943.
48. Hu J., Lin S., Zheng B., Cheung P.C.K. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58(8):1243–1249. DOI: 10.1080/10408398.2016.1245650.
49. De Carvalho C.C.R., Caramujo M.J. The Various roles of fatty acids. *Molecules*. 2018;23(10):2583. DOI: 10.3390/molecules23102583.
50. Bangham A.D., Standish M.M., Weissmann G. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology*. 1965;13(1):253–259. DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80094-8.
51. Brunner J., Skrabal P., Hauser H. Single bilayer vesicles prepared without sonication physico-chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1976;455(2):322–331. DOI: 10.1016/0005-2736(76)90308-4.
52. Batzri S., Korn E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1973;298(4):1015–1019. DOI: 10.1016/0005-2736(73)90408-2.
53. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978;75(9):4194–4198. DOI: 10.1073/pnas.75.9.4194.
54. New R.R. Liposomes. Oxford: IRL at Oxford University Press; 1990. 301 p.
55. Kim S., Martin G.M. Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1981;646(1):1–9. DOI: 10.1016/0005-2736(81)90264-9.
56. Karn P.-R., Cho W., Park H.J., Park J.S., Hwang S.J. Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method. *International Journal of Nanomedicine*. 2013;365–377. DOI: 10.2147/IJN.S39025.
57. Nicolosi D., Scalia M., Nicolosi V.M., Pignatello R. Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(6):553–558. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.01.015.
58. Lehmann J., Agel M.R., Engelhardt K.H., Pinnapireddy S.R., Agel S., Duse L., Preis E., Wojcik M., Bakowsky U. Improvement of pulmonary photodynamic therapy: Nebulisation of curcumin-loaded tetraether liposomes. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1243. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081243.
59. Phapal S.M., Sunthar P. Influence of micro-mixing on the size of liposomes self-assembled from miscible liquid phases. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2013;172:20–30. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2013.04.006.
60. Mozafari M.R., Reed C.J., Rostron C. Cytotoxicity evaluation of anionic nanoliposomes and nanolipoplexes prepared by the heating method without employing volatile solvents and detergents. *Pharmazie*. 2007;62(3):205–209.
61. Saliba A.-E., Vonkova I., Deghou S., Ceschia S., Tischer C., Kugler K.G., Bork P., Ellenberg J., Gavin A.-C. A protocol for the systematic and quantitative measurement of protein-lipid interactions using the liposome-microarray-based assay. *Nature Protocols*. 2016; 11(6):1021–1038. DOI: 10.1038/nprot.2016.059.
62. Devrim B., Kara A., Vural İ., Bozkır A. Lysozyme-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: preparation, characterization and colloidal stability evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2016;42(11):1865–1876. DOI: 10.1080/03639045.2016.1180392.
63. Anabousi S., Laue M., Lehr C.-M., Bakowsky U., Ehrhardt C. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):295–303. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.12.009.
64. Sivadasan D., Sultan M.H., Madkhali O.A., Alsabei S.H., Alessa A.A. Stealth liposomes (PEGylated) containing an anticancer drug camptothecin: In vitro characterization and in vivo pharmacokinetic and tissue distribution study. *Molecules*. 2022;27(3):1086. DOI: 10.3390/molecules27031086.
65. Shetti P., Jalalpure S.S., Patil A.S., Kaur K. Apigenin-loaded stealth liposomes: Development and pharmacokinetic studies for enhanced plasma retention of drug in cancer therapy. *Topics in Catalysis*. 2024;67(1):46–58. DOI: 10.1007/s11244-023-01818-3.
66. Gheibi Hayat S.M., Jaafari M.R., Hatamipour M., Penson P.E., Sahebkar A. Liposome circulation time is prolonged by CD47 coating. *Protein & Peptide Letters*. 2020;27(10):1029–1037. DOI: 10.2174/0929866527666200413100120.
67. Wang Z., Zhao Y., Jiang Y., Lv W., Wu L., Wang B., Lv L., Xu Q., Xin H. Enhanced anti-ischemic stroke of ZL006 by T7-conjugated PEGylated liposomes drug delivery system. *Scientific Reports*. 2015;5(1):12651. DOI: 10.1038/srep12651.
68. Sylvester B., Porfire A., Muntean D.-M., Vlase L., Lupuț L., Licarete E., Sesarman A., Costel Alupeș M., Banciu M., Achim M., Tomuța I. Optimization of prednisolone-loaded long-circulating liposomes via application of Quality by Design (QbD) approach. *Journal of Liposome Research*. 2018;28(1):49–61. DOI: 10.1080/08982104.2016.1254242.
69. Maherani B., Arab-Tehrany E., Mozafari M.R., Gaiani C., Linder M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience*. 2011;7(3):436–52. DOI: 10.2174/15734311795542453.

70. Crowe L.M., Crowe J.H., Rudolph A., Womersley C., Appel L. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985;242(1):240–247. DOI: 10.1016/0003-9861(85)90498-9.
71. Stark B., Pabst G., Prassl R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;41(3–4):546–555. DOI: 10.1016/j.ejps.2010.08.010.
72. Stadnichenko O.V., Krasnopolsky Y.M., Yarnykh T.G. The study of liophilization parameters in the liposomal irinotecan development. *News of Pharmacy*. 2017;4(92):45–49.
73. Franzé S., Selmin F., Samaritani E., Minghetti P., Cilurzo F. Lyophilization of liposomal formulations: still necessary, still challenging. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):139. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030139.
74. Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*. 2010;27:796–810. DOI: 10.1007/s1095-010-0073-2.
75. Pedreira de Almeida A.C., Matos Alves Pinto L., Piovesan Alves G., Nunes de Moraes Ribeiro L., Andrade Santana M.H., Saia Cereda C.M., Fernandes Fraceto L., de Paula E. Liposomal-based lidocaine formulation for the improvement of infiltrative buccal anaesthesia. *Journal of Liposome Research*. 2019;29(1):66–72. DOI: 10.1080/08982104.2018.1483947.
76. Kent B., Garvey C. J., Cookson D., Bryant G. The inverse hexagonal – inverse ribbon – lamellar gel phase transition sequence in low hydration DOPC:DOPE phospholipid mixtures. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2009;157(1):56–60. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2008.10.003.
77. Guida V. Thermodynamics and kinetics of vesicles formation processes. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2010;161(1–2):77–88. DOI: 10.1016/j.cis.2009.11.004.
78. Cohen J.A. Electrophoretic characterization of liposomes. *Methods in Enzymology*. 2003;367:148–176. DOI: 10.1016/S0076-6879(03)67011-4.
79. Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J.-E., Benoit J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*. 2003;24(23):4283–4300. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00331-4.
80. Стадниченко А. В., Краснополяский Ю. М., Ярных Т. Г. Оптимизация параметров дзета-потенциала при создании липосом с иринотеканом. *Фармация Казахстана*. 2017;6:7–10.
81. Стадниченко А. В., Краснополяский Ю. М., Ярных Т. Г. Изучение факторов, влияющих на стабильность липосом с цитостатиками при регидратации. *Рецепт*. 2017;20(2):146–152.
82. Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Дмитриева М. В., Оборотова Н. А., Орлова О. Л., Полозкова А. П. Разработка лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола – ЛХС-1208. *Фармацевтическое дело и технология лекарств*. 2020;(5):66–78.
83. Vélez M. A., Perotti M. C., Hynes E. R., Gennaro A. M. Effect of lyophilization on food grade liposomes loaded with conjugated linoleic acid. *Journal of Food Engineering*. 2019;240:199–206. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2018.07.033.
84. Yadav A. V., Murthy M. S., Shete A. S., Sakhare S. Stability aspects of liposomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2011;45(4):402–413.
85. D'souza A. A., Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016;13(9):1257–1275. DOI: 10.1080/17425247.2016.1182485.

REFERENCES

1. Pattni B.S., Chupin V.V., Torchilin V.P. New developments in liposomal drug delivery. *Chemical Reviews*. 2015;115(19):10938–10966. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00046.
2. Liu P., Chen G., Zhang J. A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*. 2022;27(4):1372. DOI: 10.3390/molecules27041372.
3. Burdaev N.I., Nikolaeva L.L., Kosenko V.V., Shprah Z.S., Bunyatyan N. D. Liposomes as Drug Carriers: Classification, Preparation Methods, and Medicinal Use. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2–1):316–332. (In Russ.) DOI:10.30895/1991-2919-2023-508.
4. Jesorka A., Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2008;1:801–832. DOI: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747.
5. Tokudome Y., Saito Y., Sato F., Kikuchi M., Hinokitani T., Goto K. Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and high membrane fluidity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;73(1):92–96. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.002.
6. Spector A. A., Yorek M. A. Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research*. 1985;26(9):1015–1035.
7. Kiss Z. Determination of phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine. *Lipids*. 1991;26:321–323. DOI: 10.1007/BF02537144.
8. Richmond G. S., Smith T. K. Phospholipases A₁. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(1):588–612. DOI: 10.3390/ijms12010588.
9. Zhao Y., Hasse S., Bourgoin S. G. Phosphatidylserine-specific phospholipase A1: A friend or the devil in disguise. *Progress in Lipid Research*. 2021;83:101112. DOI: 10.1016/j.plipres.2021.101112.
10. Lands W. E. Metabolism of glycerolipids: II. The enzymatic acylation of lysolecithin. *Journal of Biological chemistry*. 1960;235(8):2233–2237.
11. Ho C.-L., Lin Y.-L., Li S.-F. Three toxins with phospholipase activity isolated from the yellow-legged hornet (*Vespa verutina*) venom. *Toxicon*. 1999;37(7):1015–1024. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00229-3.
12. Thomson F. J., Clark M. A. Purification of a phosphatidic-acid-hydrolysing phospholipase A₂ from rat brain. *Biochemical Journal*. 1995;306(1):305–309. DOI: 10.1042/bj3060305.
13. Ren J., Lin J., Yu L., Yan M. Lysophosphatidylcholine: Potential Target for the Treatment of Chronic Pain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(15):8274. DOI: 10.3390/ijms23158274.
14. Plemel J. R., Michaels N. J., Weishaupt N., Caprariello A. V., Keough M. B., Rogers J. A., Yukseloglu A., Lim J., Patel V. V., Rawji K. S., Jensen S. K., Teo W., Heyne B., Whitehead S. N., Stys P. K., Yong V. W. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: A primary lipid disrupting myelinopathy. *Glia*. 2018;66(2):327–347. DOI: 10.1002/glia.23245.

15. Drzazga A., Sowińska A., Koziolkiewicz M. Lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylinositol—novel promising signaling molecules and their possible therapeutic activity. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71(6):887–899.
16. Endo Y., Kanno T., Nakajima T., Ikeda K., Taketomi Y., Yokoyama S., Sasamoto S., Asou H.K., Miyako K., Hasegawa Y., Kawashima Y., Ohara O., Murakami M., Nakayama T. 1-Oleoyl-lysophosphatidylethanolamine stimulates ROR γ t activity in TH17 cells. *Science Immunology*. 2023;8(86):eadd4346. DOI: 10.1126/sciimmunol.add4346.
17. Yamamoto Y., Sakurai T., Chen Z., Inoue N., Chiba H., Hui S.-P. Lysophosphatidylethanolamine Affects Lipid Accumulation and Metabolism in a Human Liver-Derived Cell Line. *Nutrients*. 2022;14(3):579. DOI: 10.3390/nu14030579.
18. Park S.-J., Im D.-S. 2-Arachidonyl-lysophosphatidylethanolamine Induces Anti-Inflammatory Effects on Macrophages and in Carrageenan-Induced Paw Edema. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4865. DOI: 10.3390/ijms22094865.
19. Bill C.A., Vines C.M. Phospholipase C. Calcium signaling. 2020;1131:215–242. DOI: 10.1007/978-3-030-12457-1_9.
20. Takaoka R., Kurosaki H., Nakao H., Ikeda K., Nakano M. Formation of asymmetric vesicles via phospholipase D-mediated transphosphatidylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2018;1860(2):245–249. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.10.011.
21. Hou H.-J., Gong J.-S., Dong Y.-X., Qin J., Li H., Li H., Lu Z.-M., Zhang X.-M., Xu Z.-H., Shi J.-S. Phospholipase D engineering for improving the biocatalytic synthesis of phosphatidylserine. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2019;42(7):1185–1194. DOI: 10.1007/s00449-019-02116-7.
22. Arora H., Culler M.D., Decker E.A. Production of a High-Phosphatidylserine Lecithin That Synergistically Inhibits Lipid Oxidation with α -Tocopherol in Oil-in-Water Emulsions. *Foods*. 2022;11(7):1014. DOI: 10.3390/foods11071014.
23. Guertin D.A., Sabatini D.M. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 2005;11(8):353–361. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.06.007.
24. Litvinko N.M. Interfacial catalysis of lipolytic reactions in bioorganic chemistry: features and practical application. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical Series*. 2015;(4):109–121. (In Russ.)
25. Aguilar A., Saba J.D. Truth and consequences of sphingosine-1-phosphate lyase. *Advances in Biological Regulation*. 2012;52(1):17–30. DOI: 10.1016/j.advenzreg.2011.09.015.
26. Iqbal J., Walsh M.T., Hammad S.M., Hussain M.M. Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2017;28(7):506–518. DOI: 10.1016/j.tem.2017.03.005.
27. Gulbins A., Grassmé H., Hoehn R., Wilker B., Soddemann M., Kohnen M., Edwards M.J., Kornhuber J., Gulbins E. Regulation of Neuronal Stem Cell Proliferation in the Hippocampus by Endothelial Ceramide. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;39(2):790–801. DOI: 10.1159/000447789.
28. Cruciani-Guglielmacci C., López M., Campana M., Le Stunff H. Brain Ceramide Metabolism in the Control of Energy Balance. *Frontiers in Physiology*. 2017;8:787. DOI: 10.3389/fphys.2017.00787.
29. Jana A., Hogan E.L., Pahan K. Ceramide and neurodegeneration: susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *Journal of the Neurological Sciences*. 2009;278(1–2):5–15. DOI: 10.1016/j.jns.2008.12.010.
30. Jiang M., Chavarria T.E., Yuan B., Lodish H.F., Huang N.-J. Phosphocholine accumulation and PHOSPHO1 depletion promote adipose tissue thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(26):15055–15065. DOI: 10.1073/pnas.1916550117.
31. Grabitzki J., Lochnit G. Immunomodulation by phosphocholine—biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes. *Molecular Immunology*. 2009;47(2–3):149–163. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.09.035.
32. Clark S.E., Weiser J.N. Microbial modulation of host immunity with the small molecule phosphorylcholine. *Infection and Immunity*. 2013;81(2):392–401. DOI: 10.1128/IAI.01168-12.
33. Cartier A., Hla T. Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science*. 2019;366(6463):eaar5551. DOI: 10.1126/science.aar5551.
34. Hodun K., Chabowski A., Baranowski M. Sphingosine-1-phosphate in acute exercise and training. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2021;31(5):945–955. DOI: 10.1111/sms.13907.
35. Blanc M., Hsieh W.Y., Robertson K.A., Kropp K.A., Forster T., Shui G., Lacaze P., Watterson S., Griffiths S.J., Spann N.J., Meljon A., Talbot S., Krishnan K., Covey D.F., Wenk M.R., Craigon M., Ruzsics Z., Haas J., Angulo A., Griffiths W.J., Glass C.K., Wang Y., Ghazal P. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity*. 2013;38(1):106–118. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.11.004.
36. Zang R., Case J.B., Yutuc E., Ma X., Shen S., Gomez Castro M.F., Liua Z., Zeng Q., Zhao H., Son J., Rothlauf P.W., Kreutzberger A.J.B., Hou G., Zhang H., Bosem S., Wang X., Vahey M.D., Mani K., Griffiths W.J., Kirchhausen T., Fremont D.H., Guo H., Diwane A., Wang Y., Diamond M.S., Whelan S.P.J., Ding S. Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(50):32105–32113. DOI: 10.1073/pnas.2012197117.
37. Griffiths W.J., Wang Y. Cholesterol metabolism: from lipidomics to immunology. *Journal of Lipid Research*. 2022;63(2):100165. DOI: 10.1016/j.jlrl.2021.100165.
38. Chambers K.F., Day P.E., Aboufarrag H.T., Kroon P.A. Polyphenol effects on cholesterol metabolism via bile acid biosynthesis, CYP7A1: A Review. *Nutrients*. 2019;11(11):2588. DOI: 10.3390/nu11112588.
39. Zhang J., Zhu Y., Wang X., Wang J. 25-hydroxycholesterol: an integrator of antiviral ability and signaling. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1268104. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1268104.
40. Kakiyama G., Minowa K., Rodriguez-Agudo D., Martin R., Takei H., Mitamura K., Ikegawa S., Suzuki M., Nittono H., Fuchs M., Heuman D.M., Zhou H., Pandak W.M. Coffee modulates insulin-hepatocyte nuclear factor-4 α -Cyp7b1 pathway and reduces oxysterol-driven liver toxicity in a nonalcoholic fatty liver disease mouse model. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2022;323(5):G488–G500. DOI: 10.1152/ajpgi.00179.2022.
41. Chiang J.Y.L., Ferrell J.M. Up to date on cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in bile acid synthesis. *Liver Research*. 2020;4(2):47–63. DOI: 10.1016/j.livres.2020.05.001.
42. Noguchi N., Saito Y., Urano Y. Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;446(3):692–696. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.010.

43. Bikle D., Christakos S. New aspects of vitamin D metabolism and action – addressing the skin as source and target. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020;16(4):234–252. DOI: 10.1038/s41574-019-0312-5.
44. Titov V. N. Atherosclerosis as a pathology of polyene fatty acids. Biological basis of the theory of atherogenesis. Moscow: Klinika XXI veka; 2002. 495 p. (In Russ.)
45. Wang B., Wu L., Chen J., Dong L., Chen C., Wen Z., Hu J., Fleming I., Wang D. W. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):94. DOI: 10.1038/s41392-020-00443-w.
46. Biernacki M., Skrzydlewska E. Metabolism of endocannabinoids. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2016;70(0):830–843. DOI: 10.5604/17322693.1213898.
47. Serhan C. N., Levy B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(7):2657–2669. DOI: 10.1172/JCI97943.
48. Hu J., Lin S., Zheng B., Cheung P. C. K. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58(8):1243–1249. DOI: 10.1080/10408398.2016.1245650.
49. De Carvalho C. C. R., Caramujo M. J. The Various roles of fatty acids. *Molecules*. 2018;23(10):2583. DOI: 10.3390/molecules23102583.
50. Bangham A. D., Standish M. M., Weissmann G. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology*. 1965;13(1):253–259. DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80094-8.
51. Brunner J., Skrabal P., Hauser H. Single bilayer vesicles prepared without sonication physico-chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1976;455(2):322–331. DOI: 10.1016/0005-2736(76)90308-4.
52. Batzri S., Korn E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1973;298(4):1015–1019. DOI: 10.1016/0005-2736(73)90408-2.
53. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978;75(9):4194–4198. DOI: 10.1073/pnas.75.9.4194.
54. New R. R. Liposomes. Oxford: IRL at Oxford University Press; 1990. 301 p.
55. Kim S., Martin G. M. Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1981;646(1):1–9. DOI: 10.1016/0005-2736(81)90264-9.
56. Karn P.-R., Cho W., Park H. J., Park J. S., Hwang S. J. Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method. *International Journal of Nanomedicine*. 2013;365–377. DOI: 10.2147/IJN.S39025.
57. Nicolosi D., Scalia M., Nicolosi V. M., Pignatello R. Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(6):553–558. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.01.015.
58. Lehmann J., Agel M. R., Engelhardt K. H., Pinnapireddy S. R., Agel S., Duse L., Preis E., Wojcik M., Bakowsky U. Improvement of pulmonary photodynamic therapy: Nebulisation of curcumin-loaded tetraether liposomes. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1243. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081243.
59. Phapal S. M., Sunthar P. Influence of micro-mixing on the size of liposomes self-assembled from miscible liquid phases. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2013;172:20–30. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2013.04.006.
60. Mozafari M. R., Reed C. J., Rostron C. Cytotoxicity evaluation of anionic nanoliposomes and nanolipoplexes prepared by the heating method without employing volatile solvents and detergents. *Pharmazie*. 2007;62(3):205–209.
61. Saliba A.-E., Vonkova I., Deghou S., Ceschia S., Tischer C., Kugler K. G., Bork P., Ellenberg J., Gavin A.-C. A protocol for the systematic and quantitative measurement of protein-lipid interactions using the liposome-microarray-based assay. *Nature Protocols*. 2016; 11(6):1021–1038. DOI: 10.1038/nprot.2016.059.
62. Devrim B., Kara A., Vural İ., Bozkır A. Lysozyme-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: preparation, characterization and colloidal stability evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2016;42(11):1865–1876. DOI: 10.1080/03639045.2016.1180392.
63. Anabousi S., Laue M., Lehr C.-M., Bakowsky U., Ehrhardt C. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):295–303. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.12.009.
64. Sivasadan D., Sultan M. H., Madkhali O. A., Alsabei S. H., Alessa A. A. Stealth liposomes (PEGylated) containing an anticancer drug camptothecin: In vitro characterization and in vivo pharmacokinetic and tissue distribution study. *Molecules*. 2022;27(3):1086. DOI: 10.3390/molecules27031086.
65. Shetti P., Jalalpure S. S., Patil A. S., Kaur K. Apigenin-loaded stealth liposomes: Development and pharmacokinetic studies for enhanced plasma retention of drug in cancer therapy. *Topics in Catalysis*. 2024;67(1):46–58. DOI: 10.1007/s11244-023-01818-3.
66. Gheibi Hayat S. M., Jaafari M. R., Hatamipour M., Penson P. E., Sahebkar A. Liposome circulation time is prolonged by CD47 coating. *Protein & Peptide Letters*. 2020;27(10):1029–1037. DOI: 10.2174/0929866527666200413100120.
67. Wang Z., Zhao Y., Jiang Y., Lv W., Wu L., Wang B., Lv L., Xu Q., Xin H. Enhanced anti-ischemic stroke of ZL006 by T7-conjugated PEGylated liposomes drug delivery system. *Scientific Reports*. 2015;5(1):12651. DOI: 10.1038/srep12651.
68. Sylvester B., Porfire A., Muntean D.-M., Vlase L., Lupuț L., Licarete E., Sesarman A., Costel Alupeș M., Banciu M., Achim M., Tomuță I. Optimization of prednisolone-loaded long-circulating liposomes via application of Quality by Design (QbD) approach. *Journal of Liposome Research*. 2018;28(1):49–61. DOI: 10.1080/08982104.2016.1254242.
69. Maherani B., Arab-Tehrany E., Mozafari M. R., Gaiani C., Linder M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience*. 2011;7(3):436–52. DOI: 10.2174/157341311795542453.
70. Crowe L. M., Crowe J. H., Rudolph A., Womersley C., Appel L. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985;242(1):240–247. DOI: 10.1016/0003-9861(85)90498-9.
71. Stark B., Pabst G., Prassl R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;41(3–4):546–555. DOI: 10.1016/j.ejps.2010.08.010.

72. Stadnichenko O.V., Krasnopol'skiy Yu.M., Yarnykh T.G. The study of lyophilization parameters in the liposomal irinotecan development. *News of Pharmacy*. 2017;4(92):45–49.
73. Franzé S., Selmin F., Samaritani E., Minghetti P., Cilurzo F. Lyophilization of liposomal formulations: still necessary, still challenging. *Pharmaceutics*. 2018;10(3):139. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030139.
74. Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*. 2010;27:796–810. DOI: 10.1007/s11095-010-0073-2.
75. Pedreira de Almeida A.C., Matos Alves Pinto L., Piovesan Alves G., Nunes de Moraes Ribeiro L., Andrade Santana M.H., Saia Cereda C.M., Fernandes Fraceto L., de Paula E. Liposomal-based lidocaine formulation for the improvement of infiltrative buccal anaesthesia. *Journal of Liposome Research*. 2019;29(1),66–72. DOI: 10.1080/08982104.2018.1483947.
76. Kent B., Garvey C. J., Cookson D., Bryant G. The inverse hexagonal – inverse ribbon – lamellar gel phase transition sequence in low hydration DOPC:DOPE phospholipid mixtures. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2009;157(1):56–60. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2008.10.003.
77. Guida V. Thermodynamics and kinetics of vesicles formation processes. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2010;161(1–2):77–88. DOI: 10.1016/j.cis.2009.11.004.
78. Cohen J. A. Electrophoretic characterization of liposomes. *Methods in Enzymology*. 2003;367:148–176. DOI: 10.1016/S0076-6879(03)67011-4.
79. Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J.-E., Benoit J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*. 2003;24(23):4283–4300. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00331-4.
80. Stadnichenko A.V., Krasnopol'skiy Yu.M., Yarnykh T.G. Optimization of zeta potential parameters when creating liposomes with irinotecan. *Farmaciya Kazahstana*. 2017;6:7–10. (In Russ.)
81. Stadnichenko A.V., Krasnopol'skiy Yu.M., Yarnykh T.G. Study of factors affecting the stability of liposomes with cytostatics during rehydration. *Recept*. 2017;20(2):146–152. (In Russ.)
82. Gulyakin I.D., Nikolaeva L.L., Dmitrieva M.V., Oborotova N.A., Orlova O.L., Polozkova A.P. Development of a lyophilized liposomal dosage form of an indolocarbazole derivative – LHS-1208. *Pharmaceutical business and drug technology*. 2020;(5):66–78. (In Russ.)
83. Vélez M. A., Perotti M. C., Hynes E. R., Gennaro A. M. Effect of lyophilization on food grade liposomes loaded with conjugated linoleic acid. *Journal of Food Engineering*. 2019;240:199–206. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2018.07.033.
84. Yadav A. V., Murthy M. S., Shete A. S., Sakhare S. Stability aspects of liposomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2011;45(4):402–413.
85. D'souza A. A., Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016;13(9):1257–1275. DOI: 10.1080/17425247.2016.1182485.



Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: визуализация и фармакокинетика. Часть 2 (обзор)

О. Н. Пожарицкая¹, Ю. М. Коцур²✉, С. С. Осочук³, Е. В. Флисюк², И. Е. Смехова²,
С. Д. Малков², К. О. Зарифи², И. А. Титович², Е. К. Красова², А. Н. Шиков²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Мурманский морской биологический институт Российской академии наук (ММБИ РАН). 183038, Россия, г. Мурманск, ул. Владимирская, д. 17

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, литера А

³ Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». 210009, Республика Беларусь, г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27

✉ Контактное лицо: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliya.kocur@spcru.ru

ORCID: О. Н. Пожарицкая – <https://orcid.org/0000-0003-1061-0665>;

Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;

С. С. Осочук – <https://orcid.org/0000-0003-2074-3832>;

Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

И. Е. Смехова – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>;

С. Д. Малков – <https://orcid.org/0009-0002-5678-672X>;

К. О. Зарифи – <https://orcid.org/0009-0001-1190-5839>;

И. А. Титович – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>;

Е. К. Красова – <https://orcid.org/0000-0001-7785-4256>;

А. Н. Шиков – <https://orcid.org/0000-0003-4351-0695>.

Статья поступила: 29.08.2024

Статья принята в печать: 15.11.2024

Статья опубликована: 15.11.2024

Резюме

Введение. Во второй части обзора рассмотрены вопросы визуализации, фармакокинетики и биораспределения липосом.

Текст. Существует широкий спектр методов визуализации, доступных для оценки морфологии липосом и их качества, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки: световая микроскопия, ESEM, TEM, AFM и пр. В целом выбор метода зависит от того, какие морфологические характеристики и степень детализации требуются. В процессе подготовки проб липосом важно понимать особенности образцов и метода визуализации. Адекватно проведенные исследования по фармакокинетике и биораспределению также могут расцениваться как инструмент визуализации липосом. Фармакокинетика липосомальных форм определяется множеством факторов, таких как природа ЛС, дозировка, липидный состав, размер липосом, заряд, покрытие липосом вспомогательными веществами и способ введения. Кроме того, взаимодействие липосомальных форм с иммунной системой, ретикулоэндотелиальной системой и компонентами крови играет важную роль в их абсорбции, распределении и выведении из организма.

Заключение. Лучшее понимание абсорбции, биораспределения, метаболизма и выведения липосомальных форм необходимо для разработки современных лекарственных средств.

Ключевые слова: липосомы, визуализация, фармакокинетика, мРНК

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

Вклад авторов. С. Д. Малков и К. О. Зарифи проводили сбор и систематизацию материала, работали с табличным материалом, участвовали в написании текста. Ю. М. Коцур осуществляла сбор данных из литературных источников, проводила сбор и анализ полученных данных, отвечала за написание. С. С. Осочук, О. Н. Пожарицкая, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова и А. Н. Шиков отвечали за концепцию обзора, редактирование текста статьи, научное консультирование и утверждение окончательного варианта статьи для публикации. Е. К. Красова и И. А. Титович осуществляли редактирование и оформление текста статьи.

© Пожарицкая О. Н., Коцур Ю. М., Осочук С. С., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Малков С. Д., Зарифи К. О., Титович И. А., Красова Е. К., Шиков А. Н., 2024

© Pozharitskaya O. N., Kozur Yu. M., Osouchuk S. S., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Malkov S. D., Zarifi K. O., Titovich I. A., Krasova E. K., Shikov A. N., 2024

Финансирование. Результаты работы получены в рамках выполнения государственного задания по теме «Разработка композиции и технологии получения нового липидного наноносителя с применением ионизируемых липидов для адресной доставки мРНК-вакцин, направленных на здоровьесбережение и повышение качества жизни населения», зарегистрированного в ЕГИСУ НИОКТР научным направлением ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России № 124041800053-8 от 18 апреля 2024 года.

Для цитирования: Пожарицкая О. Н., Коцур Ю. М., Осочук С. С., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Малков С. Д., Зарифи К. О., Титович И. А., Красова Е. К., Шиков А. Н. Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: визуализация и фармакокинетика. Часть 2. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):78–98. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1919>

Liposomes – metabolically active drug transport systems: visualization and pharmacokinetic. Part 2 (review)

Olga N. Pozharitskaya¹, Yuliya M. Kozur²✉, Sergey S. Osochuk³, Elena V. Flisyuk², Irina E. Smekhova², Sergey D. Malkov², Kseniya O. Zarifi², Irina A. Titovich², Elena K. Krasova², Alexander N. Shikov²

¹ Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academy of Sciences (MMBI RAS). 17, Vladimirskaia str., Murmansk, 183038, Russia

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

³ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University. 27, Frunze avenue, Vitebsk, 210009, Republic of Belarus

✉ **Corresponding author:** Yuliya M. Kotsur. **E-mail:** uliya.kocur@spcpcu.ru

ORCID: Olga N. Pozharitskaya – <https://orcid.org/0000-0003-1061-0665>;

Yuliya M. Kozur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;

Sergey S. Osochuk – <https://orcid.org/0000-0003-2074-3832>;

Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

Irina E. Smekhova – <https://orcid.org/0000-0002-0013-4784>;

Sergey D. Malkov – <https://orcid.org/0009-0002-5678-672X>;

Kseniya O. Zarifi – <https://orcid.org/0009-0001-1190-5839>;

Irina A. Titovich – <https://orcid.org/0000-0002-1343-4663>;

Elena K. Krasova – <https://orcid.org/0000-0001-7785-4256>;

Alexander N. Shikov – <https://orcid.org/0000-0003-4351-0695>.

Received: 29.08.2024

Accepted: 15.11.2024

Published: 15.11.2024

Abstract

Introduction. In the second part of the review we discussed aspects of visualization, pharmacokinetics and biodistribution of liposomes.

Text. Many different methods have been proposed for the visualization of liposomes morphology and quality such as light microscopy, ESEM, TEM, AFM, etc. Each method has its own advantages and limitations which are discussed in the article: In general, the selection of method depends on the specific morphological characteristics and level of details. It is important to understand the specificity of the liposomes and the visualization method for correct preparation of samples. Adequately performed pharmacokinetic and biodistribution studies can also be used as a tool for liposome visualization. The nature of active pharmaceutical ingredients, dose, lipid components, size of liposomes, charge, coating of liposomes with excipients and route of administration significantly affects the pharmacokinetics of liposomal forms. Additionally, the interaction of liposomal forms with the immune system, reticuloendothelial system and blood components play an important role in their absorption, distribution and elimination.

Conclusion. The better understanding of the absorption, biodistribution, metabolism and clearance of liposomal formulations is essential for the development of modern drugs.

Keywords: liposomes, visualization, pharmacokinetics, mRNA

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

Contribution of the authors. Sergey D. Malkov and Kseniya O. Zarifi collected and systematized the material, worked with tabular material, and participated in writing the text. Yuliya M. Kozur collected data from literary sources, collected and analyzed the data obtained, and was responsible for writing. Sergey S. Osochuk, Olga N. Pozharitskaya, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova and Alexander N. Shikov were responsible for the concept of the review, editing the text of the article, scientific consulting, and approval of the final version of the article for publication. Elena K. Krasova and Irina A. Titovich edited the text of the article and designed the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained as part of the implementation of the State assignment on the topic "Development of the composition and technology of a new lipid nanocarrier using ionizable lipids for targeted delivery of an mRNA vaccine aimed at preserving health and improving the quality of life of the population", registered in the Unified state information system for recording research, development and technological work for civil purposes of the modern direction of the St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University. № 124041800053-8 dated April 18, 2024.

For citation: Pozharitskaya O. N., Kozur Yu. M., Osochuk S. S., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Malkov S. D., Zarifi K. O., Titovich I. A., Krasova E. K., Shikov A. N. Liposomes – metabolically active drug transport systems: visualization and pharmacokinetic. Part 2. *Drug development & registration*. 2024;13(4):78–98. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1919>

ВВЕДЕНИЕ

Липосомы как коллоидная система доставки лекарств, появившаяся в 1960-х годах, остаются в центре внимания обширных исследований и являются высокоэффективным методом доставки лекарств. В первой части обзорной статьи мы обсудили современную классификацию липосом, методы их изготовления, стабилизации и роли составляющих компонентов [1]. Во второй части обзорной статьи мы сфокусировались на методах идентификации липосом и их фармакокинетики, включая системную абсорбцию при различных путях введения, биораспределение в организме и выведение.

ЛИПОСОМЫ: ПРОЩЕ СКАЗАТЬ, ЧЕМ ДОКАЗАТЬ

В большинстве публикаций авторы заявляют о получении липосом, но редко предоставляют доказательства того, что они сформированы и что действующие вещества включены в липосому, а не абсорбированы на ее поверхности. Поэтому важным аспектом физико-химической оценки липосом является визуализация морфологии наночастиц.

Одним из наиболее распространенных методов изучения размеров и морфологии липосомальных частиц является микроскопия (рисунок 1). Существующие методы такой визуализации можно разделить на световую, электронную и атомно-силовую микроскопию [2]. Каждый имеет свои преимущества и ограничения, которые следует учитывать при оценке систем доставки лекарственных субстанций (ЛС) в форме липосом (таблица 1).

Световая микроскопия

Для световой или оптической микроскопии используют микроскопы, в которых видимый свет и расположение линз увеличивают поле зрения. Базовая световая микроскопия сама по себе не дает исчерпывающей информации о липидном бислое по срав-

нению с другими методами микроскопии. Однако ее можно использовать для быстрого получения изображения везикул на базовом лабораторном оборудовании [2], общей информации о размере, форме, однородности и степени агрегации образцов липосом [3, 18]. Методом оптической микроскопии можно визуализировать и проводить микроманипуляции с отдельными везикулами GUV, часто используемыми из-за большого размера в качестве мембранных модельных систем [19].

Из-за небольшого предельного разрешения (~250 нм) световые микроскопы неспособны предоставить подробную информацию о структуре малых однослойных везикул (SUV) и их ламеллярности [2], позволяя получить значительную информацию лишь о гигантских однослойных везикулах (GUV), диаметр которых варьируется от одного до сотен микрометров [20]. Для получения большей информации о трехмерной структуре и ламеллярности везикул возможно включение флуоресцентных зондов, применение методов поляризации и конфокальной микроскопии высокого разрешения [20].

Поляризационная микроскопия

Этот тип световой микроскопии основан на способности поляризованного света взаимодействовать с поляризующимися связями упорядоченных молекул [21]. Повышенное поглощение света происходит, когда молекулярные диполи в образце выравниваются по вектору поляризации падающей световой волны, что приводит к разнице фаз между выборочными световыми лучами и, в свою очередь, к интерференционно-зависимым изменениям амплитуды в плоскости изображения [21]. Контраст изображения в этом случае возникает не только из-за эффектов интерференции и дифракции, но и из-за наличия упорядоченного расположения молекул [21]. Метод используется для изучения формы и динамики многих упорядоченных клеточных структур, включая липидные бислои плазматических мембран [2, 21], изображения получают как в монохромном, так и в цветном испол-

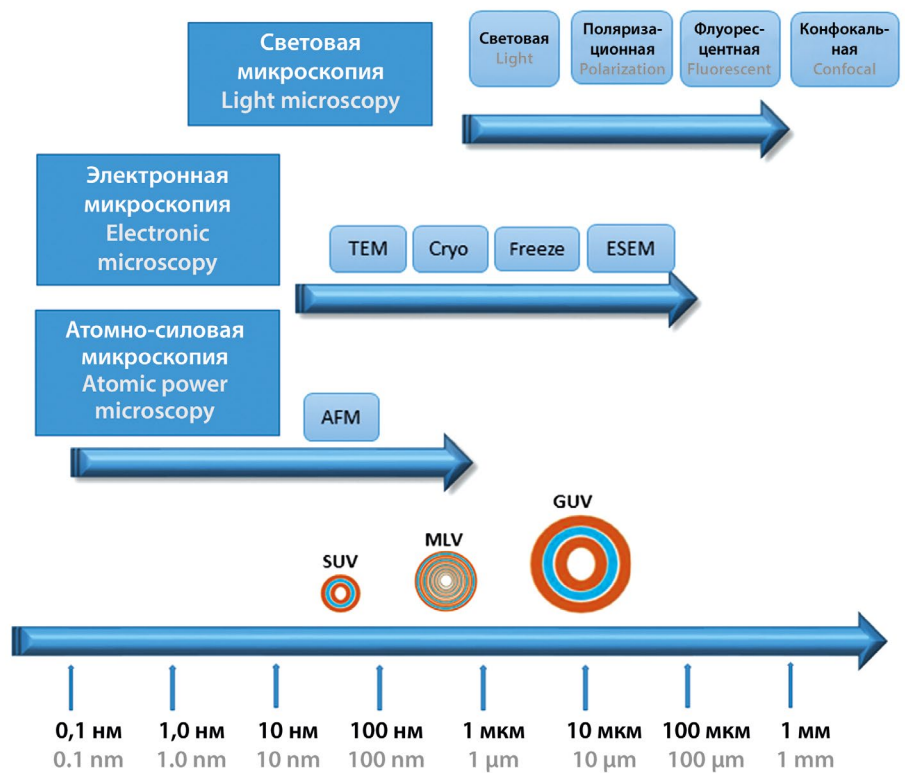


Рисунок 1. Микроскопические методы визуализации липосом
Figure 1. Microscopic techniques for visualizing liposomes

нении. Метод является альтернативным способом визуализации липосом, особенно для подтверждения образования везикул, однако он не дает убедительных данных относительно характеристик двухслойности или ламеллярности везикул [2] и не обеспечивает четких изображений частиц в нанометровом диапазоне: оптимальную прозрачность имеют крупные везикулы микрометрового диапазона, то есть поляризационная микроскопия также ограничена размером везикул, которые можно визуализировать.

Таблица 1. Современные методы визуализации липосом
Table 1. Current methods for visualizing liposomes

Метод микроскопии Microscopy method	Преимущества метода Advantages	Ограничения Limitations	Источник Reference
Световая (оптическая) Light (optical)	Быстрый и простой. Дает общую информацию о размере, форме, однородности и степени агрегации. Лучше всего подходит для GUVs Fast and simple. Gives general information about size, shape, uniformity and degree of aggregation. Best suited for GUVs	Не позволяет получить исчерпывающую информацию о липидном бислое, особенно для SUVs Does not provide comprehensive information about the lipid bilayer, especially for SUVs	[2, 3]
Поляризационная Polarization	Альтернативный метод подтверждения образования везикул. Оптимальная прозрачность для крупных везикул микронного диапазона An alternative method to confirm vesicle formation. Optimal transparency for large vesicles in the micron range	Не позволяет получить убедительные данные, подтверждающие бислоичность или пластинчатость везикул Does not provide convincing data confirming the bilayer or lamellar nature of vesicles	[2]

Продолжение таблицы 1

Метод микроскопии Microscopy method	Преимущества метода Advantages	Ограничения Limitations	Источник Reference
Флуоресцентная Fluorescent	Особенно подходит для визуализации GUVs для получения информации о форме, размере и текучести липидных везикул. Можно применять несколько зондов в образце для получения информации о структуре мембраны Particularly suitable for imaging GUVs to obtain information about the shape, size and fluidity of lipid vesicles. Multiple probes can be used in a sample to obtain information about membrane structure	Добавление зондов и красителей может влиять на свойства липидных везикул и/или вызывать появление экспериментальных артефактов, что может привести к неточной интерпретации данных. Фотоиндуцированное перекисное окисление липидов может привести к образованию доменов. Длительное воздействие флуоресцентного света может вызвать обесцвечивание и потерю интенсивности флуоресценции The addition of probes and dyes may affect the properties of lipid vesicles and/or introduce experimental artifacts, which may lead to inaccurate interpretation of the data. Photoinduced lipid peroxidation can lead to the formation of domains. Prolonged exposure to fluorescent light may cause discoloration and loss of fluorescent intensity	[2, 4, 5]
Конфокальная Confocal	Превосходная четкость изображения по сравнению с флуоресцентной микроскопией. Может предоставить составное 3D-изображение образца. Визуализация внутренней структуры липидных везикул, особенно GUVs Superior image clarity compared to fluorescence microscopy. Can provide a composite 3D image of the sample. Visualization of the internal structure of lipid vesicles, especially GUVs	Невозможность визуализации с высоким разрешением SUVs или олиголамеллярных липосом Inability to visualize SUVs or oligolamellar liposomes with high resolution	[2, 6, 7]
Сканирующая электронная (SEM) Scanning Electronic (SEM)	Визуализация мелких везикул при очень большом увеличении. Общая информация о размере и сферической морфологии липидных везикул Visualization of small vesicles at very high magnification. General information on the size and spherical morphology of lipid vesicles	Невозможность получения подробной информации о ламеллярности и внутренней структуре липидных везикул. Структура липосом может подвергаться изменениям из-за условий глубокого вакуума и окрашивания частиц перед визуализацией The inability to obtain detailed information about the lamellarity and internal structure of lipid vesicles. Liposome structure may be subject to changes due to high vacuum conditions and particle staining prior to imaging	[7, 8]

Продолжение таблицы 1

Метод микроскопии Microscopy method	Преимущества метода Advantages	Ограничения Limitations	Источник Reference
Просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия. Метод негативного окрашивания Transmission (transmission) electron microscopy. Negative staining method	Обеспечивает гораздо большее увеличение для визуализации везикул, в том числе SUVs. Предоставляет информацию о морфологии, распределении размеров, однородности и структуре поверхности Provides much higher magnification for visualization of vesicles, including SUVs. Provides information on morphology, size distribution, uniformity and surface structure	Везикулы находятся в непосредственном контакте с сеткой, что может повлиять на их ориентацию и морфологию. Помещение образца в вакуум может привести к дальнейшему обезвоживанию образца. Пробоподготовка может вызвать изменения исходной структуры липосом и привести к созданию светлых и темных полос, которые ошибочно можно принять за ламеллярные структуры Vesicles are in direct contact with the mesh, which can affect their orientation and morphology. Placing the sample in a vacuum may cause further dehydration of the sample. Sample preparation can cause changes in the initial structure of liposomes and lead to the creation of light and dark bands that can be mistaken for lamellar structures	[2, 7]
Криоэлектронная Cryoelectronic	Наиболее удобная и доступная форма микроскопии. Позволяет анализировать липосомы в их нативном состоянии. Нет проблем с химической фиксацией, обезвоживанием, разрезанием и окрашиванием. Предоставляет подробную информацию о размере, форме, внутренней структуре и пластинчатости липосом. Пробоподготовка сводится к минимуму образования кристаллов льда и сохранения белков или других материалов. Диапазон разрешения от ~5 до 500 нм в зависимости от толщины пленки The most convenient and accessible form of microscopy. Allows analysis of liposomes in their native state. There are no problems with chemical fixation, dehydration, cutting and dyeing. Provides detailed information about the size, shape, internal structure and lamellarity of liposomes. Sample preparation minimizes the formation of ice crystals and preservation of proteins or other materials. Resolution range from ~5 to 500 nm depending on film thickness	Используются меньшие дозы электронов, что может привести к более низкому разрешению по сравнению с другими методами ТЕМ. Артефакты возможны из-за образования тонкой пленки аморфного льда и использования блоттинга на образце, применяющего сдвиговые усилия во время формирования пленки Lower electron doses are used, which may result in lower resolution compared to other TEM techniques. Artifacts are possible due to the formation of a thin film of amorphous ice and the use of blotting on the sample, applying shear forces during film formation	[9, 10, 11]

Окончание таблицы 1

Метод микроскопии Microscopy method	Преимущества метода Advantages	Ограничения Limitations	Источник Reference
Электронная микроскопия с замораживанием и разрушением Freeze-disruption electron microscopy	Обеспечивает большее увеличение наночастиц, в том числе SUVs. Нет процесса сушки. Подробная информация о трехмерной структуре везикул и двухслойной организации липосом. Реплики точно отражают исходное нативное состояние образца Provides a greater increase in nanoparticles, including SUVs. No drying process. Details of the three-dimensional structure of vesicles and bilayer organization of liposomes. Replicas accurately reflect the original native state of the sample	Во время подготовки в образце могут возникать артефакты из-за недостаточной скорости замораживания, повторного осаждения молекул растворителя и/или механического напряжения	[2, 12, 13]
Средовая сканирующая электронная (ESEM) Environmental Scanning Electronic (ESEM)	Визуализация мелких пузырьков при большом увеличении. Получение общей информации о размере и форме липосом. Отображение динамических изменений влажных систем без предварительной пробоподготовки. Не требуется использование фиксации, окрашивания или замораживания везикул. Возможность изменения среды пробы, включая давление, температуру и состав газа Visualization of small bubbles at high magnification. Obtaining general information about the size and shape of liposomes. Display dynamic changes in wet systems without prior sample preparation. No fixation, staining or freezing required vesicles. Ability to change sample environment, including pressure, temperature and gas composition	Невозможность получения подробной информации о внутренней структуре липидных везикул	[2, 7, 14]
Атомно-силовая Atomic power	Высокое разрешение. Обеспечение 3D-изображения липосом и подробной информации о морфологии, распределении размеров, однородности, стабильности и структуре поверхности. Не требует работы в вакууме, возможность работы в окружающем воздухе или под жидкостью. Получение информации о механических и химических свойствах поверхности образца посредством измерения силы High resolution. Providing 3D images of liposomes and detailed information on morphology, size distribution, uniformity, stability and surface structure. Does not require operation in a vacuum, the ability to work in ambient air or under liquid. Obtaining information about the mechanical and chemical properties of a sample surface through force measurements	Требуется адсорбция наночастиц на опорных поверхностях, что может изменить размер и форму везикул. Периодический контакт кончика зонда может привести к перетаскиванию липосом при их движении по везикулам в образце	[15–17]

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная или «эпифлуоресцентная» микроскопия – особая форма световой микроскопии, в которой используется способность флуорохромов излучать свет после его поглощения [22]. Метод широко используется в биофизике для получения информации о структуре и динамике компонентов мембран [4]. В таких исследованиях для визуализации структуры исследуемых мембран в них внедряют флуоресцентные зонды. На рынке представлен большой ассортимент флуоресцентных красителей с различными свойствами. Например, некоторые флуоресцентные красители рассчитаны на определенную мембранную среду с различным расположением и латеральной упаковкой [4]. Для получения информации о самой структуре мембраны можно одновременно применять несколько флуоресцентных зондов в образце, помещая их как в водный слой, так и в липидный бислой липосом [2]. Такое расположение может быть полезно при просмотре GUVs для получения информации о форме, размере и текучести липидных везикул [4, 5]. Для визуализации ламеллярности липосом можно также непосредственно в липидный бислой включать зонды, такие как липиды, меченные родамином [2].

Недостатком флуоресцентной микроскопии является то, что добавление зондов и красителей к мембранной системе может влиять на свойства липосомальной системы доставки [2, 4, 22], вызывать значительные изменения в мембране хозяина и/или появление экспериментальных артефактов и тем самым приводить к неточной интерпретации данных [4]. Однако низкие концентрации флуоресцентного красителя (<1 моль%), как было показано, не оказывали существенного влияния на физические свойства мембраны [4]. В то же время длительное воздействие флуоресцентного света может привести к обесцвечиванию и потере интенсивности флуоресценции. Поэтому выбор красителя и разработка новых мембранных зондов являются важными факторами при использовании флуоресцентной микроскопии [5].

Вместе с тем физико-химическое зондирование может быть применено при оценке качества и стандартности приготовления образцов липосом.

Конфокальная микроскопия

Конфокальная сканирующая микроскопия стала достижением в области флуоресцентной микроскопии. Вместо освещения всего образца изображение строится путем сканирования одного (или нескольких) сфокусированных лучей света по образцу. Свет, возвращающийся от освещенного объекта, проходит через апертуру, которая отсекает расфокусированный свет сверху и снизу интересующей плоскости, гарантируя получение изображений только с небольшой глубиной резкости, что значительно улучшает

разрешение вне плоскости [2, 23]. При этом собирается «z-стопка» изображений, начиная с верхней части везикулы, за которыми следуют изображения, сделанные с определенными z-приращениями до нижней части образца, в результате получается его составное трехмерное изображение [2, 23]. Конфокальная сканирующая микроскопия более предпочтительна по сравнению с эпифлуоресцентной благодаря лучшей четкости изображения. В случае GUVs метод способен визуализировать внутреннюю структуру липидных систем, что зачастую невозможно при использовании других методов микроскопии [6, 7]. Однако конфокальная микроскопия по-прежнему ограничена дифракцией и, следовательно, не может создавать высокой четкости изображения SUVs или олигомеллярных липосом [7].

Методы электронной микроскопии

Электронная микроскопия – метод визуализации везикул при очень большом увеличении [24, 25]. Широко используется для характеристики липидных везикул, поскольку длина волны электронов (и, следовательно, разрешение, ограниченное дифракцией) на много порядков ниже, чем у оптической микроскопии, и, следовательно, обеспечивает сверхразрешение для четкой визуализации небольших липосом [2, 7]. При этом используется пучок электронов, фокусируемый на поверхности объекта с помощью различных электромагнитных линз. Электроны рассеиваются образцом, а затем перефокусируются и увеличиваются с помощью следующей серии электромагнитных линз в колонне визуализации для создания проецируемого изображения [24]. Существует несколько различных типов электронных микроскопов, каждый из которых требует своей пробоподготовки.

Сканирующая электронная микроскопия (SEM)

Метод сканирующей электронной микроскопии является электронно-оптическим методом наблюдения (визуализации) и исследования изображений поверхности, а также получения информации о составе и некоторых других свойствах испытуемых образцов веществ¹. По сравнению с традиционной оптической (световой) микроскопией² SEM позволяет исследовать испытуемые образцы при более высоких увеличениях (например, 250 000х по сравнению с увеличением 1000х в оптической микроскопии), с большим разрешением по плоскости

¹ ОФС.1.2.1.0001 «Сканирующая электронная микроскопия». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/skaniruyushchaya-elektronnaya-mikroskopiya/> Ссылка активна на 29.08.2024.

² ОФС.1.2.1.0009 «Оптическая микроскопия». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/opticheskaya-mikroskopiya/> Ссылка активна на 29.08.2024.

(например, 3 нм или больше по сравнению с примерно 200 нм в оптической микроскопии), а также с большей глубиной резкости. Adler et Schiemann в 1984 г. впервые попытались использовать SEM для характеристики липосом [26]. Они установили, что применение метода сублимационной сушки для подготовки образцов липосом для SEM привело к образованию большого количества видимых комков и коркового материала [26]. Более поздние исследования показали, что сама структура липосом может подвергаться изменениям из-за условий глубокого вакуума и процессов окрашивания, необходимых для этого метода [7]. Поэтому в настоящее время для анализа липосом SEM, как правило, не используется [7]. Однако с его помощью можно получить общую информацию о структуре различных липидных слоев, о размере и морфологии препарата [8].

Просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия (ТЕМ)

Просвечивающая электронная микроскопия – наиболее часто используемый метод визуализации для оценки структуры наночастиц [24, 27]. Он предполагает подготовку тонкого образца (толщиной <100 нм), который помещается в вакуумную камеру. Электронный луч пересекает образец, фокусируется и формирует изображение. ТЕМ может легко отображать мягкие образцы с пространственным разрешением размером значительно ниже 1 нм [7, 12, 24].

Метод можно классифицировать в зависимости от используемого способа пробоподготовки: отрицательное окрашивание, замораживание и разрушение, криогенная ТЕМ. Он может предоставить информацию о поверхностных модификациях наночастиц, так как обеспечивает лучший контраст и контур изображений по сравнению с другими методами микроскопии. Например, конъюгация трансферрина с поверхностью липосом DSPC/холестерина показала образование на поверхности частиц покрытия с негативным окрашиванием ТЕМ, которое отсутствовало в препаратах неконъюгированных липосом [28]. В другом эксперименте перед процедурой негативного окрашивания были добавлены специфические антитела, выработанные против трансферрина человека, для подтверждения идентичности поверхностного покрытия частиц [28]. Таким образом, ТЕМ позволяет добиться значительного улучшения разрешения при оценке конъюгации лигандов с поверхностью липосом.

Техника негативного окрашивания

При проведении ТЕМ с негативным окрашиванием пробоподготовка включает в себя помещение небольшого количества гидратированного образца на сетку. При этом следует учитывать, что, поскольку везикулы находятся в непосредственном контакте с сеткой, их ориентация и морфология могут меняться [2]. Для

обеспечения высокого контраста при рассматривании везикул на темном фоне необходимо внедрить липосомы в подходящий электронно-плотный материал (например, соли тяжелых металлов, такие как уранилацетат или фосфорновольфрамовая кислота) [7]. Техника негативного окрашивания относительно быстрая и простая, однако может вызывать изменение исходной структуры липосом, приводить к образованию светлых и темных полос, которые ошибочно принимаются за ламеллярные структуры [2, 7]. Кроме того, помещение образца под вакуум приводит к дальнейшему его обезвоживанию и вновь может вызвать изменения в структуре везикул [2]. Хотя метод ТЕМ с негативным окрашиванием обеспечивает гораздо большее увеличение для визуализации наночастиц, повреждение структуры липосом затрудняет точную оценку их морфологических характеристик. Поэтому для подтверждения результатов обычно требуются другие методы визуализации.

Криоэлектронная микроскопия (Крио-ТЕМ)

Криогенная ТЕМ (крио-ТЕМ) представляет собой разновидность ТЕМ, в которой перед визуализацией используются тонкие водные гидратированные пленки, остеклованные в жидком этане. Метод позволяет анализировать липосомы в наиболее нативном состоянии и является ценным инструментом для определения их размера, формы, внутренней структуры и ламеллярности. В зависимости от толщины образца можно добиться разрешения до 5 нм [25]. Основным преимуществом быстрого замораживания образцов липосом является минимизация образования кристаллов льда и сохранение белков, мРНК и других материалов [2, 12, 29], что актуально, когда белки или ДНК инкапсулированы внутри наночастиц [12]. Крио-ТЕМ позволяет избежать проблем с химической фиксацией, обезвоживанием, разрезанием и окрашиванием, которые могут повлиять на морфологию везикул [2]. С помощью данного метода можно отследить влияние мольного соотношения активной молекулы и липидов на морфологию везикул. Так, в работе [9] при мольном соотношении 0,05 липосомы ожидаемо напоминали по форме кофейные зерна с нанокристаллом доксорубина внутри, а при увеличении соотношения (0,37) обнаруживались даже треугольные структуры, в которых три нанокристалла доксорубина образовывали правильный треугольник в пределах одной липосомы. В работе [10] о включении винкристина, винбластина и винорелбина во внутреннюю полость липосом судили по увеличенной электронной плотности внутренней полости липосом по сравнению с изображениями контрольных незагруженных везикул. В лаборатории Y. Varenholz по криоэлектронным 2D-микрофотографиям предложен подход к реконструкции 3D-структуры липосом [11], который позволяет получать дополнительную информацию о распределении препарата в везикулах.

Электронная микроскопия с замораживанием и разрушением

Метод замораживания и разрушения не требует процесса сушки и может предоставить дополнительную информацию о внутренней структуре наночастиц [12]. Предполагается размещение образца на сетке TEM, зажатой между двумя медными или золотыми держателями. Образец остекловывается путем быстрого замораживания жидким пропаном или жидким азотом, а затем разрушается по областям образца со слабыми молекулярными взаимодействиями. Поверхность излома можно дополнительно протравить и затенить тонким слоем платины или углерода для создания «негативной» копии плоскости образца излома. Перед визуализацией реплику очищают органическим растворителем. Реплики стабильны, их можно сохранить и просмотреть позже [12]. Основным преимуществом метода является то, что реплики точно отражают нативное состояние образца и позволяют получить подробную информацию о трехмерной структуре везикул и двухслойной организации: мультислойную конструкцию и двухслойную упаковку мультислойных везикул [2, 12, 13]. Метод позволяет также оценить размер агрегатов и полезен для изучения взаимодействия катионных липосом с ДНК [2]. Однако во время подготовки из-за недостаточной скорости замораживания, повторного осаждения молекул растворителя и/или механического напряжения в образце все равно могут возникать артефакты. Например, на SUVs из выборки может возникнуть «эффект ряби» [2], которая является обычной бислойной деформацией, возникающей из-за беспорядка в переходах ацильных цепей перед замораживанием. Кроме этого, вызывать «рябь» может и инкубация везикул между температурой, предшествующей переходу, и фактической температурой перехода [2]. Данный факт можно использовать для получения информации о фазовых переходах, происходящих при использовании для липосомальных препаратов липидов различной природы [2].

Средовая сканирующая электронная микроскопия

Средовая сканирующая электронная микроскопия (ESEM) дает возможность визуализировать липосому в ее гидратированном состоянии без предварительной подготовки образца. Y. Perrie et al. первыми применили ESEM для изучения липосом и смогли в режиме реального времени динамически следить за гидратацией липидных пленок и изменениями в суспензиях липосом по мере конденсации воды на образце или испарения. Было получено представление об устойчивости липосом к слиянию во время обезвоживания и альтернативный анализ состава и стабильности липосом [14]. Особенностью ESEM является наличие водяного пара в камере микроскопа. Под-

держка содержащей воду атмосферы вокруг образца обусловлена использованием многоапертурной градуированной вакуумной системы, позволяющей камере визуализации создавать давление до 55 гПа [2, 7, 14]. Первичный электронный луч может генерировать вторичные электроны, которые сталкиваются с молекулами пара, что приводит к каскадному усилению сигнала до достижения им детектора.

Метод широко применяется для оценки стабильности липосом, для анализа загрузки ЛС в их бислой [30], а также для определения размера и формы везикул. Однако ESEM не позволяет получить подробную информацию о ламеллярности и внутреннем строении наноразмерных структур [7].

Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия (Atomic force microscopy, AFM), также известная как сканирующая силовая микроскопия (Scanning-force microscopy, SFM), представляет собой разновидность метода сканирующей зондовой микроскопии, которая осуществляется путем проведения острого наконечника, прикрепленного к кантилеверу и датчику, по поверхности образца и измерения поверхностных сил между ним и зондом [31, 32]. При движении по поверхности кантилевер перемещается вверх и вниз, то есть отклоняется, что измеряется количественно с помощью оптического датчика [31]. AFM используют для изображения биологических образцов, а также наночастиц, метод не требует работы в вакууме и может применяться в окружающем воздухе или под жидкостью [32]. AFM имеет разрешение порядка долей нанометра и может обеспечить трехмерное изображение липосом вместе с подробной информацией о морфологии, распределении по размерам, однородности и стабильности [32]. В работе [15] показана применимость метода для 3D-анализа популяции липосом, загруженных доксорубицином: везикулы с наибольшими кристаллами доксорубицина приобретали вытянутую форму; данные подтверждали методом криоэлектронной микроскопии. AFM можно использовать и для характеристики поверхностных модификаций липосом и обнаружения лигандов (например, антител и полимеров), конъюгированных с липосомальной поверхностью. AFM позволяет также получить информацию о механических и химических свойствах поверхности образца [16]. Одним из ограничений AFM является необходимость адсорбции наночастиц на опорных поверхностях, таких как слюдяные или кремниевые пластины, что может изменить размер и форму везикул и вызвать их уплощение [16], кроме этого, периодический контакт кончика зонда может приводить к перетаскиванию липосом по подложке. К тому же наконечник кантилевера не может заглянуть под липосому. Несмотря на это, AFM остается полезным инструментом для оценки липосом [17].

ФАРМАКОКИНЕТИКА И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Биологическая эффективность ЛС, доставляемых в липосомах, зависит от фармакокинетических параметров липосом (абсорбции, распределения, метаболизма и выведения). Как правило, судьба инкапсулированной ЛС определяется физико-химическими особенностями липосом; однако, как только ЛС высвобождается, ее судьба определяется свойствами самой молекулы [33].

Взаимодействие липосом с системами *in vivo* чрезвычайно сложно. При оценке фармакокинетики обычно рассчитывают максимальную концентрацию ЛС (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (t_{max}), площадь под кривой «концентрация – время» (AUC_{plasma}), время удерживания ЛС в организме (MRT) и др. На фармакокинетический профиль липосомальных лекарственных форм влияют различные физико-химические свойства, включая природу ЛС, ее дозировку, липидный состав, размер липосом, зета-потенциал, стерическую стабилизацию и способ введения [34]. Несмотря на то, что основным путем введения липосомальных препаратов является внутривенный, проводятся исследования с липосомами для внутриглазного [35], внутримышечного [36], ингаляционного [37], интраназального [38], перорального [29], трансдермального [39] и подкожного [40] введения. Рассмотрим некоторые особенности фармакокинетики липосом в зависимости от вышеперечисленных факторов.

При оценке эффективности липосом для доставки ЛС в мозг после интраназального введения рекомендуются показатели эффективности нацеливания лекарственного средства (DTE), процент транспорта лекарственного средства (DTP), BIN/IV и RB, которые рассчитывают по следующим формулам [38]:

$$DTE = \frac{(AUC_{brain, IN}) / (AUC_{plasma, IN})}{(AUC_{brain, IV}) / (AUC_{plasma, IV})},$$

$$DTP = \frac{AUC_{brain, IN} - \frac{AUC_{brain, IV}}{AUC_{plasma, IV}} \cdot AUC_{plasma, IN}}{AUC_{brain, IN}} = 1 - \frac{1}{DTE} = 1 - \frac{100}{DTE\%},$$

$$B_{IN/IN} = \frac{AUC_{brain, IN}}{AUC_{brain, IV}},$$

$$RB = \frac{AUC_{brain, liposomes} (IN)}{AUC_{brain, free drug} (IN)},$$

где $AUC_{brain, liposomes}$ – площадь под кривой «концентрация – время» в тканях мозга после интраназального (IN) или внутривенного (IV) введения; BIN/IV – биодоступность препарата в тканях мозга после IN-введения по сравнению с IV-введением; RB – био-

доступность липосомального препарата по сравнению со свободным препаратом в тканях мозга после IN-введения.

DTE используется для оценки того, нацеливаются ли липосомы после интраназального введения на мозг лучше, чем свободные препараты или липосомы после внутривенного введения. $DTE\% > 100$ указывает на эффективное нацеливание на мозг. Значения DTP указывают долю (или процент) препаратов, поступающих в мозг через обонятельный и тройничный пути. DTP% варьируется от 0 до 100. $DTP = 0\%$ предполагает отсутствие доставки из носа в мозг прямым путем, тогда как $DTP = 100\%$ указывает на отсутствие проникновения препарата через ГЭБ. Более высокие значения DTE и DTP для интраназальных липосом, чем для растворов ЛС после интраназального введения, указывают на эффективность липосом для доставки ЛС в мозг [41]. В некоторых исследованиях липосомы после интраназального введения имели высокие значения DTE и DTP, что указывает на доставку ЛС в мозг, например $DTE = 2903\text{--}3870\%$ и $DTP = 95,6\text{--}97,4\%$ для липосом, нагруженных байкалином [42], и $DTE = 302,22\%$ и $DTP = 63,66\%$ для липосом, нагруженных цикловиробуксином D [43].

Фармакокинетические исследования на крысах показали, что инкапсуляция эксендина-4, модифицированного пальмитиновой кислотой в мультивезикулярные липосомы, приводила к повышению стабильности ЛС и замедлению периода полувыведения ЛС с 2,4 ч до 77,3 ч после однократной внутримышечной инъекции. Стабильная концентрация ЛС в плазме поддерживалась в течение 168 ч, а относительная биодоступность была 664,18% [36].

Липосомы с сальвианоловой кислотой B, состоящие из насыщенных нейтральных и анионных фосфолипидов, обладали повышенной проницаемостью по сравнению с липосомами, состоящими из ненасыщенных фосфолипидов и катионных фосфолипидов, после ингаляционного введения мышам. В группе мышей, леченных липосомами, AUC_{0-t} были в 2,4 раза выше, чем в группе, получавшей сальвианоловую кислоту B [37].

Липосомы считаются перспективными системами доставки лекарств в легкие благодаря их способности повышать растворимость плохо растворимых в воде ЛС, замедленному высвобождению, длительному времени циркуляции, специфичности, биосовместимости и стабильности [44]. Использование липосом для доставки лекарств в легкие может значительно увеличить время пребывания препарата в легких, одновременно снижая клиренс. Прямая инстилляция ПЭГилированных липосом с нинтеданибом в легкие мышей увеличивает доставку ЛС в 8000 раз, а период полувыведения из легких – в десять раз по сравнению с пероральным нинтеданибом [45].

Роговой слой функционирует как основной путь для внутриглазной абсорбции. Он служит сильным барьером, препятствующим абсорбции как липо-

фильных, так и гидрофильных молекул для доставки ЛС. Недостаточная абсорбция роговицей и ограниченное удержание в глазу являются основными проблемами, связанными с обычными формулами для местного глазного применения. Липосомы с гидрохлоридом берберина и хризифанолом, покрытые полиамидаминовым дендримером PAMAM G3.0, продемонстрировали значительную клеточную проницаемость в эпителиальных клетках роговицы человека и улучшенную биоадгезию на эпителии роговицы кролика. Липосомы значительно улучшили биодоступность берберина и оказали защитные эффекты в пигментных эпителиальных клетках сетчатки человека и сетчатке крыс после фотоокислительного повреждения сетчатки [46]. Липосомы, состоящие из 63 моль% фосфолипида и 37 моль% холестерина, содержащие дексаметазон и антибиотик моксифлоксацин, обеспечивали дифференциальное высвобождение ЛС (быстрое высвобождение антибиотика и медленное высвобождение стероида в течение 1 дня) в эксперименте на склеральных тканях глаз кролика [35].

Липосомы, состоящие из фосфатидилхолина, холестерина и левотетрагидропальматина в соотношении 10:1:3, включали в гель и наносили на кожу крыс. После трансдермального нанесения максимальная концентрация (C_{max}) левотетрагидропальматина (ЛТП) из липосомального геля составила 0,16 мкг/мл, а время достижения этой максимальной концентрации (t_{max}) – 1,2 ч. Относительная биодоступность ЛТП в липосомальном геле составила 233,8% по сравнению с эмульсией [47]. Трансферосомы из яичного лецитина Phospholipon® 90G и полидоканол Brij-35®, загруженные бензтропина мезилатом (БЗМ), полученные методом тонкопленочной гидратации, по сравнению с водным раствором БЗМ продемонстрировали значительное увеличение трансдермального проникновения в исследовании *ex vivo* на изолированной коже крысы. По сравнению с внутривенным и пероральным введением фармакокинетические исследования *in vivo* на крысах Wistar после трансдермальной аппликации геля с трансферосомами показали увеличение AUC, T_{max} и MRT в 1,5–2 раза, 5–10 раз и 5–15 раз соответственно, а также более высокое и продолжительное высвобождение БЗМ из гелевых формул, загруженных трансферосомами [48].

Терапия нуклеиновыми кислотами открывает большие возможности для профилактики и лечения различных заболеваний [49]. Однако существует ряд проблем: доставка функциональной нуклеиновой кислоты к целевой ткани без деградации в биологических жидкостях и защита мРНК от быстрого поглощения. Подавляющее большинство липосомальных препаратов вводят парентерально, поскольку пероральное введение ограничено деградацией и дестабилизацией активных ингредиентов из-за низкого pH в желудке, а также ферментов в желудочно-кишечном тракте, что приводит к незначительной перораль-

ной биодоступности. Тем не менее пероральный путь введения остается наиболее предпочтительным для пациентов. Пероральная доставка нуклеиновых кислот затруднена в связи с их незначительной пероральной биодоступностью. При пероральном введении возникает стерический барьер – слой слизи, которая представляет собой вязкий слой, выстилающий весь ЖКТ. Этот барьер ограничивает пероральную доставку макромолекулярных препаратов. Он состоит из покрытого протеогликанами белка муцина, секретлируемого бокаловидными клетками эпителия ЖКТ [50]. Он обновляется с высокой скоростью и является частью иммунитета слизистой оболочки, улавливая и удаляя инородные структуры до того, как они смогут достичь подлежащего эпителия. Этот процесс называется клиренсом слизистой оболочки и еще больше снижает пероральную биодоступность ЛС [51]. Для проникновения липосом через слизистую их покрывают гидрофильными или катионными олигомерами или полимерами, предпочтительно проникающими в клетку пептидами (cell-penetrating peptides, CPP). Для пероральной доставки мРНК предпочтительна модификация поверхности липосом циклическим CPP, богатым аргинином, благодаря повышенной стабильности циклических CPP по сравнению с линейными в желудочно-кишечных жидкостях [29].

Биораспределение

Липосомальное биораспределение, то есть распространение липосом по всему организму (часто в легких, почках, печени, селезенке, желудке, кишечнике, мозге), может быть изменено за счет включения в них различных молекулярных компонентов.

Липосомы привлекли внимание в области доставки ЛС от рака благодаря способности доставлять токсичные вещества к опухолевым клеткам. Накоплению липосом внутри опухоли способствует эффект повышенной проницаемости и удержания (ЭПР). Предполагается, что эффект ЭПР является результатом неплотной сосудистой сети и нарушения лимфатической системы в опухолях. Накопление ЛС в раковых клетках за счет эффекта ЭПР усиливается липосомами с пролонгированным действием. Так, в работе [52] показано, что эндотрахеальное введение липосомального рифабутина крысам привело не только к повышению концентрации действующего вещества в месте введения (в легких) по сравнению с введением чистого рифабутина, но и к многократному увеличению его относительной биодоступности, периода полувыведения и среднего времени удержания. Интраназальное введение ривастигмина кроликам показало увеличение биодоступности ЛС в тканях мозга в 10 раз по сравнению с субстанцией [53]. Ряд авторов наблюдали более медленное появление препаратов в крови после внутрибрюшинного и подкожного введения липосом по сравнению с внутривенным [54].

На накопление липосом в опухоли влияют также размер липосом [55], эластичность [56] и поверхностный заряд [57]. Эластичность липосом модифицируется за счет включения холестерина, поверхностно-активных веществ и липидов с различной длиной ацильной цепи и степенью насыщения. Установлена обратная зависимость накопления липосом в опухолях от модуля Юнга [56]. Модуляция поверхностного заряда липосом показала более значительное накопление анионных липосом внутри опухолей по сравнению с их катионными или нейтральными аналогами [58]. С целью повышения накопления липосом в опухоли исследовались способы модификации их поверхности, такие как конъюгация пептидов или антител, для обеспечения нацеливания на сверхэкспрессированные рецепторы больных клеток [59].

Установлено, что липосомы могут взаимодействовать с белками плазмы, тем самым оказывая влияние на их судьбу *in vivo*, либо на их стабильность, либо модулируя их последующее взаимодействие с клетками-мишенями [60]. Взаимодействие с белками плазмы может извлекать или заменять липиды из носителя, нарушая его целостность. Медиаторы клиренса включают опсонины белков плазмы, фибронектин, С-реактивный белок (CRP), фрагмент компонента C3b, β 2-гликопротеин I или Fc-часть иммуноглобулина G (IgG). Опсонизация может поставить под угрозу стабильность липосом и способствовать эндцитозу или фагоцитозу макрофагов РЭС. Почечная экскреция может представлять собой значительную часть общего клиренса наночастиц диаметром <4–8 нм, но не влияет на клиренс большинства липосомальных составов (>30 нм) [61].

Способность липосом напрямую взаимодействовать с поверхностями конъюнктивы и роговицы представляет собой важное, заметное преимущество. Эффективность липосомальных форм зависит от процента загрузки ЛС, морфологии и заряда липосом, распределения ЛС в липосоме, стабильности липосом в тканях глаза и конъюнктивальном мешке, а также их сродства к поверхности роговицы и скорости высвобождения ЛС из лекарственной формы [34]. При нанесении липосом на слизистую глаз положительно заряженные липосомы, как правило, лучше удерживаются на поверхности роговицы, которая имеет отрицательный заряд. Кроме того, положительно заряженные носители замедляют выведение ЛС со слезной жидкостью за счет повышения вязкости раствора и взаимодействия с отрицательно заряженной слезой [62]. При интравитреальной инъекции анионные ПЭГилированные липосомы размера ~50 нм обладают превосходным распределением и проникновением в клетки сетчатки, в то время как липосомы размером >100 нм не преодолевали витреоретинальный барьер [63]. Липосомы, загруженные дексаметазоном и моксифлоксацином,

в эксперименте на склеральных тканях глаз кролика обеспечивали увеличение времени трансклерального контакта, но сохранили эффективную проницаемость и накопление обоих ЛС от эписклеральной до интраокулярной стороны глаз [35].

Накопление липосом, нацеленных на мозг, должно увеличиваться в мозге и уменьшаться в других нецелевых органах после введения. Успешная доставка в мозг катионных липосом, содержащих мРНК, меченные зеленым флуоресцентным белком GFP и мРНК люциферазы, после интраназального введения была подтверждена флуоресценцией GFP [64].

Было показано, что легочный сурфактант не лизирует и не агрегирует липосомы после ингаляционного введения. Каждый отдел легкого (альвеолярная жидкость, альвеолярные лейкоциты и паренхима) элюирует липосомы в течение 24 ч, вероятно выступая в качестве «депо лекарств». После осаждения в слое сурфактанта липосомы в течение 3–6 ч переносятся в альвеолярные лейкоциты (которые поглощают 1–5 % от общей дозы, введенной в легкие) ненасыщаемым образом. Далее все клеточные слои паренхимы легких поглощают липосомы [45].

Важными преимуществами трансдермальной доставки ЛС являются обход метаболизма первого порядка, нестабильности в желудочно-кишечном тракте и хорошая комплаентность пациентов. Липосомы могут транспортироваться через слои кожи тремя различными путями: трансэпидермальным путем, межклеточным путем и внутриклеточным путем. Роговой слой обычно имеет толщину от 15 до 20 мкм и является гидрофобным, тогда как второй эпидермальный слой, зернистый слой, характеризуется плотными клеточными соединениями. Наличие этих двух слоев создает барьер, который ограничивает способность к проникновению высокомолекулярных гидрофильных частиц (превышающих 500 кДа) в более глубокие дермальные слои кожи. Второй слой кожи под эпидермисом – дерма, состоящая из нескольких подслоев и охватывающая различные придатки, такие как волосные фолликулы, кровь, потовые железы, лимфа и нервы [65]. Для улучшения проникновения через кожу необходимо уменьшение размера липосом, поверхностного барьера или включение пенетрантов [34]. Липосомы на основе гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси (полиэтиленгликоля)-2000] и загруженные трансретиноевой кислотой (лип-атра) наносили на кожу свиней линии Бама. Лип-атра со средним диаметром 83 нм проникали через роговой слой кожи в эпидермис и дерму. Липосомы размером 200–300 нм проникали через дерму на треть хуже [39]. Внешний слой кожи содержит <30 % воды, в то время как внутренний слой состоит примерно из 70 % воды. Этот градиент гидратации внутри эпидермиса играет решающую роль в трансдермальной достав-

ке деформируемых везикул, таких как трансферосомы. Трансферосомы используют этот градиент гидратации. Они проталкиваются во влажные слои эпидермиса через межклеточный путь. Оказавшись в этих более глубоких слоях, неповрежденные трансферосомы могут взаимодействовать с липидами, присутствующими в клетках кожи. В зависимости от своего состава и размера трансферосомы могут сливаться с липидными мембранами клеток кожи, высвобождая инкапсулированную ЛС в целевые слои кожи [66].

Адекватно проведенные исследования по фармакокинетике также могут расцениваться как инструмент визуализации липосом. То есть, если ЛС попадает в мишень и оказывает терапевтическое действие, а свободная ЛС не оказывает эффект на мишень, можно предполагать, что этот эффект обеспечен за счет липосомальной формы. Однако биологическая судьба липосом до конца не изучена. Основные вопросы о том, когда, где и как ЛС высвобождаются из липосом *in vivo*, остаются открытыми. Для корректной интерпретации результатов фармакокинетических исследований необходимо отдельно определить количество ЛС, высвободившейся из липосомы, и всей ЛС, инкапсулированной в липосомы¹. Решение этой задачи ограничено текущими возможностями фармацевтического анализа. Стратегии применения радиационной или флуоресцентной метки не позволяют однозначно различать сигналы высвободившегося ЛС и носителя, что приводит к большим помехам и неопределенности [67]. Некоторые авторы рассматривают ЛС, инкапсулированные в липосомы, как специфическую форму «макропролекарств», которые остаются неактивными, пока не высвободятся в заданной целевой ткани. Например, доксорубин в липосоме должен попасть в ткань, затем высвободиться и проникнуть в ядро целевой клетки, чтобы интеркалироваться в пары оснований ДНК для оказания цитотоксического действия. В этом смысле биодоступным является только ЛС, попавшая в ядро. Но до сих пор внутриопухолевая, внутриклеточная и межъядерная кинетика высвобождения липосомальных препаратов малоизучена и остается в статусе «черного ящика». Концентрация липосомальных препаратов в плазме вряд ли может точно отражать фактическую концентрацию в мишени (т. е. в ядре) [68]. Для корректной оценки количества высвободившейся из липосомы ЛС в ткани или клетках-мишенях и ЛС, оставшейся в липосоме, необходима разработка передовых биоаналитических методов.

¹ Liposome drug products: Chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/liposome-drug-products-chemistry-manufacturing-and-controls-human-pharmacokinetics-and>. Accessed: 29.08.2024.

Клиренс

Общий системный клиренс связан с экспозицией и средней равновесной концентрацией в плазме, достигаемой при непрерывном применении ЛС. Непрерывное введение ЛС может включать как режимы инфузии с постоянной скоростью, так и/или схемы многократного дозирования. Общий клиренс липосомальных составов зависит от трех факторов: (1) скорости элиминации самого липосомального носителя; (2) скорости высвобождения инкапсулированного или внедренного в мембрану ЛС из носителя и (3) скорости выведения и метаболизма высвободившегося ЛС, больше не связанного с носителем.

Процессы выведения липосом и других наночастиц из кровотока описаны в литературе [61]. На клиренс липосом могут влиять физико-химические факторы, включая размер везикул, липидный состав мембраны и скорость высвобождения содержимого из липосом. На скорость клиренса липосом и период полувыведения из крови большое влияние оказывает липосомальный состав. Составы, увеличивающие время нахождения ЛС в кровотоке, способствуют более высокому накоплению и депонированию их в тканях-мишенях [69]. Например, легочный клиренс обусловлен альвеолярными макрофагами и мукоцилиарной эскалацией в проводящих дыхательных путях. Дендритные клетки также участвуют в легочном клиренсе липосом в лимфатическую систему [44].

Основным механизмом выведения липосом является распознавание и поглощение ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) макрофагами, которые расположены преимущественно в печени и селезенке. И в первую очередь за этот процесс отвечает система мононуклеарных фагоцитов (СМФ), состоящая из тканевых макрофагов и моноцитов крови [70]. Существенно затрудняют доставку ЛС и циркулирующие нейтрофилы [71]. Модификации липосомальной композиции для снижения поглощения СМФ посвящено значительное количество исследований [72, 73].

Липосомальная опсонизация при системном введении заставляет липосомы взаимодействовать с рецепторами на поверхности резидентных макрофагов печени и селезенки СМФ, что впоследствии вызывает их интернализацию и деградацию [74]. Механически аналогичным образом липосомальная опсонизация может также направлять частицы в печень для поглощения гепатоцитами [75].

Включение полиэтиленгликолей (ПЭГ) в липосомальные составы, известные как «скрытые» (stealth) липосомы, увеличивает время циркуляции и, как следствие, период полураспада липосом, препятствуя опсонизации или преимущественно связывая белки, которые уклоняются от поглощения [76]. В процессе изучения фармакокинетики ПЭГилированных липосом с доксирубицином на китайских пациентках с распространенным раком молочной железы было показано, что клиренс ЛС из липосом (0,0247 л/ч) был

значительно замедлен по сравнению с неинкапсулированной субстанцией ($Cl=5,111$ л/ч) [77]. ПЭГилирование липосом придает поверхности гидрофильность, а также создает барьер стерических затруднений, что влияет на связывание сывороточных белков с поверхностью липосом [78]. Липосомы, состоящие в основном из нейтральных фосфолипидов с небольшим молярным процентом отрицательно заряженного гликолипида, главным образом моносиалоганглиозида (МГ), также показали пролонгированную циркуляцию *in vivo*. Механически МГ снижает липосомальную опсонизацию за счет стерических препятствий, создаваемых отрицательно заряженной сиаловой кислотой и физической границей, обеспечиваемой углеводными цепями [79].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует широкий спектр методов визуализации, доступных для оценки морфологии липосом и их качества, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Световая микроскопия может относительно быстро предоставить общие сведения о размере и форме более крупных везикул, а также однородности образца. И наоборот, ТЕМ является наиболее часто используемым методом для более детального изучения морфологии липосом; однако при интерпретации результатов необходимо учитывать возможность структурных изменений для каждого подтипа ТЕМ из-за окрашивания и/или воздействия условий вакуума. ESEM наиболее полезен при определении липосомальных изменений в ответ на окружающую среду, тогда как AFM становится полезным методом морфологического анализа наночастиц и обеспечивает максимальное разрешение липосомальной поверхности. И AFM, и ТЕМ способны визуализировать лиганды, конъюгированные с поверхностью липосом, и предоставить дополнительную информацию о модификациях поверхности. В целом выбор метода зависит от того, какие морфологические характеристики и степень детализации требуются. Кроме того, в процессе выбора важно понимать потенциальные последствия метода подготовки проб для каждого метода визуализации.

Фармакокинетика липосомальных форм определяется множеством факторов, таких как природа ЛС, дозировка, липидный состав, размер липосом, заряд, покрытие липосом вспомогательными веществами и способ введения. Кроме того, взаимодействие липосомальных форм с иммунной системой, ретикулоэндотелиальной системой и компонентами крови играет важную роль в их абсорбции и выведении из организма. Важно отметить, что модификация поверхности липосом (например, ПЭГилирование) может влиять на их взаимодействие с клетками, биожидкостями организма и органами. Лучшее понимание фармакокинетики и биораспределения липосомальных форм необходимо для разработки современных лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Осочук С. С., Коцур Ю. М., Пожарицкая О. Н., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Малков С. Д., Зарифи К. О., Титович И. А., Красова Е. К., Шиков А. Н. Липосомы – метаболически активные транспортные системы лекарственных средств: классификация, составные компоненты, способы изготовления и стабилизации. Часть 1. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;4. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1867.
2. Bibi S., Kaur R., Henriksen-Lacey M., McNeil S. E., Wilkhu J., Lattmann E., Christensen D., Mohammed A. R., Perrie Y. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417(1–2):138–150. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.021.
3. Nallamotheu R., Wood G. C., Pattillo C. B., Scott R. C., Kiani M. F., Moore B. M., Thoma L. A. A tumor vasculature targeted liposome delivery system for combretastatin A4: Design, characterization, and in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(2):E32. DOI: 10.1208/pt070232.
4. Bouvrais H., Pott T., Bagatolli L. A., Ipsen J. H., Méléard P. Impact of membrane-anchored fluorescent probes on the mechanical properties of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2010;1798(7):1333–1337. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.03.026.
5. Klymchenko A. S., Oncul S., Didier P., Schaub E., Bagatolli L., Duportail G., Mély Y. Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2009;1788(2):495–499. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.10.019.
6. Mertins O., Dimova R. Insights on the interactions of chitosan with phospholipid vesicles. Part II: membrane stiffening and pore formation. *Langmuir*. 2013;29(47):14552–14559. DOI: 10.1021/la4032199.
7. Ruozzi B., Belletti D., Tombesi A., Tosi G., Bondioli L., Forni F., Vandelli M. A. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:557–563. DOI: 10.2147/IJN.S14615.
8. Karakas C. Y., Ustundag C. B., Sahin A., Karadag A. Co-axial electrospinning of liposomal propolis loaded gelatin-zein fibers as a potential wound healing material. *Journal of Applied Polymer Science*. 2023;140(46):e54683. DOI: 10.1002/app.54683.
9. Johnston M. J. W., Edwards K., Karlsson G., Cullis P. R. Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations. *Journal of Liposome Research*. 2008;18(2):145–157. DOI: 10.1080/08982100802129372.
10. Zhigaltsev I. V., Maurer N., Akhong Q.-F., Leone R., Leng E., Wang J., Semple S. C., Cullis P. R. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention. *Journal of Controlled Release*. 2005;104(1):103–111. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.01.010.
11. Damari S. P., Shamrakov D., Varenik M., Koren E., Nativ-Roth E., Barenholz Y., Regev O. Practical aspects in size and morphology characterization of drug-loaded nano-liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;547(1–2):648–655. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.037.

12. Kuntsche J., Horst J. C., Bunjes H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417(1–2):120–137. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.001.
13. Resnik N., Romih R., Kreft M. E., Hudoklin S. Freeze-fracture electron microscopy for extracellular vesicle analysis. *Journal of Visualized Experiments*. 2022;187:e63550. DOI: 10.3791/63550.
14. Perrie Y., Ali H., Kirby D. J., Mohammed A. U. R., McNeil S. E., Vangala A. Environmental scanning electron microscope imaging of vesicle systems. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1522:131–143. DOI: 10.1007/978-1-4939-6591-5_11.
15. Takahashi N., Higashi K., Ueda K., Yamamoto K., Moribe K. Determination of nonspherical morphology of doxorubicin-loaded liposomes by atomic force microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;107(2):717–726. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.10.009.
16. Ruozì B., Tosi G., Leo E., Vandelli M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. *Talanta*. 2007;73(1):12–22. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.03.031.
17. Ле-Дейген И. М., Скуредина А. А., Кудряшова Е. В. Экспериментальные методы исследования механизма взаимодействия липидных мембран с низкомолекулярными лекарствами. *Биоорганическая химия*. 2020;46(4):340–359. DOI: 10.31857/S013234232004017X.
18. Швецов И. С. Влияние pH среды гидратируемого раствора на морфологические характеристики лецитиновых липосом. *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки*. 2021;(5):236–240. DOI: 10.37882/2223-2966.2021.05.36.
19. Бурдаев Н. И., Николаева Л. Л., Косенко В. В., Шпрах З. С., Бунятян Н. Д. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(2–1):316–332. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508.
20. Bagatolli L. A. Membranes and Fluorescence Microscopy. *Reviews in Fluorescence*. 2009;33–51. DOI: 10.1007/978-0-387-88722-7_2.
21. Murphy D. B., Davidson M. W. Polarization Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 153–171. DOI: 10.1002/9781118382905.
22. Murphy D. B., Davidson M. W. Fluorescence Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 199–231. DOI: 10.1002/9781118382905.ch11.
23. Murphy D. B., Davidson M. W. Confocal Laser Scanning Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 265–305. DOI: 10.1002/9781118382905.ch13.
24. Henry C. R. Morphology of supported nanoparticles. *Progress in Surface Science*. 2005;80(3–4):92–116. DOI: 10.1016/j.progsurf.2005.09.004.
25. Robson A.-L., Dastoor P. C., Flynn J., Palmer W., Martin A., Smith D. W., Woldu A., Hua S. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:328115. DOI: 10.3389/fphar.2018.00080.
26. Adler K., Schiemann J. Characterization of liposomes by scanning electron microscopy and the freeze-fracture technique. *Micron and Microscopica Acta*. 1985;16(2):109–113. DOI: 10.1016/0739-6260(85)90039-5.
27. Baxa U. Imaging of liposomes by transmission electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1682:73–88. DOI: 10.1007/978-1-4939-7352-1_8.
28. Anabousi S., Laue M., Lehr C.-M., Bakowsky U., Ehrhardt C. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):295–303. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.12.009.
29. Dürr V., Wohlfart S., Eisenzapf T., Mier W., Fricker G., Uhl P. Oral Delivery of mRNA by Liposomes Functionalized with Cell-Penetrating Peptides. *Applied Nano*. 2023;4(4):293–308. DOI: 10.3390/applnano4040017.
30. Mohammed A. R., Weston N., Coombes A. G. A., Fitzgerald M., Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;285(1–2):23–34. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.010.
31. Sitterberg J., Özçetin A., Ehrhardt C., Bakowsky U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(1):2–13. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.005.
32. Engelhardt K., Preis E., Bakowsky U. Visualization and characterization of liposomes by atomic force microscopy. In: *Liposomes. Methods and Protocols*. New York: Springer Nature; 2023. P. 253–263. DOI: 10.1007/978-1-0716-2954-3_23.
33. Sheikholeslami B., Lam N. W., Dua K., Haghi M. Exploring the impact of physicochemical properties of liposomal formulations on their in vivo fate. *Life Sciences*. 2022;300:120574. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120574.
34. Paramshetti S., Angolkar M., Talath S., Osmani R. A. M., Spandana A., Al Fatease A., Hani U., Ramesh K. V. R. N. S., Singh E. Unravelling the in vivo dynamics of liposomes: Insights into biodistribution and cellular membrane interactions. *Life Sciences*. 2024;346:122616. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122616.
35. Su J., Lu W., Guo Y., Liu Z., Wang X., Yan H., Zhang R. X. Depot unilamellar liposomes to sustain transscleral drug Co-delivery for ophthalmic infection therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;86:104629. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104629.
36. Tian H., Chang M., Lyu Y., Dong N., Yu N., Yin T., Zhang Y., He H., Gou J., Tang X. Intramuscular injection of palmitic acid-conjugated Exendin-4 loaded multivesicular liposomes for long-acting and improving in-situ stability. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2024;21(1):169–185. DOI: 10.1080/17425247.2024.2305110.
37. Peng J., Wang Q., Sun R., Zhang K., Chen Y., Gong Z. Phospholipids of inhaled liposomes determine the in vivo fate and therapeutic effects of salvianolic acid B on idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Controlled Release*. 2024;371:1–15. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.05.026.
38. Duong V.-A., Nguyen T.-T.-L., Maeng H.-J. Recent advances in intranasal liposomes for drug, gene, and vaccine delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):207. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010207.

39. Liu J., Zheng A., Peng B., Xu Y., Zhang N. Size-dependent absorption through stratum corneum by drug-loaded liposomes. *Pharmaceutical Research*. 2021;38:1429–1437. DOI: 10.1007/s11095-021-03079-9.
40. Li H., Tang Q., Wang Y., Li M., Wang Y., Zhu H., Geng F., Wu D., Peng L., Zhao G., Zou L., Shi S. Injectable thermo-sensitive lipo-hydrogels loaded with ropivacaine for prolonging local anesthesia. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;611:121291. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121291.
41. Pokharkar V., Patil-Gadhe A., Palla P. Efavirenz loaded nanostructured lipid carrier engineered for brain targeting through intranasal route: In-vivo pharmacokinetic and toxicity study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:150–164. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.067.
42. Xiang Y., Long Y., Yang Q., Zheng C., Cui M., Ci Z., Lv X., Li N., Zhang R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of Baicalin liposome on cerebral ischemia reperfusion injury rats via intranasal administration. *Brain Research*. 2020;1726:146503. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.146503.
43. Wei H., Liu T., Jiang N., Zhou K., Yang K., Ning W., Yu Y. A novel delivery system of cyclovirobuxine D for brain targeting: Angiopep-conjugated polysorbate 80-coated liposomes via intranasal administration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2018;14(7):1252–1262. DOI: 10.1166/jbn.2018.2581.
44. Liu Q., Guan J., Qin L., Zhang X., Mao S. Physicochemical properties affecting the fate of nanoparticles in pulmonary drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2020;25(1):150–159. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.09.023.
45. Ferguson L. T., Ma X., Myerson J. W., Wu J., Glassman P. M., Zamora M. E., Hood E. D., Zaleski M., Shen M., Essien E.-O., Shuvaev V. V., Brenner J. S. Mechanisms by which liposomes improve inhaled drug delivery for alveolar diseases. *Advanced NanoBiomed Research*. 2023;3(3):2200106. DOI: 10.1002/anbr.202200106.
46. Lai S., Wei Y., Wu Q., Zhou K., Liu T., Zhang Y., Jiang N., Xiao W., Chen J., Liu Q., Yu Y. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. *Journal of Nanobiotechnology*. 2019;17:64. DOI: 10.1186/s12951-019-0498-7.
47. Zhang G., Li X., Huang C., Jiang Y., Su J., Hu Y. Preparation of the Levo-Tetrahydropalmatine Liposome Gel and Its Transdermal Study. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:4617–4632. DOI: 10.2147/IJN.S422305.
48. Chabru A. S., Salve P. S., Ghumare G. D., Dhamak R. S., Tiwari D. R., Waghmare D. S. Comparative pharmacokinetic studies of transferosomes loaded gel and pressure sensitive adhesive based patch formulation for transdermal delivery of benztropine mesylate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024;92:105287. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.105287.
49. Yu A.-M., Tu M.-J. Deliver the promise: RNAs as a new class of molecular entities for therapy and vaccination. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;230:107967. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107967.
50. Uhl P., Helm F., Hofhaus G., Brings S., Kaufman C., Leotta K., Urban S., Haberkorn U., Mier W., Fricker G. A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;103:159–166. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.03.031.
51. Leal J., Dong T., Taylor A., Siegrist E., Gao F., Smyth H. D. C., Ghosh D. Mucus-penetrating phage-displayed peptides for improved transport across a mucus-like model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1–2):57–64. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.055.
52. Карлина М. В., Косман В. М., Пожарицкая О. Н., Шиков А. Н., Макарова М. Н., Макаров В. Г., Балабаньян В. Ю. Экспериментальное исследование фармакокинетики рифабутина в липосомальной форме. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2013;(2):37–41.
53. El-Helaly S. N., Abd Elbary A., Kassem M. A., El-Nabrawi M. A. Electrosteric stealth Rivastigmine loaded liposomes for brain targeting: preparation, characterization, ex vivo, bio-distribution and in vivo pharmacokinetic studies. *Drug Delivery*. 2017;24(1):692–700. DOI: 10.1080/10717544.2017.1309476.
54. Rip J., Chen L., Hartman R., van den Heuvel A., Reijerkerk A., van Kregten J., van der Boom B., Appeldoorn C., de Boer M., Maussang D., de Lange E. C. M., Gaillard P. J. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood–brain barrier in rats. *Journal of Drug Targeting*. 2014;22(5):460–467. DOI: 10.3109/1061186X.2014.888070.
55. Dadpour S., Mehrabian A., Arabsalmani M., Mirhadi E., Askarizadeh A., Mashreghi M., Jaafari M. R. The role of size in PEGylated liposomal doxorubicin biodistribution and anti-tumour activity. *IET Nanobiotechnology*. 2022;16(7–8):259–272. DOI: 10.1049/nbt.12094.
56. Guo P., Liu D., Subramanyam K., Wang B., Yang J., Huang J., Auguste D. T., Moses M. A. Nanoparticle elasticity directs tumor uptake. *Nature Communications*. 2018;9(1):130. DOI: 10.1038/s41467-017-02588-9.
57. Krasnici S., Werner A., Eichhorn M. E., Schmitt-Sody M., Parnernik S. A., Sauer B., Schulze B., Teifel M., Michaelis U., Naujoks K., Dellian M. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International Journal of Cancer*. 2003;105(4):561–567. DOI: 10.1002/ijc.11108.
58. Wang H.-X., Zuo Z.-Q., Du J.-Z., Wang Y.-C., Sun R., Cao Z.-T., Ye X.-D., Wang J.-L., Leong K. W., Wang J. Surface charge critically affects tumor penetration and therapeutic efficacy of cancer nanomedicines. *Nano Today*. 2016;11(2):133–144. DOI: 10.1016/j.nantod.2016.04.008.
59. Large D. E., Soucy J. R., Hebert J., Auguste D. T. Advances in receptor-mediated, tumor-targeted drug delivery. *Advanced Therapeutics*. 2019;2(1):1800091. DOI: 10.1002/adtp.201800091.
60. Ishida T., Harashima H., Kiwada H. Liposome clearance. *Bioscience Reports*. 2002;22(2):197–224. DOI: 10.1023/a:1020134521778.
61. Ait-Oudhia S., Mager D. E., Straubinger R. M. Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. *Pharmaceutics*. 2014;6(1):137–174. DOI: 10.3390/pharmaceutics6010137.
62. Akhter M. H., Ahmad I., Alshahrani M. Y., Al-Harbi A. I., Khalilullah H., Afzal O., Altamimi A. S. A., Najib Ullah S. N. M., Ojha A., Karim S. Drug Delivery Challenges and Current Progress in Nanocarrier-Based Ocular Therapeutic System. *Gels*. 2022;8(2):82. DOI: 10.3390/gels8020082.

63. Tavakoli S., Peynshaert K., Lajunen T., Devoldere J., del Amo E. M., Ruponen M., De Smedt S. C., Remaut K., Urtti A. Ocular barriers to retinal delivery of intravitreal liposomes: Impact of vitreoretinal interface. *Journal of Controlled Release*. 2020;328:952–961. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.10.028.
64. Dhaliwal H. K., Fan Y., Kim J., Amiji M. M. Intranasal delivery and transfection of mRNA therapeutics in the brain using cationic liposomes. *Molecular Pharmaceutics*. 2020; 17(6):1996–2005. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00170.
65. Carter P., Narasimhan B., Wang Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;555:49–62. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.032.
66. Matharoo N., Mohd H., Michniak-Kohn B. Transfersomes as a transdermal drug delivery system: Dermal kinetics and recent developments. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2024;16(1):e1918. DOI: 10.1002/wnan.1918.
67. Chen T., He B., Tao J., He Y., Deng H., Wang X., Zheng Y. Application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and In Vivo biofate of nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:177–205. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.009.
68. Peng T., Xu W., Li Q., Ding Y., Huang Y. Pharmaceutical liposomal delivery—specific considerations of innovation and challenges. *Biomaterials Science*. 2023;11(1):62–75. DOI: 10.1039/D2BM01252A.
69. Allen T. M., Cullis P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(1):36–48. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
70. Hume D. A. The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*. 2006;18(1):49–53. DOI: 10.1016/j.coi.2005.11.008.
71. Betker J. L., Jones D., Childs C. R., Helm K. M., Terrell K., Nagel M. A., Anchordoquy T. J. Nanoparticle uptake by circulating leukocytes: A major barrier to tumor delivery. *Journal of Controlled Release*. 2018;286:85–93. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.07.031.
72. Giambelluca M., Markova E., Louet C., Steinkjer B., Sundset R., Škalko-Basnet N., Hak S. Liposomes-Human phagocytes interplay in whole blood: effect of liposome design. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2023;54:102712. DOI: 10.1016/j.nano.2023.102712.
73. Mochalova E. N., Egorova E. A., Komarova K. S., Shipunova V. O., Khabibullina N. F., Nikitin P. I., Nikitin M. P. Comparative study of nanoparticle blood circulation after forced clearance of own erythrocytes (mononuclear phagocyte system-cytoblockade) or administration of cytotoxic doxorubicin- or clodronate-loaded liposomes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10623. DOI: 10.3390/ijms241310623.
74. Large D. E., Abdelmessih R. G., Fink E. A., Auguste D. T. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;176:113851. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113851.
75. Scherphof G. L., Kamps J. A. A. M. The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. *Progress in Lipid Research*. 2001;40(3):149–166. DOI: 10.1016/S0163-7827(00)00020-5.
76. Shi D., Beasock D., Fessler A., Szebeni J., Ljubimova J. Y., Afonin K. A., Dobrovolskaia M. A. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;180:114079. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114079.
77. Xu G., Yang D., He C., Zhong L., Zhu J., Shu Q., Ding H., Xin W., Tong Y., Zhu X., Fang L. Population pharmacokinetics and toxicity correlation analysis of free and liposome-encapsulated doxorubicin in Chinese patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2023;92(3):181–192. DOI: 10.1007/s00280-023-04559-y.
78. Yamazoe E., Fang J.-Y., Tahara K. Oral mucus-penetrating PEGylated liposomes to improve drug absorption: Differences in the interaction mechanisms of a mucoadhesive liposome. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;593:120148. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120148.
79. Haroon H. B., Hunter A. C., Farhangrazi Z. S., Moghimi S. M. A brief history of long circulating nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;188:114396. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114396.

REFERENCES

1. Osochuk S. S., Kotsur Yu. M., Pozharitskaya O. N., Fli-syuk E. V., Smekhova I. E., Malkov S. D., Zarifi K. O., Titovich I. A., Krasova E. K., Shikov A. N. Liposomes – metabolically active drug transport systems: classification, components, preparation methods, and stabilization. Part 1. *Drug development & registration*. 2024;4. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-4-1867.
2. Bibi S., Kaur R., Henriksen-Lacey M., McNeil S. E., Wilkh J., Lattmann E., Christensen D., Mohammed A. R., Perrie Y. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417(1–2):138–150. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.021.
3. Nallamotheu R., Wood G. C., Pattillo C. B., Scott R. C., Kiani M. F., Moore B. M., Thoma L. A. A tumor vasculature targeted liposome delivery system for combretastatin A4: Design, characterization, and in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(2):E32. DOI: 10.1208/pt070232.
4. Bouvrais H., Pott T., Bagatolli L. A., Ipsen J. H., Méléard P. Impact of membrane-anchored fluorescent probes on the mechanical properties of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2010;1798(7):1333–1337. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.03.026.
5. Klymchenko A. S., Oncul S., Didier P., Schaub E., Bagatolli L., Duportail G., Mély Y. Visualization of lipid domains in giant unilamellar vesicles using an environment-sensitive membrane probe based on 3-hydroxyflavone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2009;1788(2):495–499. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.10.019.
6. Mertins O., Dimova R. Insights on the interactions of chitosan with phospholipid vesicles. Part II: membrane stiffening and pore formation. *Langmuir*. 2013;29(47):14552–14559. DOI: 10.1021/la4032199.
7. Ruozzi B., Belletti D., Tombesi A., Tosi G., Bondioli L., Forni F., Vandelli M. A. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;6:557–563. DOI: 10.2147/IJN.S14615.

8. Karakas C. Y., Ustundag C. B., Sahin A., Karadag A. Co-axial electrospinning of liposomal propolis loaded gelatin-zein fibers as a potential wound healing material. *Journal of Applied Polymer Science*. 2023;140(46):e54683. DOI: 10.1002/app.54683.
9. Johnston M. J. W., Edwards K., Karlsson G., Cullis P. R. Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations. *Journal of Liposome Research*. 2008;18(2):145–157. DOI: 10.1080/08982100802129372.
10. Zhigaltsev I. V., Maurer N., Akhong Q.-F., Leone R., Leng E., Wang J., Semple S. C., Cullis P. R. Liposome-encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine: a comparative study of drug loading and retention. *Journal of Controlled Release*. 2005;104(1):103–111. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.01.010.
11. Damari S. P., Shamrakov D., Varenik M., Koren E., Nativ-Roth E., Barenholz Y., Regev O. Practical aspects in size and morphology characterization of drug-loaded nano-liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;547(1–2):648–655. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.037.
12. Kuntsche J., Horst J. C., Bunjes H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;417(1–2):120–137. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.001.
13. Resnik N., Romih R., Kreft M. E., Hudoklin S. Freeze-fracture electron microscopy for extracellular vesicle analysis. *Journal of Visualized Experiments*. 2022;187:e63550. DOI: 10.3791/63550.
14. Perrie Y., Ali H., Kirby D. J., Mohammed A. U. R., McNeil S. E., Vangala A. Environmental scanning electron microscope imaging of vesicle systems. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1522:131–143. DOI: 10.1007/978-1-4939-6591-5_11.
15. Takahashi N., Higashi K., Ueda K., Yamamoto K., Moribe K. Determination of nonspherical morphology of doxorubicin-loaded liposomes by atomic force microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;107(2):717–726. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.10.009.
16. Ruozzi B., Tosi G., Leo E., Vandelli M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. *Talanta*. 2007;73(1):12–22. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.03.031.
17. Le-Deygen I. M., Skuredina A. A., Kudryashova E. V. Experimental methods to study the mechanisms of interaction of lipid membranes with low-molecular drugs. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2020;46(4):340–359. (In Russ.) DOI: 10.31857/S013234232004017X.
18. Shvetsov I. S. Effect of the pH of the hydrated solution medium on the morphological characteristics of lecithin liposomes. *Modern Science: actual problems of theory and practice. Series of «Natural and technical sciences»*. 2021;(5):236–240. (In Russ.) DOI: 10.37882/2223-2966.2021.05.36.
19. Burdaev N. I., Nikolaeva L. L., Kosenko V. V., Shprakh Z. S., Bunyatyan N. D. Liposomes as drug carriers: classification, preparation methods, and medicinal use. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2–1):316–332. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508.
20. Bagatolli L. A. Membranes and Fluorescence Microscopy. *Reviews in Fluorescence*. 2009;33–51. DOI: 10.1007/978-0-387-88722-7_2.
21. Murphy D. B., Davidson M. W. Polarization Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 153–171. DOI: 10.1002/9781118382905.
22. Murphy D. B., Davidson M. W. Fluorescence Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 199–231. DOI: 10.1002/9781118382905.ch11.
23. Murphy D. B., Davidson M. W. Confocal Laser Scanning Microscopy. In: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. P. 265–305. DOI: 10.1002/9781118382905.ch13.
24. Henry C. R. Morphology of supported nanoparticles. *Progress in Surface Science*. 2005;80(3–4):92–116. DOI: 10.1016/j.progsurf.2005.09.004.
25. Robson A.-L., Dastoor P. C., Flynn J., Palmer W., Martin A., Smith D. W., Woldu A., Hua S. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:328115. DOI: 10.3389/fphar.2018.00080.
26. Adler K., Schiemann J. Characterization of liposomes by scanning electron microscopy and the freeze-fracture technique. *Micron and Microscopica Acta*. 1985;16(2):109–113. DOI: 10.1016/0739-6260(85)90039-5.
27. Baxa U. Imaging of liposomes by transmission electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1682:73–88. DOI: 10.1007/978-1-4939-7352-1_8.
28. Anabousi S., Laue M., Lehr C.-M., Bakowsky U., Ehrhardt C. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60(2):295–303. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.12.009.
29. Dürr V., Wohlfart S., Eisenzapf T., Mier W., Fricker G., Uhl P. Oral Delivery of mRNA by Liposomes Functionalized with Cell-Penetrating Peptides. *Applied Nano*. 2023;4(4):293–308. DOI: 10.3390/applnano4040017.
30. Mohammed A. R., Weston N., Coombes A. G. A., Fitzgerald M., Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;285(1–2):23–34. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.010.
31. Sitterberg J., Özçetin A., Ehrhardt C., Bakowsky U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(1):2–13. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.005.
32. Engelhardt K., Preis E., Bakowsky U. Visualization and characterization of liposomes by atomic force microscopy. In: *Liposomes. Methods and Protocols*. New York: Springer Nature; 2023. P. 253–263. DOI: 10.1007/978-1-0716-2954-3_23.
33. Sheikholeslami B., Lam N. W., Dua K., Haghi M. Exploring the impact of physicochemical properties of liposomal formulations on their in vivo fate. *Life Sciences*. 2022;300:120574. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120574.
34. Paramshetti S., Angolkar M., Talath S., Osmani R. A. M., Spandana A., Al Fatease A., Hani U., Ramesh K. V. R. N. S., Singh E. Unravelling the in vivo dynamics of liposomes: Insights into biodistribution and cellular membrane interactions. *Life Sciences*. 2024;346:122616. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122616.

35. Su J., Lu W., Guo Y., Liu Z., Wang X., Yan H., Zhang R. X. Depot unilamellar liposomes to sustain transscleral drug Co-delivery for ophthalmic infection therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;86:104629. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.104629.
36. Tian H., Chang M., Lyu Y., Dong N., Yu N., Yin T., Zhang Y., He H., Gou J., Tang X. Intramuscular injection of palmitic acid-conjugated Exendin-4 loaded multivesicular liposomes for long-acting and improving *in-situ* stability. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2024;21(1):169–185. DOI: 10.1080/17425247.2024.2305110.
37. Peng J., Wang Q., Sun R., Zhang K., Chen Y., Gong Z. Phospholipids of inhaled liposomes determine the *in vivo* fate and therapeutic effects of salvianolic acid B on idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Controlled Release*. 2024;371:1–15. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.05.026.
38. Duong V.-A., Nguyen T.-T.-L., Maeng H.-J. Recent advances in intranasal liposomes for drug, gene, and vaccine delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):207. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010207.
39. Liu J., Zheng A., Peng B., Xu Y., Zhang N. Size-dependent absorption through stratum corneum by drug-loaded liposomes. *Pharmaceutical Research*. 2021;38:1429–1437. DOI: 10.1007/s11095-021-03079-9.
40. Li H., Tang Q., Wang Y., Li M., Wang Y., Zhu H., Geng F., Wu D., Peng L., Zhao G., Zou L., Shi S. Injectable thermosensitive lipo-hydrogels loaded with ropivacaine for prolonging local anesthesia. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;611:121291. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.121291.
41. Pokharkar V., Patil-Gadhe A., Palla P. Efavirenz loaded nanostructured lipid carrier engineered for brain targeting through intranasal route: *In-vivo* pharmacokinetic and toxicity study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;94:150–164. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.067.
42. Xiang Y., Long Y., Yang Q., Zheng C., Cui M., Ci Z., Lv X., Li N., Zhang R. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of Baicalin liposome on cerebral ischemia reperfusion injury rats via intranasal administration. *Brain Research*. 2020;1726:146503. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.146503.
43. Wei H., Liu T., Jiang N., Zhou K., Yang K., Ning W., Yu Y. A novel delivery system of cyclovirobuxine D for brain targeting: Angiopep-conjugated polysorbate 80-coated liposomes via intranasal administration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2018;14(7):1252–1262. DOI: 10.1166/jbn.2018.2581.
44. Liu Q., Guan J., Qin L., Zhang X., Mao S. Physicochemical properties affecting the fate of nanoparticles in pulmonary drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2020;25(1):150–159. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.09.023.
45. Ferguson L. T., Ma X., Myerson J. W., Wu J., Glassman P. M., Zamora M. E., Hood E. D., Zaleski M., Shen M., Essien E.-O., Shuvaev V. V., Brenner J. S. Mechanisms by which liposomes improve inhaled drug delivery for alveolar diseases. *Advanced NanoBiomed Research*. 2023;3(3):2200106. DOI: 10.1002/anbr.202200106.
46. Lai S., Wei Y., Wu Q., Zhou K., Liu T., Zhang Y., Jiang N., Xiao W., Chen J., Liu Q., Yu Y. Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. *Journal of Nanobiotechnology*. 2019;17:64. DOI: 10.1186/s12951-019-0498-7.
47. Zhang G., Li X., Huang C., Jiang Y., Su J., Hu Y. Preparation of the Levo-Tetrahydropalmatine Liposome Gel and Its Transdermal Study. *International Journal of Nanomedicine*. 2023;18:4617–4632. DOI: 10.2147/IJN.S422305.
48. Chabru A. S., Salve P. S., Ghumare G. D., Dhamak R. S., Tiwari D. R., Waghmare D. S. Comparative pharmacokinetic studies of transferosomes loaded gel and pressure sensitive adhesive based patch formulation for transdermal delivery of benztropine mesylate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024;92:105287. DOI: 10.1016/j.jddst.2023.105287.
49. Yu A.-M., Tu M.-J. Deliver the promise: RNAs as a new class of molecular entities for therapy and vaccination. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;230:107967. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107967.
50. Uhl P., Helm F., Hofhaus G., Brings S., Kaufman C., Leotta K., Urban S., Haberkorn U., Mier W., Fricker G. A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;103:159–166. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.03.031.
51. Leal J., Dong T., Taylor A., Siegrist E., Gao F., Smyth H. D. C., Ghosh D. Mucus-penetrating phage-displayed peptides for improved transport across a mucus-like model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;553(1–2):57–64. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.055.
52. Carlina M. V., Cosman V. M., Pozharitskaya O. N., Shikov A. N., Makarova M. N., Makarov V. G., Balabanyan V. Y. Experimental study of the pharmacokinetics of rifabutin in liposomal form. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2013;(2):37–41. (In Russ.)
53. El-Helaly S. N., Abd Elbary A., Kassem M. A., El-Nabrawi M. A. Electrosteric stealth Rivastigmine loaded liposomes for brain targeting: preparation, characterization, *ex vivo*, bio-distribution and *in vivo* pharmacokinetic studies. *Drug Delivery*. 2017;24(1):692–700. DOI: 10.1080/10717544.2017.1309476.
54. Rip J., Chen L., Hartman R., van den Heuvel A., Reijerkerk A., van Kregten J., van der Boom B., Appeldoorn C., de Boer M., Maussang D., de Lange E. C. M., Gaillard P. J. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood–brain barrier in rats. *Journal of Drug Targeting*. 2014;22(5):460–467. DOI: 10.3109/1061186X.2014.888070.
55. Dadpour S., Mehrabian A., Arabsalmani M., Mirhadi E., Askarizadeh A., Mashreghi M., Jaafari M. R. The role of size in PEGylated liposomal doxorubicin biodistribution and anti-tumour activity. *IET Nanobiotechnology*. 2022;16(7–8):259–272. DOI: 10.1049/nbt.12094.
56. Guo P., Liu D., Subramanyam K., Wang B., Yang J., Huang J., Auguste D. T., Moses M. A. Nanoparticle elasticity directs tumor uptake. *Nature Communications*. 2018;9(1):130. DOI: 10.1038/s41467-017-02588-9.
57. Krasnici S., Werner A., Eichhorn M. E., Schmitt-Sody M., Pahnernik S. A., Sauer B., Schulze B., Teifel M., Michaelis U., Naujoks K., Dellian M. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International Journal of Cancer*. 2003;105(4):561–567. DOI: 10.1002/ijc.11108.
58. Wang H.-X., Zuo Z.-Q., Du J.-Z., Wang Y.-C., Sun R., Cao Z.-T., Ye X.-D., Wang J.-L., Leong K. W., Wang J. Surface charge critically affects tumor penetration and the-

- therapeutic efficacy of cancer nanomedicines. *Nano Today*. 2016;11(2):133–144. DOI: 10.1016/j.nantod.2016.04.008.
59. Large D.E., Soucy J.R., Hebert J., Auguste D.T. Advances in receptor-mediated, tumor-targeted drug delivery. *Advanced Therapeutics*. 2019;2(1):1800091. DOI: 10.1002/adtp.201800091.
60. Ishida T., Harashima H., Kiwada H. Liposome clearance. *Bioscience Reports*. 2002;22(2):197–224. DOI: 10.1023/a:1020134521778.
61. Ait-Oudhia S., Mager D.E., Straubinger R.M. Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. *Pharmaceutics*. 2014;6(1):137–174. DOI: 10.3390/pharmaceutics6010137.
62. Akhter M. H., Ahmad I., Alshahrani M. Y., Al-Harbi A. I., Khalilullah H., Afzal O., Altamimi A. S. A., Najib Ullah S. N. M., Ojha A., Karim S. Drug Delivery Challenges and Current Progress in Nanocarrier-Based Ocular Therapeutic System. *Gels*. 2022;8(2):82. DOI: 10.3390/gels8020082.
63. Tavakoli S., Peynshaert K., Lajunen T., Devoldere J., del Amo E. M., Ruponen M., De Smedt S. C., Remaut K., Urtti A. Ocular barriers to retinal delivery of intravitreal liposomes: Impact of vitreoretinal interface. *Journal of Controlled Release*. 2020;328:952–961. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.10.028.
64. Dhaliwal H. K., Fan Y., Kim J., Amiji M. M. Intranasal delivery and transfection of mRNA therapeutics in the brain using cationic liposomes. *Molecular Pharmaceutics*. 2020; 17(6):1996–2005. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00170.
65. Carter P., Narasimhan B., Wang Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;555:49–62. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.032.
66. Matharoo N., Mohd H., Michniak-Kohn B. Transfersomes as a transdermal drug delivery system: Dermal kinetics and recent developments. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2024;16(1):e1918. DOI: 10.1002/wnan.1918.
67. Chen T., He B., Tao J., He Y., Deng H., Wang X., Zheng Y. Application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and In Vivo biofate of nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:177–205. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.009.
68. Peng T., Xu W., Li Q., Ding Y., Huang Y. Pharmaceutical liposomal delivery—specific considerations of innovation and challenges. *Biomaterials Science*. 2023;11(1):62–75. DOI: 10.1039/D2BM01252A.
69. Allen T. M., Cullis P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(1):36–48. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
70. Hume D. A. The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*. 2006;18(1):49–53. DOI: 10.1016/j.coi.2005.11.008.
71. Betker J. L., Jones D., Childs C. R., Helm K. M., Terrell K., Nagel M. A., Anchordoquy T. J. Nanoparticle uptake by circulating leukocytes: A major barrier to tumor delivery. *Journal of Controlled Release*. 2018;286:85–93. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.07.031.
72. Giambelluca M., Markova E., Louet C., Steinkjer B., Sundset R., Škalko-Basnet N., Hak S. Liposomes-Human phagocytes interplay in whole blood: effect of liposome design. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2023;54:102712. DOI: 10.1016/j.nano.2023.102712.
73. Mochalova E. N., Egorova E. A., Komarova K. S., Shipunova V. O., Khabibullina N. F., Nikitin P. I., Nikitin M. P. Comparative study of nanoparticle blood circulation after forced clearance of own erythrocytes (mononuclear phagocyte system-cytoblockade) or administration of cytotoxic doxorubicin- or clodronate-loaded liposomes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10623. DOI: 10.3390/ijms241310623.
74. Large D. E., Abdelmessih R. G., Fink E. A., Auguste D. T. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021;176:113851. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113851.
75. Scherphof G. L., Kamps J. A. A. M. The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulation. *Progress in Lipid Research*. 2001;40(3):149–166. DOI: 10.1016/S0163-7827(00)00020-5.
76. Shi D., Beasock D., Fessler A., Szebeni J., Ljubimova J. Y., Afonin K. A., Dobrovolskaia M. A. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;180:114079. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114079.
77. Xu G., Yang D., He C., Zhong L., Zhu J., Shu Q., Ding H., Xin W., Tong Y., Zhu X., Fang L. Population pharmacokinetics and toxicity correlation analysis of free and liposome-encapsulated doxorubicin in Chinese patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2023;92(3):181–192. DOI: 10.1007/s00280-023-04559-y.
78. Yamazoe E., Fang J.-Y., Tahara K. Oral mucus-penetrating PEGylated liposomes to improve drug absorption: Differences in the interaction mechanisms of a mucoadhesive liposome. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;593:120148. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.120148.
79. Haroon H. B., Hunter A. C., Farhangrazi Z. S., Moghimi S. M. A brief history of long circulating nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;188:114396. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114396.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.014.21; 615.453.625; 615.214.2

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1951>



Твердые дисперсные системы как способ создания лекарственных форм с замедленным высвобождением из расплывающихся субстанций

О. А. Терентьева✉, Ю. М. Коцур, И. А. Наркевич, Е. В. Флисюк

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

✉ Контактное лицо: Терентьева Оксана А. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

ORCID: О. А. Терентьева – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>;

Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;

И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>;

Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Статья поступила: 19.09.2024

Статья принята в печать: 31.10.2024

Статья опубликована: 01.11.2024

Резюме

Введение. Создание твердых лекарственных форм из гигроскопичных субстанций является сложной технологической задачей. Введение гигроскопичных веществ в полимерную матрицу позволяет снизить их влагосорбционную способность.

Цель. Оценить пригодность термопластичных полимеров для создания твердых дисперсий с расплывающейся субстанцией с целью снижения гигроскопичности субстанции и получения твердых дозированных лекарственных форм с замедленным высвобождением.

Материалы и методы. Субстанция: бис[2-[(2Z)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандионат (ДЭАЭ); вспомогательные вещества: Kollidon® VA 64, Soluplus®, полиэтиленгликоль марок 1500, 6000, 8000, полоксамеры Kolliphor® P 188 и Kolliphor® P 407; реактивы: хлористоводородная кислота, натрия дигидрофосфат, калия гидрофосфат. Расплав компонентов получали на двухшнековом лабораторном экструдере и отливали в силиконовые формы. Полученные твердые лекарственные формы исследовали по показателю «распадаемость» в трех средах, соответствующих отделам ЖКТ человека.

Результаты и обсуждение. Субстанция ДЭАЭ характеризуется как расплывающаяся. Введение ДЭАЭ в полимерные матрицы на основе ПЭГ и его сополимеров позволило снизить гигроскопичность готовых лекарственных форм в виде плиток. Введение в расплав солюбилизаторов позволило получить плитки с надлежащими органолептическими свойствами. Высвобождение ДЭАЭ из плиток в виде медведя или тороида происходит в среднем на 29–47 % быстрее, чем из плиток в виде сердца.

Заключение. Перспективными для дальнейшей разработки плиток, содержащих ДЭАЭ, оказались составы на основе Soluplus® и Kolliphor® P 407. С целью создания плиток с замедленным высвобождением рекомендуется использовать формы в виде сердечек, так как у них меньше площадь поверхности.

Ключевые слова: экструзия расплава, гигроскопичность, формовка, распадаемость, нейропротектор

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

Вклад авторов. О. А. Терентьева, Е. В. Флисюк разработали план эксперимента и реализовали получение таблеток производного диэтиламиноэтанола. Ю. М. Коцур определяла количественное содержание производного диэтиламиноэтанола в таблетках с Soluplus®. Все авторы обрабатывали полученные данные, участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Терентьева О. А., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Флисюк Е. В. Твердые дисперсные системы как способ создания лекарственных форм с замедленным высвобождением из расплывающихся субстанций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):99–106. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1951>

© Терентьева О. А., Коцур Ю. М., Наркевич И. А., Флисюк Е. В., 2024

© Terentyeva O. A., Kotsur Yu. M., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., 2024

Production sustained release dosage forms from deliquescent substances by solid dispersion systems

Oksana A. Terenteva✉, Yuliya M. Kotsur, Igor A. Narkevich, Elena V. Flisyuk

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

✉ **Corresponding author:** Oksana A. Terenteva. **E-mail:** oksana.terentyeva@pharminnotech.com

ORCID: Oksana A. Terenteva – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>;

Yuliya M. Kotsur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;

Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>;

Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>.

Received: 19.09.2024

Accepted: 31.10.2024

Published: 01.11.2024

Abstract

Introduction. The production of solid dosage forms from hygroscopic substances is a complex technological task. The addition of hygroscopic substances into a polymer matrix allows to reduce their moisture absorption capacity.

Aim. Reducing the hygroscopicity of deliquescent substances and obtaining sustained release solid dosage forms by using solid dispersion systems.

Materials and methods. Substance: DEAE; excipients: Kollidon® VA 64, Soluplus®, PEG 1500, PEG 6000, PEG 8000, Poloxamer Kolliphor® P 188 and Kolliphor® P 407; reagents: hydrochloric acid, sodium dihydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate. The melt of the components was obtained on a twin-screw laboratory extruder and cast into silicone molds. The resulting solid dosage forms were studied for disintegration in three environments corresponding to the sections of the human gastrointestinal tract.

Results and discussion. The active pharmaceutical substance DEAE is characterized as deliquescent substance. The introduction of DEAE into PEG-polymer matrices made it possible to reduce the hygroscopicity of solid dosage forms in the form of bars. The introduction of solubilizers into the melt made it possible to obtain bars with the appropriate organoleptic properties. The release of DEAE from bear- or toroid-shaped bars occurs on average 29–47 % faster than from heart-shaped bars.

Conclusion. Compositions based on Soluplus® and Kolliphor® P 407 have proven promising for further development of tiles containing DEAE. In order to create tiles with a slow release, it is recommended to use heart-shaped forms, as they have a smaller surface area.

Keywords: hot melt extrusion, hygroscopicity, molding, disintegration, neuroprotector

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. Oksana A. Terenteva and Elena V. Flisyuk developed and carried out the experiment. Yuliya M. Kotsur determined the concentration of the DEAE by HPLC. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

For citation: Terenteva O. A., Kotsur Yu. M., Narkevich I. A., Flisyuk E. V. Production sustained release dosage forms from deliquescent substances by solid dispersion systems. *Drug development & registration*. 2024;13(4):99–106. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1951>

ВВЕДЕНИЕ

Влагопоглощающая способность фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ является контролируемым параметром на этапе всей разработки лекарственного препарата. Способность веществ поглощать пары влаги из воздуха называется гигроскопичностью. Измерение данного параметра было введено в Государственную фармакопею Российской Федерации 15 издания в ОФС.1.1.0042 «Опре-

деление гигроскопичности». Государственная фармакопея Российской Федерации в зависимости от способности веществ поглощать влагу из воздуха разделяет их на расплывающиеся, очень гигроскопичные, гигроскопичные и слегка гигроскопичные. Таким же образом вещества классифицируются и в Европейской фармакопее.

Неблагоприятное воздействие влаги на лекарственные формы заключается в возможной деградации лекарственного вещества за счет протекания хими-

ческих реакций (например, гидролиза), накоплении примесей [1]. Излишнее содержание воды может понижать температуру стеклования веществ, выполняя роль пластификатора [1–3]. Поглощенная вода может являться средой растворения водорастворимых веществ, входящих в состав композиции, напрямую влияя на биодоступность веществ [4, 5].

Физическая стабильность веществ зависит от влажности окружающей среды, температуры окружающей среды, площади поверхности твердого тела и равновесного влагосодержания. Изменение любого из этих параметров приводит к обмену молекулами воды между окружающей средой и твердым веществом [6].

Создание твердых лекарственных форм из гигроскопичных и расплывающихся субстанций является сложной технологической задачей. Влагопоглощающая способность субстанции напрямую влияет на качество готового продукта, его стабильность и срок годности. Более того, степень поглощения влаги негативно сказывается на физико-химических и технологических параметрах субстанции, накладывая ограничения на условия ее хранения, транспортировки и условия проведения технологических операций по получению готовой лекарственной формы [6, 7].

При получении твердых лекарственных форм в виде таблеток из гигроскопичных субстанций могут возникнуть проблемы на этапе обработки субстанции, например невозможность применения влажного и сухого гранулирования для улучшения сыпучести порошка [8]. При получении таблеток гигроскопичные субстанции могут зависать в бункере, прилипать к частям пресс-инструмента и затруднять процесс прессования [9].

При разработке твердых лекарственных форм из субстанций с высокой влагопоглощающей способностью необходимо выработать подходы, позволяющие снизить гигроскопичность веществ, сводя к минимуму зависимость от условий производства: относительной влажности помещения, температуры, качества герметизации, выбора упаковки [10].

Введение гигроскопичных веществ в полимерную матрицу потенциально может снизить поглощение воды из окружающей среды активным компонентом, позволяя регулировать высвобождение лекарственного вещества.

Цель. Оценить пригодность термопластичных полимеров для создания твердых дисперсий с расплывающейся субстанцией с целью снижения гигроскопичности субстанции и получения твердых дозированных лекарственных форм с замедленными высвобождением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция: бис[2-((2Z)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси)-N,N-диэтилэтанаминия] бутандионат (ДЭАЭ) (ФГУП «СКТБ «Технолог», Россия); вспомога-

тельные вещества: сополимер поливинилпирролидона и винацетата Kollidon® VA 64 (BASF, Германия), Soluplus® (полиэтиленгликоль-6000 – винилкапролактан – винацетат) (BASF, Германия), полиэтиленгликоль-1500 (ПЭГ-1500) (ООО «РусХим», Россия), ПЭГ-6000 (NeoFroxx GmbH, Германия), ПЭГ-8000 (NeoFroxx GmbH, Германия), полксамер Kolliphor® P 188 (BASF, Германия), полксамер Kolliphor® P 407 (BASF, Германия); реактивы: хлористоводородная кислота (х.ч., АО «КАУСТИК», Россия), калий фосфорнокислый однозамещенный (АО «ЛенРеактив», Россия), натрий фосфорнокислый двузамещенный, 12-водный (АО «ЛенРеактив», Россия).

Оборудование. Двухшнековый лабораторный экструдер HAAKE™ MiniCTW (Thermo Fisher Scientific, Германия) с противоположно направленными коническими шнеками; формы из пищевого силикона (Д × Ш × В): «тороид» 20×20×15 мм, «сердце» 14 × 15 × 12 мм (объем 1,5 мм), «медведь» 9 × 17 × 9 мм; микрометр цифровой InTool; тестер растворения DT 626/1000 НН (ERWEKA GmbH, Германия); тестер распадаемости таблеток ZT 221 (ERWEKA GmbH, Германия); климатическая камера HPP 110 (Mettler, Германия); весы лабораторные электронные CE 224-C (ООО «Сартогосм», Россия); дифференциальный сканирующий калориметр DSC 3+ (METTLER TOLEDO, Швейцария).

Определение гигроскопичности. Точную навеску вещества помещали в бюкс в климатическую камеру. Условия проведения испытаний: относительная влажность – $(80 \pm 1) \%$, температура – $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, время – 24 ч. Гигроскопичность веществ оценивали по приросту массы образца во время проведения испытания согласно ОФС.1.1.0042 «Определение гигроскопичности».

Термический анализ субстанции ДЭАЭ. Метод состоял из трех последовательных сегментов: нагрева, охлаждения, нагрева в диапазоне от 0 до 150 °C.

Изменение температуры производилось с интенсивностью 10 К/мин в среде азота с расходом 50 мл/мин. Использовались тигли алюминиевые стандартные на 40 мкл с перфорацией. Калибровку по температуре и энтальпии проводили по чистым металлам – индию (ME-119442) и цинку (ME-119441) в соответствии с инструкциями производителя.

Данные обрабатывались с помощью программного обеспечения METTLER STARe, версия V16.20c.

Сплавление полимеров с ДЭАЭ. Субстанция ДЭАЭ и полимер сплавлялись в заданных соотношениях (таблица 1). Полученный расплав веществ выливали на металлический поднос, охлаждали, замораживали, измельчали и просеивали через сито 1,5 мм.

Формование таблеток. Физическая смесь предварительно высушенной субстанции ДЭАЭ (остаточная влажность 2 %), полимера (Pol) и солибилизатора (Sol), полученная согласно матрице планирования, загружалась в питательный бункер лабораторного двухшнекового экструдера. Экструзия проводилась без пластины для крепления матрицы при параметрах, указанных в таблице 1.

Таблица 1. Составы плиток ДЭАЭ-Pol-Sol и условия процесса экструзии

Table 1. Compositions of DEAE-Pol-Sol bars and extrusion process conditions

№ образца Sample No.	ДЭАЭ DEAE	Полимер Polymer					Солюбилизатор Solubilizer		Условия процесса Process conditions	
		ПЭГ-1500 PEG 1500	ПЭГ-6000 PEG 6000	ПЭГ-8000 PEG 8000	Soluplus®	Kollidon® VA 64	Kolliphor® P 188	Kolliphor® P 407	Температура, °C Temperature, °C	Количество оборотов, об/мин Number of revolutions, rpm
1	25	75							55	25
2	25		75						55	25
3	25		37,5			37,5			100	25
4	25			75					60	25
5	25		37,5	37,5					60	25
6	25			37,5	37,5				80	25
7	25			50			25		65	25
8	25			50				25	65	25

Полученный расплав разливался в формы из пищевого силикона. Формы имели разный процент заполнения с целью получения плиток разной высоты и массы. Полученные сплавы охлаждались при температуре +4 °С до полного отверждения и имели форму тороида, сердца, медведя (рисунок 1).

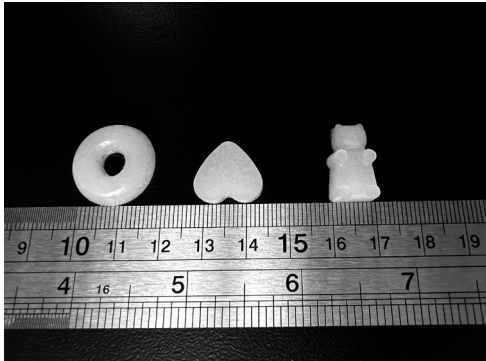


Рисунок 1. Плитки в виде тороида, сердца и медведя (состав 7)

Figure 1. Toroid, heart and bear bars (composition 7)

Описание формы и размеров плитки. Диаметр и толщину плиток определяли с помощью микрометра цифрового InTool. Толщину плитки определяли по самой выступающей части.

Распадаемость плиток. Распадаемость плиток определяли согласно ОФС.1.4.2.0013 «Распадаемость твердых лекарственных форм» в течение 60 мин в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты. Затем меняли среду на буферный раствор с рН = 4,5 и проводили исследование в течение 15 мин. Если плитка не растворилась, меняли среду на буферный раствор с рН = 4,5 и продолжали тест в течение 15 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субстанция ДЭАЭ представляет собой белый и светло-желтый порошок [9], характеризующийся как расплывающийся, так как при проведении испытания на определение гигроскопичности субстанция за 24 ч увеличивается в массе на $(49,39 \pm 0,06) \%$ и растворяется в поглощенной воде, переходя в жидкое агрегатное состояние.

Температура плавления субстанции ДЭАЭ равна 100,2 °С (рисунок 2). Фазовый переход I рода начинается при температуре 91–92 °С.

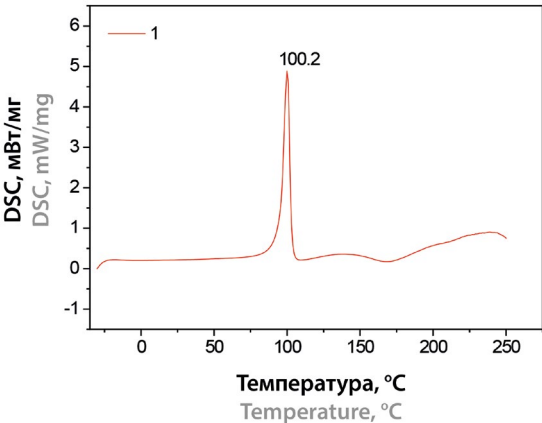


Рисунок 2. Результат дифференциальной сканирующей калориметрии субстанции ДЭАЭ

Figure 2. Result of differential scanning calorimetry of DEAE substance

Для определения подходящего полимера для создания твердых дисперсий были проведены опыты по получению сплавов субстанции ДЭАЭ и поли-

меров (Pol), учитывая их температуры плавления (таблица 2), которые должны были быть близки по значению к температуре плавления ДЭАЭ. Полученные сплавы были изучены по показателю «гигроскопичность» (таблица 3).

Таблица 2. Температуры плавления полимеров [11]

Table 2. Melting points of polymers [11]

Вещество Substance	Внешний вид Appearance	Молекулярная масса, г/моль Molecular weight, g/mol	Температура плавления, °C Melting point, °C
ДЭАЭ DEAE	Белый порошок White powder	548,58	100
ПЭГ-1500 PEG 1500	Белые чешуйки White scales	≈1500	45
ПЭГ-6000 PEG 6000	Белые чешуйки White scales	≈6 000	58
ПЭГ-8000 PEG 8000	Белые чешуйки White scales	≈6 000	60
Soluplus®	Белый порошок White powder	≈118 000	70
Kollidon® VA 64	Белый порошок White powder	≈45 000	101
Kolliphor® P 188	Белый порошок White powder	≈8 500	55
Kolliphor® P 407	Белый порошок White powder	≈12 000	56

Таблица 3. Составы сплавов ДЭАЭ-Pol и прирост массы при $w = 80 \%$, $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Table 3. Compositions of DEAE-Pol alloys and weight gain at $w = 80 \%$, $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

№ образца Sample No.	Масса, г Weight, g					Прирост массы, % Weight increase, %
	ДЭАЭ DEAE	Полимер Polymer				
		ПЭГ-1500 PEG 1500	ПЭГ-6000 PEG 6000	ПЭГ-8000 PEG 8000	Kollidon® VA 64	
1.3	1,0	1,0	–	–	–	32,4 ± 0,9
1.6	1,0	2,0	–	–	–	23,9 ± 0,6
1.7	1,0	–	1,0	–	–	19,0 ± 1,7
1.8	1,0	–	2,0	–	–	18,0 ± 0,4
1.9	1,0	–	–	1,0	–	18,6 ± 1,0
1.10	1,0	–	–	2,0	–	15,7 ± 0,5
1.11	1,0	2,0	–	–	1,0	27,1 ± 1,3
1.12	1,0	–	2,0	–	1,0	17,7 ± 0,7
1.13	1,0	–	–	2,0	1,0	14,0 ± 1,1
1.14	–	2,0	–	–	1,0	20,7 ± 0,6
1.15	–	–	2,0	–	1,0	7,2 ± 0,5
1.16	–	–	–	2,0	1,0	9,3 ± 0,3

Проанализировав полученные данные, можно сделать вывод, что сами водорастворимые полимеры являются гигроскопичными веществами и способны сорбировать до 10 % влаги из воздуха. Поэтому в дальнейшем для снижения влагосорбционной способности, создания стеклоподобного состояния было решено ввести Soluplus® (ПЭГ-6000 – винилкапролакт – винилацетат). Предыдущие исследования [12] показали, что Soluplus® после сплавления хуже растворяется в воде, обеспечивая замедленное высвобождение ДЭАЭ из плиток.

Уменьшение процентного содержания ДЭАЭ позволяет снизить его гигроскопичные свойства и тем самым повысить стабильность в готовой лекарственной форме. Перспективным полимером для создания твердых дисперсий ДЭАЭ-Pol является ПЭГ-8000.

ДЭАЭ выкристаллизовывается из полимеров после охлаждения, поэтому в сплавы добавляли солиubilizаторы, согласно матрице планирования (см. таблицу 1).

Полученные плитки в виде тороида, сердца и медведя подвергли испытанию на распадаемость с целью изучения скорости растворения готовой лекарственной формы. Так как целью исследования было подобрать полимеры, обеспечивающие замедленное высвобождение ДЭАЭ, то определение распадаемости проводили в трех средах с показателем кислотности, соответствующим разным отделам желудочно-кишечного тракта ($\text{pH} = 1,0; 4,5; 6,8$). Однако классический термин «распадаемость» не отражает суть происходящего для такой лекарственной формы, как плитки. Они растворяются в среде и постепенно уменьшаются в размерах. Временем распадаемости принято было считать время, за которое лекарственная форма растворится полностью.

Для проведения исследования показателя «распадаемость» были отобраны плитки разных составов всех трех геометрических фигур разного процента наполнения, а следовательно, высоты и массы. Время распадаемости образцов представлено в таблице 4.

Времена распадаемости плиток в форме медведя и тороида очень близки между собой вне зависимости от состава. С целью увеличения времени распадаемости стоит получать плитки в форме сердца. Время распадаемости для плиток в форме сердца в среднем на 29–47 % больше, чем для плиток в форме медведя или тороида той же массы.

Образец № 6, содержащий в своем составе Soluplus®, позволяет получить плитки с замедленным высвобождением ДЭАЭ и является перспективным для разработки готовой лекарственной формы. Однако введение Soluplus® затрудняет работу с расплавом, так как на воздухе он быстро превращается в стекловидную массу, не обладающую свойством текучести. Возможно, снижение содержания Soluplus® в составе позволит улучшить текучесть расплава.

Таблица 4. Описание и время распадаемости плиток ДЭАЭ-Pol-Sol разных составов

Table 4. Description and disintegration time of different compositions bars of DEAE-Pol-Sol

№ образца Sample No.	Высота плитки, мм Bar height, mm	Масса, г Weight, g	Время распадаемости, мин Disintegration time, min			Описание плитки Description
			pH = 0,1	pH = 4,5	pH = 6,8	
1-b	85 ± 1	1,02 ± 0,02	6,07 ± 0,27	–	–	Мутно-белые, покрытые каплями Cloudy white, covered with drops
	70 ± 1	0,89 ± 0,01	5,78 ± 24	–	–	
1-t	80 ± 1	2,36 ± 0,03	6,83 ± 0,21	–	–	
	45 ± 1	1,02 ± 0,02	4,28 ± 0,19	–	–	
1-h	100 ± 1	1,94 ± 0,03	10,90 ± 0,52	–	–	
	50 ± 1	0,81 ± 0,01	6,03 ± 0,21	–	–	
2-b	90 ± 1	1,20 ± 0,02	17,02 ± 0,80	–	–	Мутно-белые, покрытые каплями Cloudy white, covered with drops
	70 ± 1	0,91 ± 0,01	12,8 ± 0,54	–	–	
2-t	80 ± 1	2,27 ± 0,03	15,00 ± 0,75	–	–	
	62 ± 1	1,72 ± 0,02	12,55 ± 0,51	–	–	
2-h	105 ± 1	1,92 ± 0,02	22,62 ± 1,18	–	–	
	65 ± 1	1,15 ± 0,02	16,93 ± 0,82	–	–	
3-b	85 ± 1	1,29 ± 0,02	27,58 ± 1,33	–	–	Коричневые, без видимых капель Brown, no visible drops
3-t	91 ± 1	2,41 ± 0,03	25,75 ± 1,29	–	–	
3-h	80 ± 1	1,52 ± 0,02	32,33 ± 1,58	–	–	
4-b	90 ± 1	1,43 ± 0,02	17,02 ± 0,83	–	–	Мутно-белые, покрытые каплями Cloudy white, covered with drops
	70 ± 1	0,82 ± 0,01	14,78 ± 0,71	–	–	
4-t	98 ± 1	2,74 ± 0,02	17,87 ± 0,82	–	–	
	80 ± 1	2,10 ± 0,02	16,00 ± 0,74	–	–	
4-h	91 ± 1	1,63 ± 0,02	22,43 ± 1,11	–	–	
	80 ± 1	1,45 ± 0,02	21,60 ± 1,02	–	–	
5-b	80 ± 1	1,03 ± 0,02	15,83 ± 0,72	–	–	Мутно-белые, покрытые каплями Cloudy white, covered with drops
	71 ± 1	0,86 ± 0,01	13,80 ± 0,63	–	–	
5-t	100 ± 1	2,82 ± 0,03	16,63 ± 0,73	–	–	
	51 ± 1	1,25 ± 0,02	11,00 ± 0,52	–	–	
5-h	130 ± 1	2,39 ± 0,03	22,40 ± 1,09	–	–	
	55 ± 1	1,01 ± 0,02	15,63 ± 0,65	–	–	
6-b	87 ± 1	1,24 ± 0,02	–	–	–	Коричневые, матовые Brown, matte
6-t	60 ± 1	2,08 ± 0,03	–	–	–	
6-h	90 ± 1	1,70 ± 0,02	–	–	–	
7-b	85 ± 1	1,11 ± 0,02	18,12 ± 0,71	–	–	Светло-белые, матовые Light white, matte
	55 ± 1	0,57 ± 0,01	11,03 ± 0,45	–	–	
7-t	85 ± 1	2,36 ± 0,03	18,93 ± 0,70	–	–	
	60 ± 1	1,51 ± 0,02	13,42 ± 0,61	–	–	
7-h	118 ± 1	2,10 ± 0,03	27,53 ± 1,32	–	–	
	62 ± 1	1,02 ± 0,02	17,60 ± 0,65	–	–	
8-b	81 ± 1	0,93 ± 0,02	58,50 ± 1,50	–	–	Белые, матовые White, matte
	55 ± 1	0,59 ± 0,01	36,27 ± 1,65	–	–	
8-t	100 ± 1	2,47 ± 0,03	–	5,63 ± 0,14	–	
	60 ± 1	1,37 ± 0,02	46,00 ± 1,70	–	–	
8-h	113 ± 1	1,74 ± 0,02	–	13,05 ± 0,51	–	
	62 ± 1	0,86 ± 0,02	59,00 ± 1,00	2,01 ± 0,34	–	

Примечание. * Буквы в названии состава обозначают форму плитки: b – медведь, t – торонд, h – сердце.

Note. * Letters in the name of the composition indicate the shape of the tile: b – bear, t – toroid, h – heart.

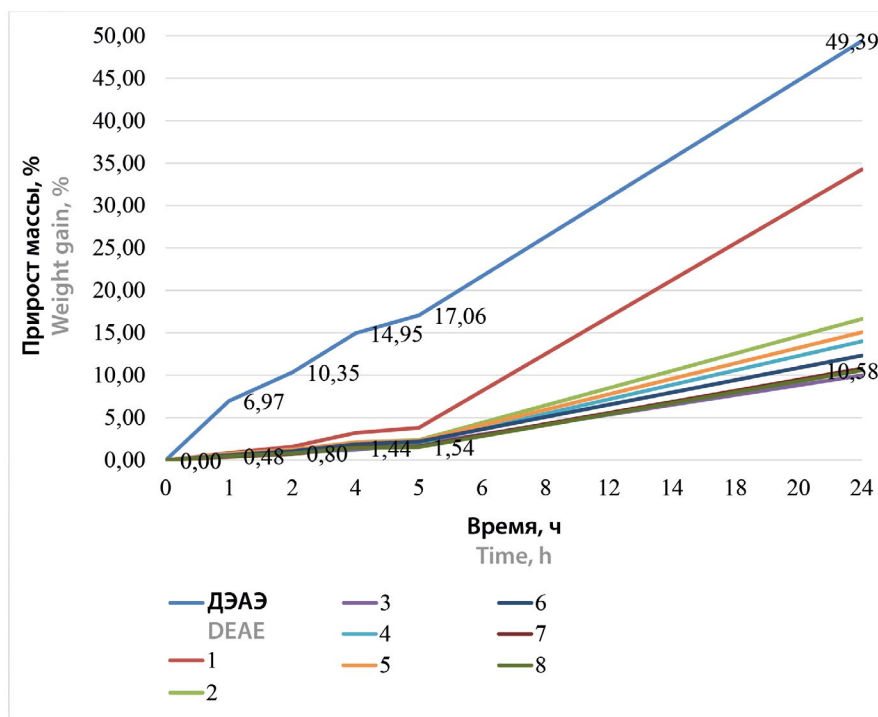


Рисунок 3. Кривые сорбции влаги образцов ДЭАЭ-Pol-Sol

Figure 3. Moisture sorption curves of DEAE-Pol-Sol samples

Сравнение солюбилизаторов Kolliphor® P 188 и Kolliphor® P 407 позволяет сделать вывод, что Kolliphor® P 407 позволяет получить плитки, не покрываемые каплями, матовые, вероятно, за счет снижения степени выкристаллизовывания ДЭАЭ на поверхности. Увеличение содержания Kolliphor® P 407 позволит создавать плитки с замедленным высвобождением.

Плитки ДЭАЭ-Pol-Sol замораживались и измельчались до состояния гранул, просеивались через сито 1,5 мм. Полученный гранулят исследовался на гигроскопичность. График изменения массы образцов за счет поглощения влаги из воздуха при относительной влажности 80 % и температуре 25 °C представлен на рисунке 3.

Введение ДЭАЭ в полимерную матрицу позволяет снижать его гигроскопичность. Наименьшим приростом массы через 24 ч обладали образцы, содержащие Soluplus® и Kolliphor®. Сорбция влаги образцами, содержащими Kolliphor® P 407, была сопоставима с образцами с Kolliphor® P 188. Но из-за превосходящих органолептических свойств перспективным солюбилизатором, предотвращающим кристаллизацию ДЭАЭ, является Kolliphor® P 407.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существуют разные технологические подходы к снижению гигроскопичности лекарственных веществ. Включение веществ, обладающих высокой способно-

стью сорбировать влагу из воздуха, в матрицу полимера позволяет снизить контакт лекарственного вещества с окружающей средой. Перспективными для дальнейшей разработки плиток, содержащих ДЭАЭ, оказались составы на основе Soluplus® и Kolliphor® P 407. Однако необходим подбор и определение оптимального соотношения полимера и солюбилизатора для улучшения технологических свойств плиток, снижения гигроскопичности, создания пролонгированного высвобождения ДЭАЭ. С целью создания плиток с замедленным высвобождением рекомендуется использовать формы в виде сердечек, так как у них меньше площадь поверхности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Dhondale M.R., Thakor P., Nambiar A.G., Singh M., Agrawal A.K., Shastri N.R., Kumar D. Co-Crystallization Approach to Enhance the Stability of Moisture-Sensitive Drugs. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):189. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010189.
2. Rajabi-Siahboomi A.R., Levina M., Upadhye S.B., Tackoe J. Excipient Selection in Oral Solid Dosage Formulations Containing Moisture Sensitive Drugs. *Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery*. 2015;385–421. DOI: 10.1007/978-3-319-20206-8_13.
3. Fu Z.-Z., Yao Y.-H., Guo S.-J., Wang K., Zhang Q., Fu Q. Effect of Plasticization on Stretching Stability of Poly(Vinyl Alcohol) Films: A Case Study Using Glycerol and Wa-

- ter. *Macromolecular Rapid Communications*. 2023;44(1): e2200296. DOI: 10.1002/marc.202200296.
4. Kumari L., Choudhari Y., Patel P., Das Gupta G., Singh D., Rosenholm J.M., Kumar Bansal K., Das Kurmi B. Advancement in Solubilization Approaches: A Step towards Bioavailability Enhancement of Poorly Soluble Drugs. *Life*. 2023;13(5):1099. DOI: 10.3390/life13051099.
 5. Newman A. W., Reutzel-Edens S. M., Zografi G. Characterization of the "hygroscopic" properties of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(3):1047–1059. DOI: 10.1002/jps.21033.
 6. Thakur T. S., Thakuria R. Crystalline Multicomponent Solids: An Alternative for Addressing the Hygroscopicity Issue in Pharmaceutical Materials. *Crystal Growth & Design*. 2020;20(9):6245–6265. DOI: 10.1021/acs.cgd.0c00654.
 7. Cheow W. S., Kiew T. Y., Hadinoto K. Combining inkjet printing and amorphous nanonization to prepare personalized dosage forms of poorly-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;96:314–321. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.08.012.
 8. Emery E., Oliver J., Pugsley T., Sharma J., Zhou J. Flowability of moist pharmaceutical powders. *Powder Technology*. 2009;189(3):409–415. DOI: 10.1016/j.powtec.2008.06.017.
 9. Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Flisyuk E. V., Generalova Yu. E. Tablet Development for a Hygroscopic Drug Using Solid Dispersion. *Drug development & registration*. 2020;9(1): 23–28. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-23-28.
 10. Ng L. H., Ling J. K. U., Hadinoto K. Formulation Strategies to Improve the Stability and Handling of Oral Solid Dosage Forms of Highly Hygroscopic Pharmaceuticals and Nutraceuticals. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2015. DOI: 10.3390/pharmaceutics14102015.
 11. Kolter K., Karl M., Gryczke A. Hot-melt extrusion with BASF pharma polymers. 2nd edition. 2012. 201 p.
 12. Terenteva O. A., Gusev K. A., Tikhonova V. V., Maimistov D. N., Shandryuk G. A., Flisyuk E. V. Three-dimensional printing of ramipril tablets by fused deposition modeling. *Drug development & registration*. 2021;10(4):79–87. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-79-87.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.014.2; 615.453

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1874>



Изучение растворимости нифедипина в физических смесях и твердых дисперсиях

Н. Д. Дахма¹✉, Е. Т. Жиликова¹, М. Д. Дахма²

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

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 (Пироговский Университет)]. 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

✉ Контактное лицо: Дахма Нермин Джозеф. E-mail: narmeendahma@gmail.com

ORCID: Н. Д. Дахма – <https://orcid.org/0009-0000-6421-6052>;

Е. Т. Жиликова – <https://orcid.org/0000-0002-8685-1601>;

М. Д. Дахма – <https://orcid.org/0009-0003-0838-6657>.

Статья поступила: 10.07.2024

Статья принята в печать: 07.11.2024

Статья опубликована: 08.11.2024

Резюме

Введение. Низкая растворимость лекарственных веществ в воде часто ограничивает биодоступность лекарственных препаратов при пероральном приеме. Нифедипин, широко применяемый в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, принадлежит к группе очень малорастворимых веществ в соответствии с фармакопеями. Поэтому одной из задач разработки состава и технологии лекарственного средства с нифедипином является разработка методики повышения его растворимости. В данном исследовании изучается применение технологии твердых дисперсий (ТД) и физических смесей (ФС) с целью повышения растворимости нифедипина.

Цель. Разработка технологической методики повышения растворимости нифедипина путем разработки ФС и ТД с целью создания лекарственной формы с улучшенными свойствами.

Материалы и методы. В исследовании использовались нифедипин, метанол, стандартные образцы нифедипина, дигидрофосфат калия, гептансульфонат натрия, ортофосфорная кислота (85 %), вода очищенная и поливинилпирролидон К-30. Исследования растворимости проводились методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием трех объектов: нифедипина, физической смеси и ТД нифедипина с ПВП К-30. В исследовании оценивалось влияние различных соотношений (нифедипин:ПВП К-30) в ФС и ТД на растворимость нифедипина. Для характеристики образцов применялись методы инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК-фурье-спектроскопия) и рентгеновской дифрактометрии.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о повышении растворимости нифедипина в физической смеси с ПВП К30 (ФС3) в соотношении 1:3, которая составила 9,70 %. В ТД3 с ПВП К30 при соотношении 1:3 растворимость увеличивалась до 32,07 % по сравнению с этим показателем для субстанции нифедипина (0,24 %). Анализ инфракрасной спектроскопии не выявил значимых взаимодействий между нифедипином и ПВП К30. Повышение растворимости обусловлено комбинированным эффектом солюбилизующих свойств носителя и перехода нифедипина из кристаллической формы в аморфную в гидрофильной матрице ПВП К30, что подтверждается результатами рентгеновской дифрактометрии (PXRD).

Заключение. Результаты исследования демонстрируют значительный потенциал технологии ТД для повышения растворимости и биодоступности малорастворимых лекарственных веществ, таких как нифедипин (в 134 раза в ТД3 при соотношении нифедипина и ПВП К-30 1:3). Полученные данные подтверждают эффективность данного подхода и открывают новые перспективы для разработки инновационных лекарственных форм с улучшенными фармакокинетическими свойствами на основе ТД нифедипина.

Ключевые слова: нифедипин, твердые дисперсии, метод удаления растворителя, растворимость, поливинилпирролидон (ПВП К-30)

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

© Дахма Н. Д., Жиликова Е. Т., Дахма М. Д., 2024

© Dahma N. J., Zhilyakova E. T., Dahma M. J., 2024

Вклад авторов. Н. Д. Дахма – автор разработал методы синтеза физических смесей и твердых дисперсий и провел аналитические эксперименты с использованием ВЭЖХ, ИК-фурье-спектроскопии и рентгеновской дифрактометрии. Все авторы внесли вклад в написание статьи и обсуждение результатов.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность сирийской компании «Тамико» за предоставление субстанции для проведения исследования и за возможность использования аналитического оборудования.

Для цитирования: Дахма Н. Д., Жилиякова Е. Т., Дахма М. Д. Изучение растворимости нифедипина в физических смесях и твердых дисперсиях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):107–112. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1874>

Study of nifedipine solubility in physical mixtures and solid dispersions

Nermin Joseph Dahma¹✉, Elena T. Zhilyakova¹, Michel Joseph Dahma²

¹ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Belgorod National Research University". 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «N. I. Pirogov Russian National Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSAEI HE N. I. Pirogov RNRMU MOH Russia). 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

✉ **Corresponding author:** Nermin Josef Dahma. **E-mail:** narneendahma@gmail.com

ORCID: Nermin Joseph Dahma – <https://orcid.org/0009-0000-6421-6052>;

Elena T. Zhilyakova – <https://orcid.org/0000-0002-8685-1601>;

Michel Joseph Dahma – <https://orcid.org/0009-0003-0838-6657>.

Received: 10.07.2024

Accepted: 07.11.2024

Published: 08.11.2024

Abstract

Introduction. Poor aqueous solubility significantly hinders the bioavailability of numerous orally administered drugs. Nifedipine, a widely-used cardiovascular agent, is categorized as practically insoluble according to pharmacopoeias, thus presenting a significant challenge in formulation development. This study investigates the potential of solid dispersion (SD) technology and physical mixtures to improve the dissolution profile of nifedipine.

Aim. Development of a technological method for increasing the solubility of nifedipine by developing physical mixtures and SD with the aim of creating a dosage form with improved properties.

Materials and methods. nifedipine, methanol, nifedipine standard samples, potassium dihydrogen phosphate, sodium heptanesulfonate, phosphoric acid (85 %), purified water, and pvp K-30. Solubility studies were performed by HPLC using three objects: nifedipine, a physical mixture (PM), and SD of nifedipine with PVP K-30. The study assessed the effect of different ratios (nifedipine:PVP K-30) in the physical mixture and SD on nifedipine solubility. Fourier transform infrared spectroscopy (IR spectroscopy) and powder X-ray diffractometry were used to characterize the samples.

Results and discussion. A notable increase in nifedipine solubility was observed in both PM3 (1:3 nifedipine:PVP K-30) and SD3 (1:3 nifedipine:PVP K-30). PM3 exhibited a solubility of 9.70 %, while SD3 demonstrated a remarkable enhancement to 32.07 % compared to the pure nifedipine (0.24 %). FTIR analysis did not reveal significant interactions between nifedipine and PVP K-30. PXRD results confirmed the transition of nifedipine from a crystalline to amorphous form within the hydrophilic PVP K-30 matrix, contributing to the observed solubility enhancement.

Conclusion. The study highlights the effectiveness of SD technology in significantly improving nifedipine solubility and potential bioavailability. The 134-fold increase in solubility achieved with SD3 at a 1:3 ratio demonstrates the significant potential of this approach for enhancing the pharmacokinetic properties of poorly soluble drugs. This research opens up new avenues for developing innovative formulations with improved dissolution characteristics and potentially enhanced therapeutic efficacy.

Keywords: nifedipine, solid dispersions, solvent removal method, solubility, polyvinylpyrrolidone (PVP K-30)

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

Contribution of the authors. N.D. Dakhma – author developed methods for the synthesis of physical mixtures and solid dispersions and performed analytical experiments using HPLC, FTIR spectroscopy and X-ray diffractometry. All authors contributed to the writing of the article and the discussion of the results.

Acknowledgment. The authors express their sincere gratitude to the Syrian Arab Medical Company "Tamico" for providing the substance for the study, as well as for the opportunity to use analytical equipment.

For citation: Dahma N. J., Zhilyakova E. T., Dahma M. J. Study of nifedipine solubility in physical mixtures and solid dispersions. *Drug development & registration*. 2024;13(4):107–112. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1874>

ВВЕДЕНИЕ

Пероральный путь введения лекарств остается наиболее распространенным и предпочтительным благодаря своей безопасности и простоте [1]. Однако растворимость лекарственного вещества в воде является одним из ключевых факторов, определяющих его биодоступность и эффективность [2]. Низкая растворимость в воде и, как следствие, низкая биодоступность препарата ведут к снижению его эффективности [3]. По данным научной литературы, 90 % лекарственных препаратов, находящихся на стадии разработки, и 40 % уже коммерциализированных препаратов малорастворимы, что негативно сказывается на их биодоступности [4]. Для решения этой проблемы активно разрабатываются различные подходы, направленные на повышение растворимости малорастворимых веществ. К традиционным методам относятся: уменьшение размера частиц, изменение формы кристаллов, образование солей и другие методы, такие как сверхкритическая флюидизация [5]. Однако эти методы имеют определенные ограничения в практическом применении. В последние десятилетия внимание исследователей привлек метод получения ТД, который позволяет повысить скорость растворения и абсорбции лекарств [6]. ТД представляют собой дисперсию одного или нескольких активных ингредиентов в инертном носителе в твердом состоянии. Этот подход обеспечивает значительное преимущество в разработке лекарственных форм, особенно для лекарств с малой растворимостью, ограничивающей их биодоступность [7, 8]. Метод испарения растворителя является одним из наиболее часто используемых в фармацевтической промышленности методов улучшения растворимости малорастворимых в воде лекарственных средств. Основной принцип этого метода заключается в том, что лекарственное средство и носитель растворяются в летучем растворителе, который потом удаляется, создавая твердую систему с повышенной растворимостью [9]. Нифедипин, относящийся к классу II по биофармацевтической классификации (высокая проницаемость, низкая растворимость), имеет ограниченную биодоступность при пероральном приеме [10]. Разработка ТД нифедипина является актуальной задачей, так как способна значительно улучшить его биодоступность, обеспечить быстрое и предсказуемое начало действия, а также снизить вариабельность индивидуальных ответов пациентов [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. нифедипин (Tamico, Сирия); метанол и стандартные образцы нифедипина (Biosolve Chimie, Франция); дигидрофосфат калия, гептансульфонат натрия и ортофосфорная кислота (85 %) (ISO-LAB Laborgeräte GmbH, Германия); вода очищенная и ПВП К-30 (Merck KGaA, Германия).

Приготовление физической смеси нифедипина. Физические смеси нифедипина с поливинилпирролидоном К-30 (ПВПК-30) готовили путем тщательного смешивания в ступке до достижения гомогенного состояния в соотношениях нифедипин:ПВПК-30 1:1, 1:3, 1:5, 1:6, 1:7. Полученную смесь просеивали через сито (Blau-Metall, Германия) с размером ячеек 250 мкм. Соотношение компонентов и обозначение приготовленных физических смесей представлены в таблице 1.

Таблица 1. Соотношение компонентов физических смесей и их обозначение

Table 1. Ratio of physical mixtures components and their designation

№ ФС No. PM	Соотношение нифедипин : ПВП К-30 Nifedipine : PVP K-30 ratio	Обозначение Symbol
1	1:1	ФС1 PM1
2	1:3	ФС3 PM3
3	1:5	ФС5 PM5
4	1:6	ФС6 PM6
5	1:7	ФС7 PM7

Приготовление ТД методом удаления растворителя с использованием носителя ПВП К-30. ТД нифедипина с ПВП К-30 получали методом удаления растворителя. Лекарственное вещество и носитель растворяли в метаноле и перемешивали до получения однородной смеси. Затем растворитель удаляли при постоянном перемешивании на нагревательной платформе с использованием магнитной мешалки (VELP Scientifica, Италия) при температуре 55 °С. После полного удаления растворителя полученные ТД собирали, измельчали в ступке и просеивали через сито (Blau-Metall, Германия) с размером ячеек 250 мкм. ТД были приготовлены в пяти различных соотношениях нифедипина:ПВП К-30 (1:1, 1:3, 1:5, 1:6, 1:7). Соотношение компонентов и обозначение приготовленных ТД нифедипина представлены в таблице 2.

Исследование растворимости и скорости растворения нифедипина в физических смесях и твердых дисперсиях. В стакан емкостью 250 мл помещали 150 мл воды, добавляли 150 мг нифедипина и перемешивали на магнитной мешалке. Для изучения кинетики растворения отбирали по 5 мл раствора образца через 5, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин. Затем среду компенсировали очищенной водой, образцы фильтровали через шприцевые фильтры Minisart® (Lab Unlimited, Ирландия) с размером пор 0,45 мкм (материал фильтра – нейлон) и определяли концентрацию нифедипина методом ВЭЖХ.

Таблица 2. Соотношение компонентов ТД и их обозначение

Table 2. Ratio of SD components and their designation

№ ТД No. SD	Соотношение нифедипин : ПВП К-30 Nifedipine : PVP K-30 ratio	Обозначение Symbol
1	1:1	ТД1 SD1
2	1:3	ТД3 SD3
3	1:5	ТД5 SD5
4	1:6	ТД6 SD6
5	1:7	ТД7 SD7

Количественное определение. Исследования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проводились с использованием хроматографа ChroZen (Younglin Chromass, Южная Корея) на системе Agilent Technologies серии 1200. Хроматографические условия:

Колонка	Hypersil ODS (Agilent Technologies), 5 мкм, 4,6 × 250 мм.
Элюент	Метанол – вода очищенная – фосфатный буфер (рН 3; 0,05 М) – гептансульфонат натрия, 65:35:3:0,13 (об/об/об/мас).
Скорость потока	0,8 мл/мин.
Температура колонки	25 °С.
Детектор	УФ-фотодиод, 235 нм.
Объем пробы	20 мкл.

Приготовление растворов. Фосфатный буфер с рН 3,0 готовили растворением 6,8 г дигидрофосфата калия в 1000 мл очищенной воды. Для корректировки рН до 3,0 добавляли несколько капель ортофосфорной кислоты. Подвижную фазу перед использованием фильтровали под вакуумом через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Для приготовления стандартного раствора нифедипина 50 мг стандартного образца нифедипина переносили в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляли приблизительно 20 мл метанола и 50 мл подвижной фазы. Содержимое колбы обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин для полного растворения стандарта. Затем раствор в колбе разбавляли подвижной фазой до конечного объема, получая раствор с концентрацией 500 мкг/мл.

Рентгеноструктурный анализ. Для определения физического состояния лекарственного вещества, носителей и ТД проводили рентгеноструктурный анализ с использованием дифрактометра STOE STADI P, оборудованного источником излучения CuKα с напряжением 40 кВ и током 30 мА. Анализ проводился в двух диапазонах углов 2θ: 0–50°, с шагом 0,020° и временем экспозиции 30,0 с на каждом шаге.

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR). Спектры FTIR были получены с помощью FTIR-спектрофотометра Thermo Nicolet Avatar (LabX Midland, Канада) в диапазоне 4000–400 см⁻¹ с оптическим разрешением 4 см⁻¹. Образцы (нифедипин, ТД3, физические смеси, ФС3) измельчали, тщательно смешивали с бромидом калия (KBr) и прессовали в диски. Полученные спектры FTIR сравнивали для выявления возможных взаимодействий между лекарственным веществом и носителями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование растворимости нифедипина методом ВЭЖХ. Результаты исследования растворимости нифедипина, полученные методом ВЭЖХ, показали, что применение технологии твердых дисперсий приводит к значительному повышению растворимости нифедипина по сравнению с исходным лекарственным веществом и физическими смесями. Результаты исследования растворимости нифедипина представлены в таблице 3.

Таблица 3. Растворимость нифедипина в физических смесях и ТД

Table 3. Solubility of nifedipine in physical mixtures and SD

Обозначение Designation	Растворимость, мкг/мл Solubility, mcg/ml	Растворимость, % Percentage of solubility, %
Нифедипин	2,4	0,24
ФС1 PM1	62,7199	6,27
ФС3 PM3	97,0334	9,70
ФС5 PM5	83,8398	8,38
ФС6 PM6	89,4271	8,94
ФС PM	89,4271	8,94
ТД1 SD1	188,06	18,81
ТД3 SD3	320,69	32,07
ТД5 SD5	258,35	25,84
ТД6 SD6	283,29	28,33
ТД7 SD7	265,06	26,51

Как видно из данных, представленных в таблице 4, растворимость нифедипина значительно повысилась в случае ФС3, достигнув значения 9,7 %, а в случае ТД3 – 32,07 %, по сравнению с нифедипином – 0,24 %. Повышенная растворимость в ФС3 и ТД3 обусловлена гидрофильными и поверхностно-активными свойствами ПВП-К30, который улучшает смачи-

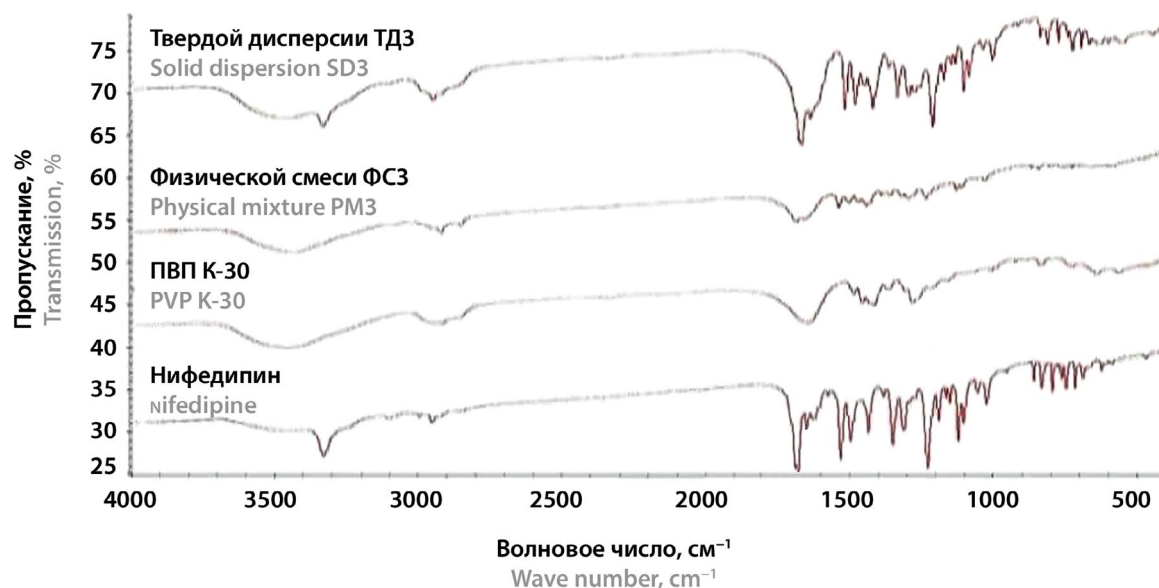


Рисунок 1. ИК-фурье-спектры: нифедипина, ПВП К-30, физической смеси ФСЗ, твердой дисперсии ТДЗ

Figure 1. IR Fourier spectra: nifedipine, PVP K-30, physical mixture PM3, solid dispersion SD3

ваемость частиц нифедипина, способствуя его более быстрому растворению. Кроме того, ПВП-К30 может влиять на кристаллическую структуру нифедипина, что также может способствовать повышению растворимости.

Результаты инфракрасной спектроскопии. Полученные ИК-фурье-спектры нифедипина, ПВП К30, физической смеси ФСЗ и твердой дисперсии ТДЗ в диапазоне 4000–500 см⁻¹ представлены на рисунке 1.

ИК-спектры нифедипина и ПВП К30 характеризуются наличием основных пиков при определенных

длинах волн, соответствующих валентным колебаниям связей, как показано в таблице 4.

Как показано в таблице 4 и на рисунке 1, спектры FTIR ФСЗ и ТДЗ демонстрируют все характерные пики нифедипина и ПВП К30. Отсутствие значительных сдвигов в волновых числах пиков в спектрах свидетельствует об отсутствии взаимодействий между нифедипином и ПВП К30.

Результаты рентгенофазового анализа. Результаты рентгенофазового анализа подтверждают физическое состояние нифедипина, ПВП К30 и твердой дисперсии ТДЗ. Рентгеновские дифрактограммы представлены на рисунке 2.

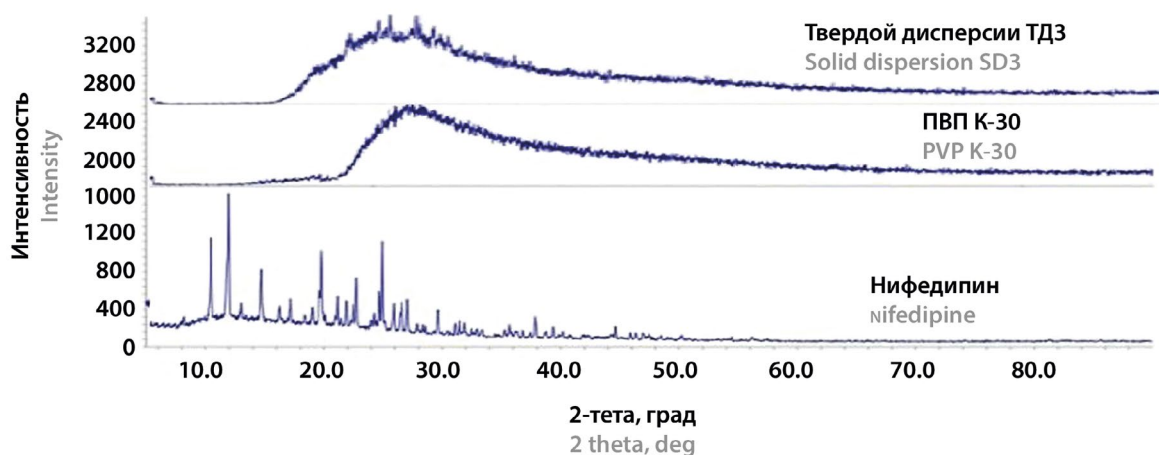


Рисунок 2. Результаты исследования порошковой рентгеновской дифракции

Figure 2. Results of powder X-ray diffraction study

Таблица 4. Пики спектра FTIR
и соответствующие им растянутые связи

Table 4. Peaks of the FTIR spectrum
and the corresponding stretched bond

Характерные пики нифедипина, см ⁻¹ Characteristic peaks of nifedipine, cm ⁻¹	Растянутая связь Stretch
3331	N—H
2960	C—H
1679	C=O
1121	C—O
Характерные пики ПВП К-30, см ⁻¹ Characteristic peaks of PVP K-30, cm ⁻¹	Растянутая связь Stretch
3455	N—H
1652	C=C
1289	O—H

Результаты рентгеновского дифракционного анализа, представленные на рисунке 2, подтверждают кристаллическую структуру нифедипина, характеризующуюся наличием многочисленных четких пиков при 2-тета, составляющих 8,5°, 10,6°, 11,9°. ПВП К30 демонстрирует аморфную структуру, о чем свидетельствует наличие нескольких пиков с низкой интенсивностью. ТДЗ также проявляет аморфную структуру. Данное наблюдение указывает на значительную потерю кристаллической структуры нифедипина и образование твердых растворов в матрице полимера ПВП К30, что обуславливает наблюдаемое повышение растворимости нифедипина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о повышении растворимости нифедипина в ФСЗ, составившей 9,70 %. В ТДЗ растворимость увеличилась до 32,07 % по сравнению с субстанцией нифедипина (0,24 %). PXRD был принят в этом исследовании для определения физического состояния препарата в ТД, и он показал отсутствие кристаллическости нифедипина. Кроме того, отсутствие сдвигов в волновых числах пиков FTIR ТД по сравнению с физической смесью указывает на отсутствие значительного взаимодействия между компонентами ТД. Результаты исследования подтверждают потенциал технологии твердых дисперсий для повышения растворимости и биодоступности нифедипина. Данный подход обещает улучшение фармакокинетических свойств препарата, оптимизацию высвобождения действующего вещества из лекарственной формы, а также снижение потенциальных побочных эффектов за счет возможности снижения дозы. Исходя из полученных данных, представляется целесообразным продолжить исследования с целью разработки оптимального состава и инновационной лекарственной формы, включающей твердые дисперсии нифедипина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Alqahtani M. S., Kazi M., Alsenaidy M. A., Ahmad M. Z. Advances in Oral Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:1–21. DOI: 10.3389/fphar.2021.618411.
2. Kumari L., Choudhari Y., Patel P., Das Gupta G., Singh D., Rosenholm J. M., Kumar Bansal K., Das Kurmi B. Advancement in Solubilization Approaches: A Step towards Bioavailability Enhancement of Poorly Soluble Drugs. *Life*. 2023;13(5):1099. DOI: 10.3390/life13051099.
3. Fink C., Sun D., Wagner K., Schneider M., Bauer H., Dolgos H., Mäder K., Peters S.-A. Evaluating the Role of Solubility in Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs Using Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling. *Clinical Pharmacology & Therapeutic*. 2020;107(3):650–661. DOI: 10.1002/cpt.1672.
4. Mahmood T., Sarfraz R. M., Ismail A., Ali M., Khan A. R. Pharmaceutical Methods for Enhancing the Dissolution of Poorly Water-Soluble Drugs. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2023;21(2):65–79. DOI: 10.1089/adt.2022.119.
5. Patel M. S. N., Ahmed M. H., Saqib M., Shaikh S. N. Chemical Modification: A unique solutions to Solubility problem. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2019;9(2):542–546. DOI: 10.22270/jddt.v9i2.2432.
6. Tambe S., Jain D., Kishore Meruva S., Rongala G., Juluri A., Nihalani G., Kumar Mamidi H., Kumar Nukul P. Kumar Bolla P. Recent Advances in Amorphous Solid Dispersions: Preformulation, Formulation Strategies, Technological Advancements and Characterization. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2203. DOI: 10.3390/pharmaceutics14102203.
7. Pate K., Shah S., Pate J. Solid dispersion technology as a formulation strategy for the fabrication of modified release dosage forms: A comprehensive review. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;30(1):165–189. DOI: 10.1007/s40199-022-00440-0.
8. Malkawi R., Malkawi W. I., Al-Mahmoud Y., Tawalbeh J. Current Trends on Solid Dispersions: Past, Present, and Future. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 2022;1–17. DOI: 10.1155/2022/5916013.
9. Tran P., Pyo Y.-C., Kim D.-H., Lee S.-E., Kim J.-K., Park J.-S. Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):132. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030132.
10. Todorović N., Panić J. Č., Pavlić B., Popović S., Ristić I., Rakić S., Rajšić I., Vukmirović S., Srđenić Čonić B., Miličević B., Milošević N., Lalić-Popović M. Supercritical fluid technology as a strategy for nifedipine solid dispersions formulation: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2024;649:123634. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123634.
11. Kaushik R., Budhwar V., Kaushik D. An Overview on Recent Patents and Technologies on Solid Dispersion. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2020;14(1):63–74. DOI: 10.2174/1872211314666200117094406.



Применение напрессованных покрытий для создания таблеток пролонгированного действия на основе гигроскопичных субстанций

Ю. М. Коцур[✉], О. А. Терентьева, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич

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

✉ Контактное лицо: Коцур Юлия Михайловна. E-mail: uliya.kocur@spcru.ru

ORCID: Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;

О. А. Терентьева – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>;

Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 22.10.2024

Статья принята в печать: 25.11.2024

Статья опубликована: 26.11.2024

Резюме

Введение. Разработка универсальных подходов к работе с гигроскопичными субстанциями является актуальной задачей фармацевтической технологии. Особого внимания заслуживает нанесение покрытий на таблетки с гигроскопичными субстанциями. Напрессованные покрытия представляют собой перспективный способ нанесения оболочек на таблетки гигроскопичных субстанций. Такое покрытие может способствовать как приданию заданных характеристик высвобождения действующего вещества в таблетке, так и защите его от факторов окружающей среды, а также может быть альтернативой получению матричных таблеток пролонгированного действия с гигроскопичными субстанциями в тех случаях, когда прямой контакт АФС с полимерным носителем нежелателен.

Цель. Изучение возможности применения напрессованных покрытий для управления кинетикой высвобождения гигроскопичных субстанций из таблеток на примере ДЭАЭ.

Материалы и методы. Объектом настоящего исследования являлась субстанция бис[2-[(2Z)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандионат (ДЭАЭ), шеллак (BonuLac®, Bioground GmbH, Германия); сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата (AquaPolish® 712, Bioground GmbH, Германия); сополимер поливинилпирролидона и поливинилацетата (Kollidon® SR, BASF, Германия), этилцеллюлоза (Acros Organics, США). В качестве наполнителя в составы добавляли лактозы моногидрат (Tablettose® 80, Meggle AG, Германия). Для улучшения распадаемости использовали супердезинтегрант кросповидон XL, а также лубрикант стеарилфумарат натрия (JRS, Германия).

Результаты и обсуждение. Изучены свойства напрессованных покрытий. Смесь для покрытия на основе шеллака может быть пригодна для получения кишечнорастворимого покрытия для растворения в среде с pH 4,5. Соплимер ПВП и ПВА не обеспечивает устойчивости покрытий в кислой среде, однако его введение в составы с этилцеллюлозой, а также в составы с сополимером метакриловой кислоты и этилакрилата позволяет добиться равномерного высвобождения во всех средах в течение 5 часов.

Заключение. Проведенное исследование показало возможность применения напрессованных покрытий для управления кинетикой высвобождения АФС. Покрытие, полученное при помощи такой технологии, может быть использовано для гигроскопичных субстанций. Данный метод является полезной альтернативой в случае необходимости разделения матрицеобразующего полимера и АФС, обладающих синергетическими гигроскопичными свойствами.

Ключевые слова: гигроскопичная субстанция, напрессованное покрытие, управление кинетикой высвобождения, пролонгированное высвобождение, кишечнорастворимое покрытие

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

Вклад авторов. Ю. М. Коцур и О. А. Терентьева планировали и проводили экспериментальные работы. Ю. М. Коцур, О. А. Терентьева, Е. В. Флисюк и И. А. Наркевич участвовали в обработке и интерпретации результатов, а также в подготовке статьи.

Для цитирования: Коцур Ю. М., Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Наркевич И. А. Применение напрессованных покрытий для создания таблеток пролонгированного действия на основе гигроскопичных субстанций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):113–120. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1952>

Application of press-coatings for the development of prolonged release tablets based on hygroscopic substances

Yuliya M. Kotsur✉, Oksana A. Terenteva, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich

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

✉ **Corresponding author:** Yuliya M. Kotsur. **E-mail:** uliya.kocur@spcpcu.ru

ORCID: Yuliya M. Kotsur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;
Oksana A. Terenteva – <https://orcid.org/0000-0001-6391-2689>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 22.10.2024

Accepted: 25.11.2024

Published: 26.11.2024

Abstract

Introduction. The development of universal approaches to work with hygroscopic substances is an urgent task of pharmaceutical technology. Coating of tablets with hygroscopic substances deserves special attention. Pressed coatings represent a promising method for coating hygroscopic tablets. Such coating can contribute both to imparting the specified release characteristics to the tablet, and to the protection of APS from environmental factors, as well as can be an alternative to obtaining matrix tablets of prolonged action with hygroscopic substances in those cases when direct contact of APS with the polymeric carrier is undesirable.

Aim. Study of the possibility of using pressed coatings to control the kinetics and release site of hygroscopic substances from tablets using DEAE as an example.

Materials and methods. The object of the present study was the substance bis[2-[(2Z)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanaminium] butanedioneate (DEAE), shellac (BonuLac®, Bioground GmbH, Germany); copolymer of methacrylic acid and ethyl acrylate (AquaPolish® 712, Bioground GmbH, Germany); copolymer of polyvinylpyrrolidone and polyvinyl acetate (Kollidon® SR, BASF, Germany), ethyl cellulose (Acros Organics, USA). Lactose monohydrate (Tablettose® 80, Meggle AG, Germany) was added to the formulations as an excipient. The superdisintegrant crospovidone XL and the lubricant sodium stearyl fumarate (JRS, Germany) were used to improve disintegration.

Results and discussion. The properties of the pressed coatings were studied. Shellac-based coating mixture may be suitable for obtaining enteric soluble coating for dissolution in medium with pH 4.5. PVP and PVA copolymer does not provide stability of coatings in acidic medium, but its introduction into formulations with ethyl cellulose, as well as into formulations with copolymer of methacrylic acid and ethyl acrylate allows to achieve uniform release in all media within 5 hours.

Conclusion. The study showed the possibility of using pressed coatings to control the kinetics of API release. The coating obtained using this technology can be used for hygroscopic substances. This method is a useful alternative when it is necessary to separate the matrix-forming polymer and the API, which have synergistic hygroscopic properties.

Keywords: hygroscopic substance, pressed coating, release kinetics control, prolonged release, enteric coating

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. Yuliya M. Kotsur and Oksana A. Terenteva planned and carried out the experimental work. Yuliya M. Kotsur, Oksana A. Terentyeva, Elena V. Flisyuk and Igor A. Narkevich participated in the processing and interpretation of the results and in the preparation of the article.

For citation: Kotsur Yu. M., Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Application of press-coatings for the development of prolonged release tablets based on hygroscopic substances. *Drug development & registration*. 2024;13(4):113–120. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1952>

ВВЕДЕНИЕ

Гигроскопичность фармацевтических субстанций является критичной физико-химической характеристикой, которая влияет на выбор лекарственной формы, технологию производства, качественный состав вспомогательных веществ в лекарственном препарате, а также на требования к производственным по-

мещениям, в частности к контролю температуры и влажности [1].

При разработке твердых пероральных лекарственных форм (например, таблеток) с гигроскопичными субстанциями, как правило, сталкиваются со следующими проблемами: низкой сыпучестью компонента, которая препятствует его равномерному рас-

пределению и однородности дозирования; склонностью к растеканию, что приводит к липкости таблеточных масс и затруднению технологического процесса; деградацией вещества и увеличением количества примесей, что может приводить как к снижению терапевтического эффекта, так и к проявлению нежелательных реакций, а также в целом ухудшать качество получаемого продукта [2, 3].

Разработка универсальных подходов к работе с гигроскопичными субстанциями является актуальной задачей фармацевтической технологии.

Особого внимания заслуживает нанесение покрытий на таблетки с гигроскопичными субстанциями. Среди технологий покрытия таблеток, при которых контакт действующего вещества интерес представляет технология напрессованных покрытий. Такое покрытие может способствовать как приданию заданных характеристик высвобождения таблетке, так и защите активных фармацевтических субстанций (АФС) от факторов окружающей среды. Кроме того, данное покрытие может быть альтернативой получению матриксных таблеток пролонгированного действия с гигроскопичными субстанциями в тех случаях, когда прямой контакт АФС с полимерным носителем нежелателен [3, 4].

Так, например, при получении матриксных каркасов из сополимера ПВП и ПВА, а также из сополимера метакриловой кислоты и этилакрилата с включенным в них ДЭАЭ гигроскопичность таблеток увеличивалась по сравнению с АФС. С течением времени полученные таблетки поглощали влагу и становились влажными.

Таблетки с напрессованным покрытием имеют структуру многослойную структуру «ядро – оболочка», обеспечивающую последовательное высвобождение: сначала слои оболочки контактируют со средой, а затем происходит воздействие среды растворения на ядро таблетки [5]. Таким образом, можно добиться различных режимов высвобождения, регулируя состав таблеток ядра и слоя оболочки [6]. Однако особая структура «ядро – оболочка» создает трудности в производстве. Такие таблетки имеют высокий риск расслоения из-за неравномерной прочности многослойных таблеток [7, 8].

Целью настоящего исследования являлось изучение возможности применения напрессованных покрытий для управления кинетикой и местом высвобождения гигроскопичных субстанций из таблеток на примере ДЭАЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом настоящего исследования являлась субстанция бис[2-[(2Z)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина] бутандионат (ДЭАЭ) ФГУП «СКТБ «Технолог» (Россия), представляющая собой гигроскопичный, комкующийся белый порошок [9–11].

В качестве полимеров, способствующих длительному высвобождению АФС из таблетки, использовали: шеллак (BonuLac®, Bioground GmbH, Германия); сополимер метакриловой кислоты и этилакрилата (Aqua-Polish® 712, Bioground GmbH, Германия); сополимер поливинилпирролидона (ПВП) и поливинилацетата (ПВА) (Kollidon® SR, BASF, Германия), этилцеллюлозу (Acros Organics, США). В качестве наполнителя в составы добавляли лактозы моногидрат (Tabletose® 80, Meggle AG, Германия). Для улучшения распадаемости использовали супердезинтегрант кросповидон XL, а также лубрикант стеарилфумарат натрия (JRS, Германия).

Для приготовления сред растворения использовали реактивы: хлористоводородную кислоту ос.ч. (ООО «Октант», Россия), калий фосфорнокислый однозамещенный (АО «ЛенРеактив», Россия), натрий фосфорнокислый двузамещенный, 12-водный (АО «ЛенРеактив», Россия).

Приготовление таблеточных смесей для таблеток-ядер, а также смесей для покрытия осуществляли методом смешения компонентов в бинновом смесителе со скоростью вращения 13 об/мин в течение 10 мин. Опудривание осуществляли в том же смесителе при той же скорости вращения в течение 5 мин.

Получение таблеток-ядер ДЭАЭ, а также получение напрессованных покрытий осуществляли в однопуансонном лабораторном таблеточном прессе C&C600A (Beijing C&C Cambcavi Co., Ltd., Китай). Для получения ядер использовали пресс-инструмент плоскоцилиндрический диаметром 7 мм, масса таблеток-ядер – 100 мг (таблица 1) [12]. Для получения покрытий использовали пресс-инструмент плоскоцилиндрический диаметром 9 мм.

Таблица 1. Составы таблеток-ядер

Table 1. Compositions of core tablets

Компонент Component	Содержание в 1 таблетке Content in 1 tablet		Функциональное назначение вещества Functional purpose of the substance
	мг mg	%	
АФС API	25,0	25,0	Действующее вещество Active ingredient
Кальция гидрофосфат Calcium hydrophosphate	47,8	47,8	Наполнитель Excipient
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	50,5	11,2	Наполнитель Excipient
Крахмал картофельный Potato starch	15,0	15,0	Дезинтегрант, связующее, наполнитель Desintegrant, binder, excipient
Магния стеарат Magnesium stearate	1,0	1,0	Лубрикант Lubricant
Итого Total	100,0	100,0	

В работе определяли сыпучесть получаемых составов для напрессованных покрытий в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания, ОФС.1.4.2.0016 «Сыпучесть порошков».

С целью определения наиболее подходящих составов и их доработки предварительно изучали распадаемость таблеток с напрессованными покрытиями в соответствии с ОФС.1.4.2.0013 «Распадаемость твердых лекарственных форм». В течение 60 мин определяли устойчивость покрытий к воздействию кислой среды, после чего среду заменяли на фосфатный буферный раствор с pH 4,5, а по истечении 15 мин меняли на фосфатный буферный раствор с pH 6,8. Таким образом устанавливали устойчивость покрытий в различных отделах ЖКТ.

Изучение кинетики высвобождения осуществляли в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0014 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», а именно для таблеток с пролонгированным высвобождением. Устанавливали следующие временные интервалы: через 1 ч проведения теста в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты отбирали пробу объемом 10 мл, после чего заменяли среду растворения на фосфатный буферный раствор с pH 4,5, проводили растворение в течение 1 ч и отбирали пробу объемом 10 мл, заменяли среду на фосфатный буферный раствор с pH 6,8 и отбирали пробу объемом 10 мл через 1, 2 и 3 ч (суммарное время растворения составило 5 ч). Отбираемый объем восполняли средой растворения. Отобранные пробы фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. Испытуемые растворы готовили следующим образом: 5 мл фильтрата помещали в колбу вместимостью 25 мл, доводили раствор до метки соответствующей средой растворения.

Стандартный раствор. Навески 0,040 г (точная навеска) стандартного образца 2-(N,N-диэтиламино)-этилового эфира бутендиовой кислоты, 0,010 г (точная навеска) стандартного образца янтарной кислоты и 1,25 мл раствора maleиновой кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 20 мл соответствующей среды растворения, доводили объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Количественное содержание вещества, перешедшего в среду растворения, определяли методом ВЭЖХ на колонке Phenomenex Luna 5 мкм Phenyl-Hexyl, 250 × 4,6 мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали буферный раствор с pH 3 и метанол в соотношении 9:1, скорость потока – 1,0 мл/мин, температура колонки – 35 °C, длина волны детектора – 280 нм для 2-(4-гидрокси-4-оксобутеноилокси)-N,N-диэтилэтанаминия-иона.

Для испытуемых образцов и стандартного раствора получали не менее 5 хроматограмм в заданных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для предварительного определения типов полимеров, которые могли бы быть использованы для получения напрессованных покрытий для пролонгированного высвобождения, получали составы 1–4 (см. таблицу 1) по методике, описанной выше. В составы добавляли гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) K4M для обеспечения лучшей прессуемости, а также опудривающий агент натрия стеарилфумарат. Результаты определения сыпучести приведены в таблице 2. Составы 1–3 обладали удовлетворительной сыпучестью, в то время как состав 4 требовал доработки для повышения сыпучести.

Для всех составов получали напрессованные покрытия в соотношении 1:1 (масса таблетки-ядра: масса покрытия). Усилие прессования в момент получения покрытий для составов 1, 2 и 4 находилось в интервале от 8 до 12 кН, что свидетельствует о хорошей прессуемости полученных порошков. Покрытие состава 3, полученное при том же усилии прессования, обладало низкой прочностью (менее 30 Н).

В результате изучения распадаемости полученных таблеток с покрытием было определено, что состав 3 не выдерживает испытание в кислой среде, что, вероятно, связано с низкой прочностью полученной таблетки. Составы 2 и 4 демонстрировали устойчивость во всех средах растворения, а состав под номером 1 выдерживал испытание в кислой среде и распадался за 15 мин в среде с pH 4,5.

Таким образом, смесь для покрытия на основе шеллака может быть пригодна для получения кишечнорастворимого покрытия.

Также были получены дополнительные составы 5–8 (см. таблицу 1). Для повышения распадаемости в составы 5 и 6 был введен супердезинтегрант кросповидон и для улучшения сыпучести – лактозы моногидрат Tablettose® 80. В составах 7 и 8 дополнительно были скомбинированы полимеры для обеспечения оптимальной кинетики высвобождения ДЭАЭ. Результаты определения сыпучести приведены в таблице 2.

Из составов 5–8 получали напрессованные покрытия в соотношении 1:1 и 1:2 от массы ядра. Для составов удалось незначительно снизить усилие прессования, которое находилось в интервале от 7 до 10 кН, при этом прочность таблеток была увеличена.

Проводили изучение кинетики высвобождения ДЭАЭ для полученных таблеток в соответствии с условиями, описанными выше. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

Анализ полученных данных показал, что применение сополимера метакриловой кислоты и этилакри-

Таблица 2. Составы и свойства покрытий
Table 2. Coating formulations and properties

	Состав 1 Composition 1	Состав 2 Composition 2	Состав 3 Composition 3	Состав 4 Composition 4	Состав 5 Composition 5	Состав 6 Composition 6	Состав 7 Composition 7	Состав 8 Composition 8
BonuLac®	69,0							
AquaPolish® 712		69,0				40,0	41,7	
Kollidon SR®			99,0				13,3	13,3
Этилцеллюлоза Ethylcellulose				69,0	40,0			41,7
ГПМЦ К4М HPMC K4M	30,0	30,0		30,0	15,0	15,0	10,0	10,0
Лактозы моногидрат Tablettose® 80 Lactose Monohydrate Tablettose® 80					34,0	34,0	24,0	24,0
Кросповидон Crospovidone					10,0	10,0	10,0	10,0
Стеарат магния Magnesium Stearate	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Сыпучесть, с/100 г Flowability, s/100 g	12,8 ± 2,2	11,4 ± 1,3	15,2 ± 1,8	8,6 ± 1,8	15,1 ± 0,7	14,3 ± 1,2	16,8 ± 2,0	17,2 ± 0,7
Прочность на раздавливание, Н Crushing strength, N	50,7 ± 2,8	44,1 ± 2,5	28,3 ± 1,5	52,7 ± 1,2	65,3 ± 1,9	71,1 ± 2,3	64,5 ± 3,1	70,2 ± 0,9

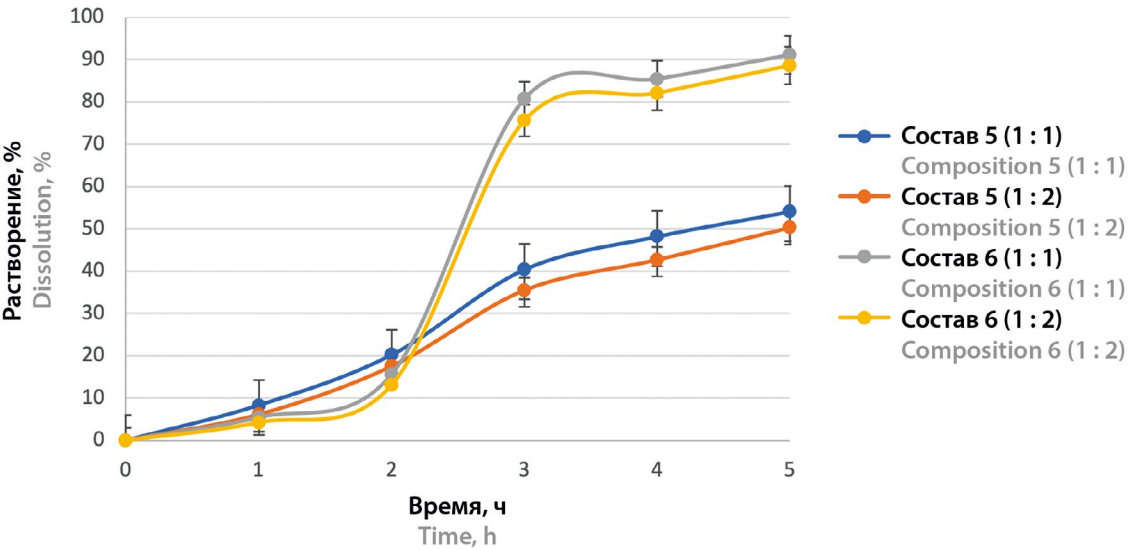


Рисунок 1. Кривая высвобождения ДЭАЭ из таблеток состава 5 и состава 6
Figure 1. Release curve of DEAE from tablets formulation 5 and formulation 6

лата в комбинации с супердезинтегрантом (состав 6) позволяет получить напрессованное покрытие, обеспечивающее высвобождение ДЭАЭ практически полностью в среде с рН 6,8, независимо от толщины покрытия.

В аналогичных исследованиях было установлено, что комбинация сополимера метакриловой кислоты и этилакрилата с ГПМЦ высокой вязкости позволяет существенно замедлить высвобождение. Замедленного высвобождения (5–6 ч) также можно

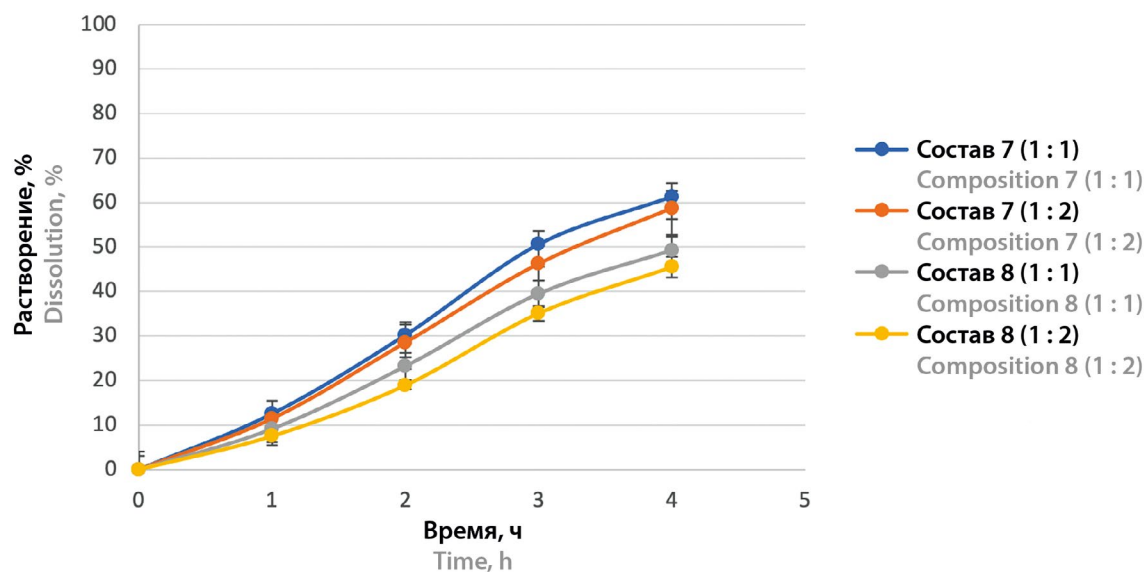


Рисунок 2. Кривая высвобождения ДЭАЭ из таблеток состава 7 и состава 8

Figure 2. Release curve of DEAE from tablets formulation 7 and formulation 8

достигнуть, используя в составах лишь ГПМЦ высокой вязкости [7]. Также высвобождение удастся замедлить до 10 ч при комбинировании сополимеров метакриловой кислоты и этилакрилата с различной степенью полимеризации и отличным количеством свободных гидроксильных групп. Так, например, в исследовании Sri Lekha et al. удалось достичь линейной кинетики высвобождения и замедления от 5 до 10 ч при использовании Eudragit® L100 и Eudragit® S100 (1:2).

Комбинация этилцеллюлозы с супердезинтегрантом (состав 5) обеспечивает пролонгированное высвобождение ДЭАЭ в течение 5 ч. При этом увеличение массы и толщины покрытия способствует более длительному высвобождению ДЭАЭ. В подобных исследованиях были получены такие же результаты для ацеклофенака с использованием в качестве матрицеобразующего полимера комбинации ГПМЦ высокой вязкости и низкой вязкости (от 12 до 18 %) [7].

Покрытия, содержащие в себе сополимер ПВП и ПВА в комбинации с этилцеллюлозой (состав 8), также способны обеспечивать пролонгированное высвобождение ДЭАЭ, несмотря на низкую устойчивость сополимера ПВП и ПВА в кислой среде. Данный эффект может быть обусловлен повышением прочности покрытия за счет введения связующих компонентов.

Состав 7, содержащий сополимер ПВП и ПВА в комбинации с сополимером метакриловой кислоты и этилакрилата, позволял пролонгировать высвобождение ДЭАЭ в среде с pH 6,8, однако при этом в

среде с pH 1,2 высвобождалось большее количество действующего вещества, чем при использовании только сополимера метакриловой кислоты и этилакрилата [13, 14].

В ряде исследований в качестве основного полимера в составе используют ГПМЦ различной вязкости, а также другие производные целлюлозы [13, 14]. Исследователи отмечают, что характеристики высвобождения зависят не только от состава, но и от технологических параметров в процессе получения напессованного покрытия, отмечается связь усилия прессования и скорости высвобождения действующих веществ [6, 8, 13]. Однако чрезмерно высокое усилие сжатия может привести к деградации ядра таблетки, в связи с чем данный аспект требует дополнительного изучения. В представленной работе все покрытия были получены при одинаковом усилии прессования, что позволило оценить влияние непосредственно состава на скорость высвобождения ДЭАЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало возможность применения напессованных покрытий для управления кинетикой высвобождения и местом высвобождения АФС. Покрытие, полученное при помощи такой технологии, может быть использовано для гигроскопичных субстанций. Данный метод является полезной альтернативой в случае необходимости разделения матрицеобразующего полимера и АФС, обладающих синергетическими гигроскопичными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

- Rajabi-Siahboomi A. R., Levina M., Upadhye S. B., Teckoe J. Excipient Selection in Oral Solid Dosage Formulations Containing Moisture Sensitive Drugs. *Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery*. 2015:385–421. DOI: 10.1007/978-3-319-20206-8_13.
- Newman A. W., Reutzel-Edens S. M., Zografi G. Characterization of the "hygroscopic" properties of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(3):1047–1059. DOI: 10.1002/jps.21033.
- Mabrouki H. E., Kaukhova I. E. Formulation and Development of Aqueous Film Coating for Moisture Protection of Hygroscopic *Herniaria glabra* L. Tablets. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*. 2022;19(2):153–160. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.99248.
- Ng L. H., Ling J. K. U., Hadinoto K. Formulation Strategies to Improve the Stability and Handling of Oral Solid Dosage Forms of Highly Hygroscopic Pharmaceuticals and Nutraceuticals. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2015. DOI: 10.3390/pharmaceutics14102015.
- Guo Y., Xiao P., Dong H., Guo X., Yin T., Zhang Y., He H., Wang Y., Gou J., Tang X. Effect of compression process parameters on the physical properties and in vitro release mechanism of the press-coated nifedipine matrix sustained-release tablets. *Powder Technology*. 2023;429:118884. DOI: 10.1016/j.powtec.2023.118884.
- Ascani S., Berardi A., Bisharat L., Bonacucina G., Cespi M., Palmeri G. F. The influence of core tablets rheology on the mechanical properties of press-coated tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;135:68–76. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.05.011.
- Rashid R., Zaman M., Ahmad M., Khan M. A., Butt M. H., Salawi A., Almoshari Y., Alshamrani M., Sarfraz R. M. Press-Coated Aceclofenac Tablets for Pulsatile Drug Delivery: Formulation and In Vitro Evaluations. *Pharmaceutics*. 2022;15(3):326. DOI: 10.3390/ph15030326.
- Nguyen T.-T., Park H.-R., Cho C.-H., Hwang K.-M., Park E.-S. Investigation of critical factors affecting mechanical characteristics of press-coated tablets using a compaction simulator. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;582:119308. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119308.
- Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Наркевич И. А. Разработка состава и технологии таблеток нового нейрорепроторного средства с использованием дробного факторного эксперимента. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):18–22. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.
- Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Флисюк Е. В., Генералова Ю. Э. Разработка таблеток, содержащих гигроскопичное активное вещество, с применением твердых дисперсий. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(1):23–28. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-23-28.
- Терентьева О. А., Белоусова И. С., Ефремов И. В., Флисюк Е. В. Изучение физико-химических и технологических свойств фармацевтической субстанции на основе бис[2-[(2E)-4-гидроски-4-оксо-бут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». Санкт-Петербург, 14–15 ноября. СПб.: Изд-во СПХФУ; 2018. С. 369–372.
- Коцур Ю. М., Церковная К. М., Флисюк Е. В., Титович И. А., Сидоров К. О., Наркевич И. А. Роль геометрической конфигурации производного диэтиламиноэтанола в фармацевтической разработке готовой лекарственной формы на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):96–100. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1583.
- Picart L., Mazel V., Moulin A., Bourgeaux V., Tchoreloff P. Controlling the lag-time and release kinetics of press-coated tablets using process parameters and tablet geometry. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;627:122252. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.122252.
- Sri Lekha G. S., Sunitha Reddy M., Nagarjuna M. Formulation and evaluation of time-controlled pulsatile release rosuvastatin press-coated tablets. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2022;8(9):444–454. DOI: 10.36348/sjmps.2022.v08i09.003.

REFERENCES

- Rajabi-Siahboomi A. R., Levina M., Upadhye S. B., Teckoe J. Excipient Selection in Oral Solid Dosage Formulations Containing Moisture Sensitive Drugs. *Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery*. 2015:385–421. DOI: 10.1007/978-3-319-20206-8_13.
- Newman A. W., Reutzel-Edens S. M., Zografi G. Characterization of the "hygroscopic" properties of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(3):1047–1059. DOI: 10.1002/jps.21033.
- Mabrouki H. E., Kaukhova I. E. Formulation and Development of Aqueous Film Coating for Moisture Protection of Hygroscopic *Herniaria glabra* L. Tablets. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*. 2022;19(2):153–160. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.99248.
- Ng L. H., Ling J. K. U., Hadinoto K. Formulation Strategies to Improve the Stability and Handling of Oral Solid Dosage Forms of Highly Hygroscopic Pharmaceuticals and Nutraceuticals. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2015. DOI: 10.3390/pharmaceutics14102015.
- Guo Y., Xiao P., Dong H., Guo X., Yin T., Zhang Y., He H., Wang Y., Gou J., Tang X. Effect of compression process parameters on the physical properties and in vitro release mechanism of the press-coated nifedipine matrix sustained-release tablets. *Powder Technology*. 2023;429:118884. DOI: 10.1016/j.powtec.2023.118884.
- Ascani S., Berardi A., Bisharat L., Bonacucina G., Cespi M., Palmeri G. F. The influence of core tablets rheology on the mechanical properties of press-coated tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;135:68–76. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.05.011.
- Rashid R., Zaman M., Ahmad M., Khan M. A., Butt M. H., Salawi A., Almoshari Y., Alshamrani M., Sarfraz R. M. Press-Coated Aceclofenac Tablets for Pulsatile Drug Delivery: Formulation and In Vitro Evaluations. *Pharmaceutics*. 2022;15(3):326. DOI: 10.3390/ph15030326.
- Nguyen T.-T., Park H.-R., Cho C.-H., Hwang K.-M., Park E.-S. Investigation of critical factors affecting mechanical characteristics of press-coated tablets using a compaction simulator. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;582:119308. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119308.

- tion simulator. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;582:119308. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119308.
9. Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A. Development of the Composition and Technology of New Neuroprotective Drug Tablets Using Fractional Factorial Design. *Drug development & registration*. 2020;9(1):18–22. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-18-22.
 10. Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Flisyuk E. V., Generalova Yu. E. Tablet Development for a Hydroscopic Drug Using Solid Dispersion. *Drug development & registration*. 2020;9(1):23–28. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-1-23-28.
 11. Terenteva O. A., Belousova I. S., Efremov I. V., Flisyuk E. V. Study of the physicochemical and technological properties of a pharmaceutical substance based on bis{2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanamium} butanedioate. The materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation «Innovations in the health of the nation». St. Petersburg, November 14–15. SPb.: Publishing house SPHFU; 2018. P. 369–372. (In Russ.)
 12. Kotsur Yu. M., Tserkovnaya K. M., Flisyuk E. V., Titovich I. A., Sidorov K. O., Narkevich I. A. The Role of the Geometric Configuration of Diethylaminoethanol Derivative in the Pharmaceutical Development of a Dosage Form Based on It. *Drug development & registration*. 2023;12(4):96–100. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1583.
 13. Picart L., Mazel V., Moulin A., Bourgeaux V., Tchoreloff P. Controlling the lag-time and release kinetics of press-coated tablets using process parameters and tablet geometry. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;627:122252. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.122252.
 14. Sri Lekha G. S., Sunitha Reddy M., Nagarjuna M. Formulation and evaluation of time-controlled pulsatile release rosuvastatin press-coated tablets. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2022;8(9):444–454. DOI: 10.36348/sjmps.2022.v08i09.003.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.012

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1931>



Разработка состава топической формы производного тиадиазола

Ю. М. Коцур✉, Т. Ф. Черных, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич

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

✉ **Контактное лицо:** Коцур Юлия Михайловна. **E-mail:** uliya.kocur@spcru.ru

ORCID: Ю. М. Коцур – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;
Т. Ф. Черных – <https://orcid.org/0009-000-1539-8013>;
Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 09.09.2024

Статья принята в печать: 26.11.2024

Статья опубликована: 26.11.2024

Резюме

Введение. Разработка антибактериальных препаратов широкого спектра действия для лечения бактериальных и грибковых инфекций кожи животных является актуальной задачей фармацевтической промышленности, медицины и сельскохозяйственной промышленности. Наиболее перспективной лекарственной формой для лечения поверхностных инфекционных заболеваний является гель. Наиболее важными преимуществами являются отсутствие побочных эффектов, связанных с приемом внутрь, а также образование защитной пленки, препятствующей повторному инфицированию животного.

Цель. Разработка состава топической формы в виде геля на основе активной фармацевтической субстанции, обладающей широким спектром антимикробного действия, для терапии инфекционных заболеваний кожных покровов животных.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась оригинальная субстанция – производное тиадиазола, полученное отделом органического синтеза кафедры органической химии ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России. В работе были использованы гелеобразователи (натрия альгинат и карбомер), пропиленгликоль, поверхностно-активные вещества (ПАВ) и пр. Полученные гели тиадиазола изучены по показателям: pH, внешнему виду, термостабильности, коллоидной стабильности, образованию пленки; кроме того, определены реологические свойства гелей.

Результаты и обсуждение. Установлено, что гели, в которых в качестве гелеобразователей выступали одновременно альгинат натрия и карбомер, обладали тиксотропными свойствами, обеспечивающими наилучшую стабильность структуры. Гели, в состав которых был добавлен глицерин, образовывали упругую пленку, препятствующую повреждению и высыханию кожного покрова животного.

Заключение. В результате проведенного исследования был разработан состав топической формы в виде геля, содержащего новое производное тиадиазола, предназначенное для лечения инфекционных заболеваний кожных покровов животных.

Ключевые слова: топическая форма, гель для наружного применения, новое производное тиадиазола, реологические свойства, динамическая вязкость

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

Вклад авторов. Ю. М. Коцур и Т. Ф. Черных спланировали эксперимент. Ю. М. Коцур проводила запланированные исследования. Т. Ф. Черных, Е. В. Флисюк и Ю. М. Коцур участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании статьи.

Для цитирования: Коцур Ю. М., Черных Т. Ф., Флисюк Е. В., Наркевич И. А. Разработка состава топической формы производного тиадиазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):121–128. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1931>

Development of a topical formulation of a thiadiazole derivative

Yuliya M. Kotsur✉, Tatyana F. Chernykh, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich

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

✉ **Corresponding author:** Yuliya M. Kotsur. **E-mail:** uliya.kocur@spcru.ru

© Коцур Ю. М., Черных Т. Ф., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., 2024

© Kotsur Yu. M., Chernykh T. F., Flisyuk E. V., Narkevich I. A., 2024

ORCID: Yuliya M. Kotsur – <https://orcid.org/0000-0001-9292-4240>;
Tatyana F. Chernykh – <https://orcid.org/0009-000-1539-8013>;
Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;
Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 09.09.2024

Accepted: 26.11.2024

Published: 26.11.2024

Abstract

Introduction. Development of broad-spectrum antibacterial medicines for treatment of bacterial and fungal infections of animal skin is an urgent task of pharmaceutical industry, medicine and agricultural industry. The most promising dosage form for the treatment of superficial infectious diseases is gel. The most important advantages are the absence of side effects associated with ingestion, as well as the formation of a protective film that prevents re-infection of the animal.

Aim. To develop the composition of topical form in the form of gel on the basis of active pharmaceutical substance with a wide spectrum of antimicrobial action for therapy of infectious diseases of animal skin.

Materials and methods. The object of the study was an original substance – thiadiazole derivative, obtained by the organic synthesis department of the Department of Organic Chemistry of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education SPHFU of the Ministry of Health of Russia. Gel formers (sodium alginate and carbomer), propylene glycol, surfactants (surfactants), etc. were used in the work. The obtained thiadiazole gels were studied in terms of pH, appearance, thermostability, colloidal stability, film formation, in addition, the rheological properties of the gels were determined.

Results and discussion. It was found that gels in which sodium alginate and carbomer acted simultaneously as gel formers had thixotropic properties providing the best stability of the structure. The gels in which glycerin was added formed an elastic film preventing damage and drying of the animal skin.

Conclusion. As a result of this study, a topical formulation in the form of a gel containing a new thiadiazole derivative was developed for the treatment of infectious diseases of animal skin.

Keywords: topical form, gel for external application, new thiadiazole derivative, rheological properties, dynamic viscosity

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. Yuliya M. Kotsur and Tatyana F. Chernykh planned the experiment. Yuliya M. Kotsur carried out the planned research. Tatyana F. Chernykh, Elena V. Flisyuk and Yuliya M. Kotsur participated in data processing, discussion of results and writing the article.

For citation: Kotsur Yu. M., Chernykh T. F., Flisyuk E. V., Narkevich I. A. Development of a topical formulation of a thiadiazole derivative. *Drug development & registration*. 2024;13(4):121–128. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1931>

ВВЕДЕНИЕ

Поражение кожных покровов животных бактериальными и грибковыми инфекциями является серьезной угрозой для благосостояния сельскохозяйственной промышленности Российской Федерации. Экономический ущерб от заболеваний животных исчисляется десятками миллионов [1–20].

Осложняется проблема тем, что существующие на рынке лекарственные препараты для терапии таких инфекций направлены зачастую только на один вид возбудителя. Таким образом, поиск эффективных средств для лечения грибковых и бактериальный патологий кожи животных является актуальным [2].

Наиболее эффективными средствами лечения в данном случае представляются гели для наружного применения. Во-первых, это связано с удобством применения и достаточно быстрым наступлением эф-

фекта. Во-вторых, применение антибактериальных препаратов внутрь для сельскохозяйственных животных нежелательно: известно, что метаболиты некоторых активных ингредиентов могут содержаться, например, в молоке коровы или других продуктах, используемых в дальнейшем человеком. При наружном применении попадание антибактериальных компонентов в системный кровоток маловероятно, таким образом, появляется возможность избежать подобных нежелательных эффектов [5–8].

И в-третьих, пленка, которая зачастую образуется при использовании геля, позволит создавать защитный слой на поверхности кожи, который бы препятствовал повторному инфицированию животного [9, 10].

На основании вышеизложенного цель данной работы была определена как разработка состава топической формы в виде геля на основе активной фар-

мацевтической субстанции, обладающей широким спектром антимикробного действия, для терапии инфекционных заболеваний кожных покровов животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом настоящего исследования являлась активная фармацевтическая субстанция, синтезированная отделом органического синтеза кафедры органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Субстанция представляет собой молекулу из группы тиадиазолов, обладающую широким спектром антимикробного действия [1, 2]. Субстанция, мелкодисперсный порошок желтого цвета, обладает выраженными красящими свойствами, практически нерастворима в воде.

При проведении исследования получали гели тиадиазола различных составов. В качестве гелеобразователя применяли альгинат натрия (Китай). В предварительных исследованиях данный гелеобразователь показал лучшие органолептические свойства в сравнении с такими полимерами, как гидроксипропилцеллюлоза и ксантановая камедь. К числу изученных органолептических свойств гелей относились: внешний вид, цвет, запах, текучесть, распределяемость. Так, при относительно низком содержании гелеобразователя натрия альгината (2,0 %) гель обладал достаточной упругостью, приятной консистенцией и не растекался, при этом гель был прозрачным и бесцветным [11].

Альтернативным гелеобразователем был выбран карбомер 980 (Китай), представляющий собой акриловый сополимер, вязкость и растворимость которого зависит от pH растворителя. В связи с этим для подщелачивания воды очищенной при растворении карбомера использовали триэтаноламин.

В качестве поверхностно-активных веществ (ПАВ) для стабилизации гетерогенной системы были выбраны твин-80 (Merk KGaA, Германия) и кремофор RH-40 (Sigma-Aldrich, США).

Для обеспечения дополнительной антимикробной стабильности полученной лекарственной формы, а также в качестве активатора всасывания в состав геля был введен пропиленгликоль. Пропиленгликоль представляет собой бесцветную вязкую жидкость со слабым характерным запахом, сладковатым вкусом, обладающую гигроскопическими свойствами. При использовании в качестве компонента мазевой основы способен повышать проницаемость клеточных мембран [11, 12].

Все используемые вспомогательные вещества на момент исследования обладали неистекшим сроком годности.

Концентрация действующего вещества была выбрана на основании предварительных исследований [1–3].

Концентрации гелеобразователя и вспомогательных веществ выбраны на основании проведенных ранее аналогичных работ. Использование карбомера в качестве единственного гелеобразователя в условиях применения гелей у животных представлялось нецелесообразным, так как подобные гели не позволяли добиться требуемой пленки [11, 18].

Для определения оптимального состава были рассмотрены несколько составов гелей, приведенных в таблице 1.

Таблица 1. Составы гелей

Table 1. Gel formulations

Компоненты, % Components, %	Состав 1 Composition 1	Состав 2 Composition 2	Состав 3 Composition 3	Состав 4 Composition 4
Тиадиазол Thiadiazole	3,0	3,0	3,0	3,0
Натрия альгинат Sodium Alginate	2,0	2,0	2,0	2,0
Карбомер 980 Carbomer 980	–	–	0,5	0,5
Триэтаноламин Triethanolamine	–	–	0,3	0,3
Пропиленгликоль Propylen glycol	10,0	10,0	10,0	10,0
Твин-80 Twin 80	2,0	2,0	2,0	2,0
Кремофор RH-40 Cremophor RH-40	1,0	1,0	1,0	1,0
Глицерин Glycerine	–	15,0	–	15,0
Вода очищенная Purified Water	до 100,0	до 100,0	до 100,0	До 100,0

Компоненты гелей отweighивали в соответствии с составами 1–4. В рассчитанном количестве воды очищенной, нагретой до ~50–60 °С, растворяли альгинат натрия при постоянном перемешивании с использованием верхнеприводной пропеллерной мешалки Heidolph RZR 2020 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия). Скорость вращения мешалки составила 150–200 об/мин. Набухание и полное растворение альгината натрия составило около 2 ч. Для составов 3 и 4 раствор альгината натрия подщелачивали триэтаноламином, а затем добавляли карбомер и перемешивали с той же скоростью вращения мешалки в течение 15–20 мин до полного растворения компонента.

В отдельной емкости готовили взвесь тиадиазола в пропиленгликоле, полученную суспензию добавляли в раствор гелеобразователей, тщательно гомогенизировали, используя ту же мешалку. После добавляли оставшиеся компоненты в соответствии с составами и перемешивали до образования однородного вязкого непрозрачного геля желтого цвета.

Таблица 2. Характеристики полученных гелей
Table 2. Characteristics of the obtained gels

Показатели Parameters	Состав 1 Composition 1	Состав 2 Composition 2	Состав 3 Composition 3	Состав 4 Composition 4
pH	5,74 ± 0,02	5,68 ± 0,04	6,81 ± 0,03	7,02 ± 0,02
Динамическая вязкость, мПа · с Viscosity, mPa · s	10144 ± 78 (n = 3)	9768 ± 34 (n = 3)	12012 ± 96 (n = 3)	12977 ± 81 (n = 3)
Термостабильность Thermostability	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable
Коллоидная стабильность Colloidal stability	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable	Стабилен Stable

Ключевыми характеристиками в данной работе были выбраны: внешний вид, вязкость, тиксотропные свойства, способность к высыханию с образованием защитной пленки, pH, а также стабильность.

Указанные характеристики были выбраны в результате предварительных исследований гелей на основе производного тиадиазола на животных [3, 4].

Динамическую вязкость полученных гелей определяли при помощи ротационного вискозиметра Anton Paar (Дания) с применением шпинделя L4. Навеску геля, эквивалентную объему около 50 мл, помещали в прозрачную стеклянную емкость, термостатировали при 25 °C в течение 60 мин, после чего определяли вязкость геля при скорости вращения шпинделя 20 с⁻¹ (при данной скорости наблюдался наибольший крутящий момент). Для построения петель гистерезиса измерение проведено в диапазоне скоростей сдвига от 50 до 0,5 с⁻¹ и от 0,5 до 50 с⁻¹ при температуре 25 °C. Для каждого исследуемого состава в диапазоне скоростей сдвига значение крутящего момента находилось в допустимых пределах (от 10 до 100 %). На основании полученных данных строили петли гистерезиса [12–14].

Для определения степени высыхания полученные гели наносили тонким слоем на чашки Петри и помещали в климатическую камеру постоянных условий Memmert HPP110 (Mettmert GmbH, Германия). Условия проведения испытания: относительная влажность – 40 %; температура – 25 °C; время испытания – 24 ч¹.

По истечении 24 ч извлекали образцы гелей из климатической камеры и оценивали внешний вид, а именно однородность геля и цвет.

Показатель pH полученного геля определяли потенциометрически в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XV изд., ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия», с использованием pH-метра «Аквилон» pH-410 (Россия). pH-метр снабжен

комбинированным электродом, что позволяет применять его для определения pH в мазах и гелях².

Коллоидную стабильность гелей определяли путем центрифугирования на центрифуге MPW-351 (MPW Med. Instruments, Польша). Для проведения испытания отбирали по 3 образца каждого геля массой около 2,0 г, помещали в центрифужные пробирки вместимостью 2,5 мл, термостатировали образцы в течение 20 мин при температуре 42–45 °C. Пробирки устанавливали в гнезда центрифуги и проводили центрифугирование в течение 5 мин при скорости вращения ротора 6000 об/мин (100 с⁻¹). После центрифугирования пробирки вынимали из гнезд и визуально оценивали наличие или отсутствие расслоения. Гель считали соответствующим требованиям коллоидной стабильности в том случае, если отсутствовало видимое расслоение.

Термостабильность определяли путем термостатирования при температуре 40–42 °C в термостате Jeio Tech (Корея). Для проведения испытания образцы гелей помещали в цилиндры вместимостью 25 см³, наполняя их на 2/3 объема, накрывали пробками и помещали в термостат. Термостатирование проводили в течение 24 ч, после визуально определяли наличие или отсутствие расслоения. Гель считали стабильным, если не наблюдалось видимого расслоения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения исследования были получены гели четырех разных составов. Все гели представляли собой вязкие непрозрачные жидкости ярко-желтого цвета.

Результаты изучения характеристик гелей приведены в таблице 2.

В процессе проведения доклинических исследований было установлено, что гели на альгинатной основе подвержены преждевременному высыханию при нанесении тонким слоем на шерстный покров жи-

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. ОФС 1.1.0042. Определение гигроскопичности. Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> Ссылка активна на 09.09.2024.

² Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. ОФС 1.2.1.0004. Ионометрия. Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/> Ссылка активна на 09.09.2024.

вотных, что значительно осложняет применение такого геля в ветеринарии [3, 4]. В связи с этим важным являлось изучение высыхания геля с образованием пленки. По результатам испытания установлено, что все образцы подвержены высыханию при данных условиях с образованием пленки. При этом пленки образцов 1 и 3 являлись хрупкими, что, вероятно, будет способствовать появлению нежелательного эффекта – стягивания кожи животного. Образцы 2 и 4 при

высыхании образовывали упругие, тонкие пленки, вероятно, вследствие добавления глицерина. Кроме того, глицерин, введенный в состав, позволит увлажнять кожный покров, что немаловажно при агрессивном антимикробном воздействии АФС [9].

Результаты изучения реологических свойств полученных гелей представлены на рисунках 1–4 в виде зависимостей вязкости ($\text{мПа} \cdot \text{с}$) от скорости сдвига (с^{-1}).

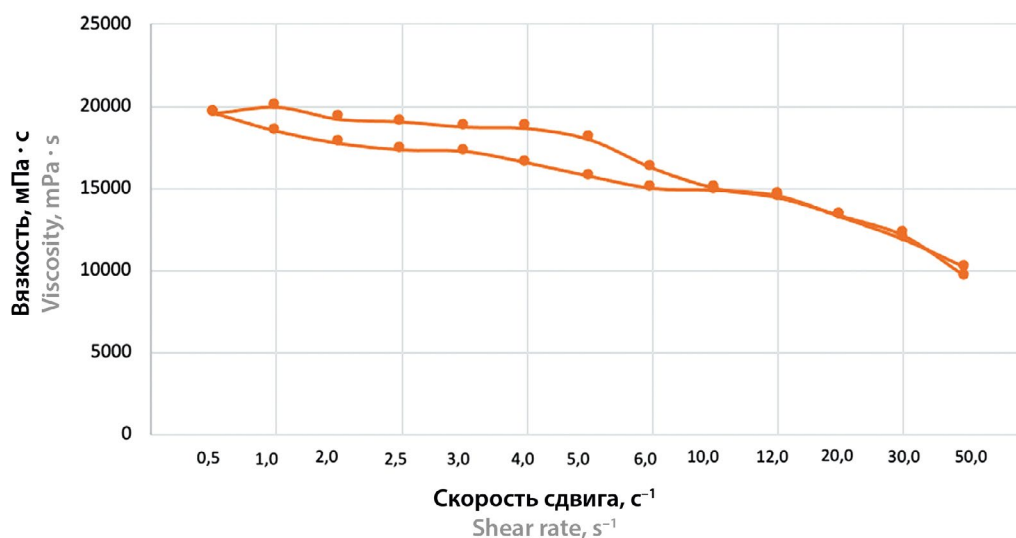


Рисунок 1. Кривая зависимости динамической вязкости ($\text{мПа} \cdot \text{с}$) от скорости сдвига (с^{-1}) для геля состава 1. Верхняя кривая – прямой ход; нижняя кривая – обратный ход

Figure 1. Curve of dependence of dynamic viscosity ($\text{мПа} \cdot \text{с}$) on shear rate (с^{-1}) for gel composition 1. Upper curve – forward direction; lower curve – reverse direction

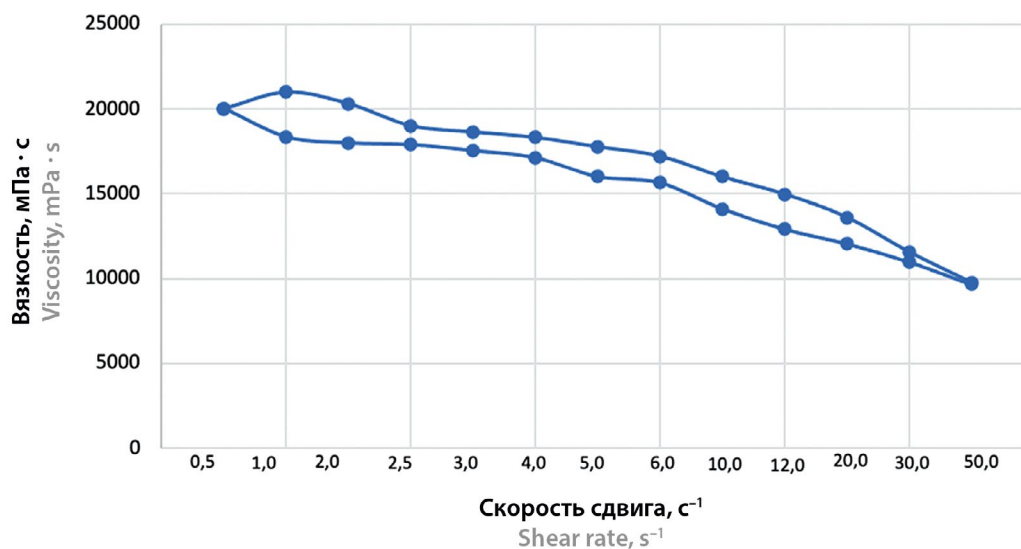


Рисунок 2. Кривая зависимости динамической вязкости ($\text{мПа} \cdot \text{с}$) от скорости сдвига (с^{-1}) для геля состава 2. Верхняя кривая – прямой ход; нижняя кривая – обратный ход

Figure 2. Curve of dependence of dynamic viscosity ($\text{мПа} \cdot \text{с}$) on shear rate (с^{-1}) for gel composition 2. Upper curve – forward direction; lower curve – reverse direction

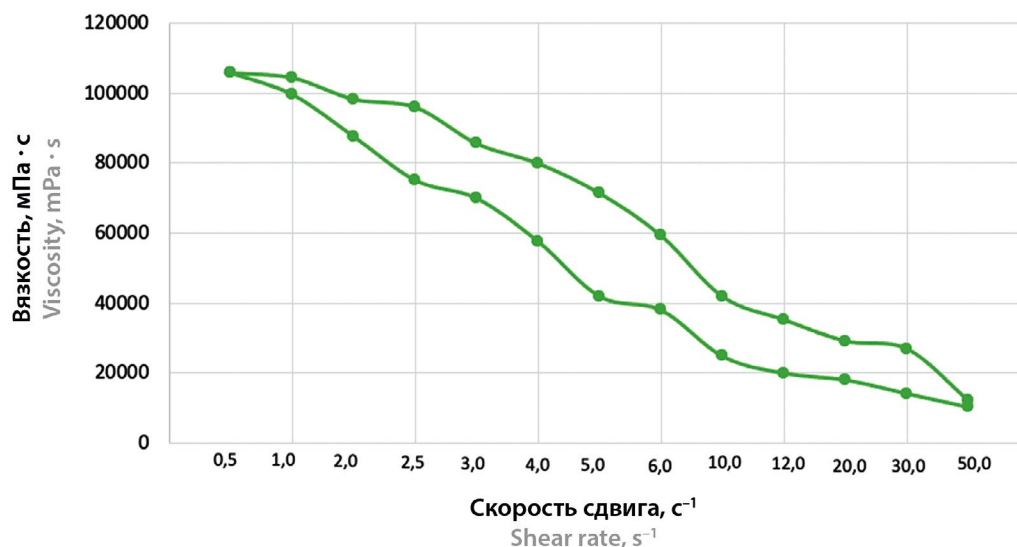


Рисунок 3. Кривая зависимости динамической вязкости ($mPa \cdot s$) от скорости сдвига (s^{-1}) для геля состава 3. Верхняя кривая – прямой ход; нижняя кривая – обратный ход

Figure 3. Curve of dependence of dynamic viscosity ($mPa \cdot s$) on shear rate (s^{-1}) for gel composition 3. Upper curve – forward direction; lower curve – reverse direction

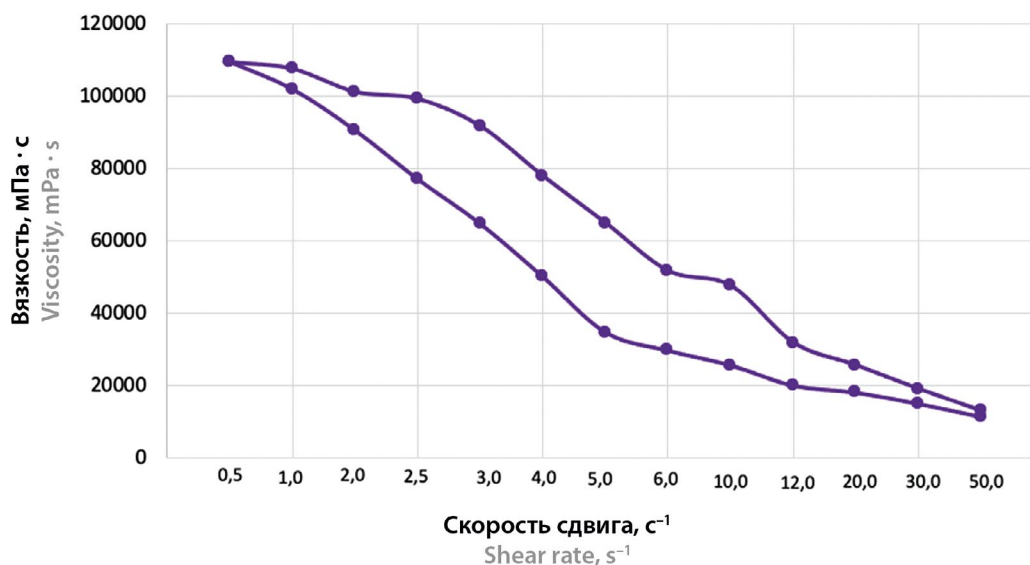


Рисунок 4. Кривая зависимости динамической вязкости ($mPa \cdot s$) от скорости сдвига (s^{-1}) для геля состава 4. Верхняя кривая – прямой ход; нижняя кривая – обратный ход

Figure 4. Curve of dependence of dynamic viscosity ($mPa \cdot s$) on shear rate (s^{-1}) for gel composition 4. Upper curve – forward direction; lower curve – reverse direction

Площадь петель гистерезиса является характеристикой гелей, которая косвенно свидетельствует о структуре и стабильности системы. Так, при наличии большой площади петли гистерезиса можно сделать вывод о том, что исследуемая жидкость обладает некоторой структурой, не характерной для ньютоновских жидкостей. Появление такой структуры влечет

за собой повышение стабильности данной системы как при хранении, так и при механическом или температурном воздействии. Также можно сделать вывод о том, что в геле преобладают обратимые тиксотропные связи, способные восстанавливаться после разрушения системы. Так, например, после нанесения на кожный покров или после выдавливания из

тубы, а также в процессе наполнения тубы не будет происходить избыточное разжижение и утрата структурных свойств [15–17].

Анализ результатов, полученных при изучении реологических свойств, показал, что гели, содержащие в составе карбомер и альгинат натрия (составы 3 и 4), представляют собой тиксотропные системы, более стабильные и пластичные, чем составы, содержащие только альгинат натрия в качестве гелеобразователя. Данное свойство будет обеспечивать сохранность структурных свойств в течение длительного времени после снятия напряжения, что, в свою очередь, будет обеспечивать седиментационную и агрегационную устойчивость, необходимую для суспензионно распределенного в основе производного тиадиазола [16–20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С учетом совокупности всех проведенных испытаний в геле можно сделать вывод, что наилучшим сочетанием реологических характеристик, а также потребительских характеристик обладает гель состава 4, который содержит карбомер и альгинат натрия в качестве гелеобразователя, а также глицерин. Таким образом, в результате проведенного исследования был разработан состав топической формы в виде геля, содержащего новое производное тиадиазола, предназначенное для лечения инфекционных заболеваний кожных покровов животных.

ЛИТЕРАТУРА

- Черных Т. Ф., Шульц А. В., Коцур Ю. М., Богданова О. Ю. Препарат широкого спектра для лечения инфекций животных. *Успехи медицинской микологии*. 2024;26:240–241.
- Черных Т. Ф., Лунегов А. М., Шульц А. В., Лунегова И. В., Флисюк Е. В. Изучение эффективности нового противогрибкового средства для лечения дерматофитозов животных. *Аграрная наука*. 2022;(9):22–25. DOI: 10.32634/0869-8155-2022-362-9-22-25.
- Черных Т. Ф., Флисюк Е. В., Шульц А. В., Богданова О. Ю. Терапевтическая эффективность нового противогрибкового средства. *Успехи медицинской биологии*. 2023;25:7–9.
- Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Черных Т. Ф., Боронина Л. Г. Изучение противомикробного эффекта геля в опытах in vitro. В сб.: Международной научно-практической конференции «Развитие научно-инновационного потенциала аграрного производства: проблемы, тенденции, пути решения». Тверь. 25.10.2022. С. 191–193.
- Ozhathil D. K., Wolf S. E. Prevention and treatment of burn wound infections: the role of topical antimicrobials. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2022;20(6):881–896. DOI: 10.1080/14787210.2022.2044795.
- Bonamonte D., De Marco A., Giuffrida R., Conforti C., Barlusconi C., Foti C., Romita P. Topical antibiotics in the dermatological clinical practice: Indications, efficacy, and adverse effects. *Dermatologic Therapy*. 2020;33(6):e13824. DOI: 10.1111/dth.13824.
- Tarasenko V., Pidlisnyy A., Koval A., Solomennyy A., Vaschuk V., Davtian L., Goncharenko N., Sakhandia I., Naumova M. Technological and Biopharmaceutical Aspects of Developing the Basics of Soft Medicinal Local Action. *Archives of Pharmacy Practice*. 2020;11(1):92–99.
- Donthi M. R., Munnangi S. R., Krishna K. V., Saha R. N., Singhvi G., Dubey S. K. Nanoemulgel: A Novel Nano Carrier as a Tool for Topical Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):164. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010164.
- Smith R., Russo J., Fiegel J., Brogden N. Antibiotic Delivery Strategies to Treat Skin Infections When Innate Antimicrobial Defense Fails. *Antibiotics*. 2020;9(2):56. DOI: 10.3390/antibiotics9020056.
- Lai W.-F., Tang R., Wong W.-T. Ionically Crosslinked Complex Gels Loaded with Oleic Acid-Containing Vesicles for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):725. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080725.
- Ногаяева У. В., Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Титович И. А., Наркевич И. А., Антонов В. Г. Разработка состава и технологии комбинированного геля для терапии остеоартроза с фармакологическим обоснованием содержания компонентов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):69–78. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-69-78.
- Kothale D., Verma U., Dewangan N., Jana P., Jain A., Jain D. Alginate as promising natural polymer for pharmaceutical, food, and biomedical applications. *Current Drug Delivery*. 2020;17(9):755–775. DOI: 10.2174/1567201817666200810110226.
- Kolawole O. M., Cook M. T. In situ gelling drug delivery systems for topical drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023;184:36–49. DOI: 10.1016/j.ejpb.2023.01.007.
- Быковского С. Н., Василенко И. А., Деминой Н. Б., Шохина И. Е., Новожилова О. В., Мешковского А. П., Спицко О. Р., ред. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. М.: Изд-во Перо; 2015. 472 с.
- Хаджиева З. Д., Зилфикаров И. Н., Теунова Е. А. Определение реологических показателей и создание технологической схемы производства олигогеля. *Научные ведомости*. 2010;22(93):58–61.
- Ногаяева У. В., Наумова А. А., Новиньков А. Г., Флисюк Е. В., Буракова М. А., Шиков А. Н., Абросимова О. Н. Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):121–129. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129.
- Noreen S., Pervaiz F., Ashames A., Buabeid M., Faehelel-bom K., Shoukat H., Maqbool I., Murtaza G. Optimization of Novel Naproxen-Loaded Chitosan/Carrageenan Nanocarrier-Based Gel for Topical Delivery: Ex Vivo, Histopathological, and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*. 2021;14(6):557. DOI: 10.3390/ph14060557.
- Russo J., Fiegel J., Brogden N. K. Rheological and Drug Delivery Characteristics of Poloxamer-Based Diclofenac Sodium Formulations for Chronic Wound Site Analgesia. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1214. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121214.
- Zhang Y., Li S., Huang Y., Song C., Chen W., Yang Y. Therapeutic Effect of Liquiritin Carbomer Gel on Topical Glucocorticoid-Induced Skin Inflammation in Mice. *Pharmaceutics*. 2024;16(8):1001. DOI: 10.3390/pharmaceutics16081001.

20. Maslii Y., Ruban O., Kasparaviciene G., Kalveniene Z., Materiienko A., Ivanauskas L., Mazurkeviciute A., Kopustinskiene D.M., Bernatoniene J. The Influence of pH Values on the Rheological, Textural and Release Properties of Carbomer Polacril® 40P-Based Dental Gel Formulation with Plant-Derived and Synthetic Active Components. *Molecules*. 2020;25(21):5018. DOI: 10.3390/molecules25215018.

REFERENCES

1. Chernykh T.F., Shultz A.V., Kotsur Y.M., Bogdanova O.Y. A broad-spectrum drug for the treatment of animal infections. *Uspekhi medicinskoj mikologii*. 2024;26:240–241. (In Russ.)
2. Chernykh T.F., Lunegov A.M., Shultz A.V., Lunegova I.V., Flisyuk E.V. Study of the effectiveness of a new antifungal agent for the treatment of animal dermatophytosis. *Agrarian science*. 2022;9(9):22–25. (In Russ.) DOI: 10.32634/0869-8155-2022-362-9-22-25.
3. Chernykh T.F., Flisyuk E.V., Shultz A.V., Bogdanova O.Y. Therapeutic efficacy of a new antifungal agent. *Uspekhi medicinskoj mikologii*. 2023;25:7–9. (In Russ.)
4. Kotsur Yu.M., Flisyuk E.V., Chernykh T.F., Boronina L.G. Study of antimicrobial effect of gel in in vitro experiments. In: International scientific-practical conference "Development of scientific-innovative potential of agrarian production: problems, trends, solutions". Tver. 25.10.2022. P. 191–193. (In Russ.)
5. Ozhatil D.K., Wolf S.E. Prevention and treatment of burn wound infections: the role of topical antimicrobials. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2022;20(6):881–896. DOI: 10.1080/14787210.2022.2044795.
6. Bonamonte D., De Marco A., Giuffrida R., Conforti C., Barlusconi C., Foti C., Romita P. Topical antibiotics in the dermatological clinical practice: Indications, efficacy, and adverse effects. *Dermatologic Therapy*. 2020;33(6):e13824. DOI: 10.1111/dth.13824.
7. Tarasenko V., Pidlisnyy A., Koval A., Solomennyy A., Vaschuk V., Davtian L., Goncharenko N., Sakhandia I., Naumova M. Technological and Biopharmaceutical Aspects of Developing the Basics of Soft Medicinal Local Action. *Archives of Pharmacy Practice*. 2020;11(1):92–99.
8. Donthi M.R., Munnangi S.R., Krishna K.V., Saha R.N., Singhvi G., Dubey S.K. Nanoemulgel: A Novel Nano Carrier as a Tool for Topical Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):164. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010164.
9. Smith R., Russo J., Fiegel J., Brogden N. Antibiotic Delivery Strategies to Treat Skin Infections When Innate Antimicrobial Defense Fails. *Antibiotics*. 2020;9(2):56. DOI: 10.3390/antibiotics9020056.
10. Lai W.-F., Tang R., Wong W.-T. Ionically Crosslinked Complex Gels Loaded with Oleic Acid-Containing Vesicles for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):725. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080725.
11. Nogaeva U.V., Kotsur J.M., Flisyuk E.V., Ivkin D.Yu., Semivelichenko E.D., Titovich I.A., Narkevich I.A., Antonov V.G. Development of the composition and technology of a combined gel for the treatment of osteoarthritis with a pharmacological rationale for the content of components. *Drug development & registration*. 2021;10(4):69–78. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-69-78.
12. Kothale D., Verma U., Dewangan N., Jana P., Jain A., Jain D. Alginate as promising natural polymer for pharmaceutical, food, and biomedical applications. *Current Drug Delivery*. 2020; 17(9):755–775. DOI: 10.2174/1567201817666200810110226.
13. Kolawole O.M., Cook M.T. In situ gelling drug delivery systems for topical drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023;184:36–49. DOI: 10.1016/j.ejpb.2023.01.007.
14. Bykovsky S.N., Vasilenko I.A., Demina N.B. Shokhina I.E., Novozhilova O.V., Meshkovsky A.P., Spitsky O.R., editors. Pharmaceutical development: concept and practical recommendations. Moscow: Izd-vo Pero; 2015. 472 c. (In Russ.)
15. Khadzhieva Z.D., Zilfikarov I.N., Teunova E.A. Determination of rheological indices and creation of the technological scheme of oleogel production. *Nauchnye vedomosti*. 2010;22(93):58–61. (In Russ.)
16. Nogaeva U.V., Naumova A.A., Novinkov A.G., Flisyuk E.V., Burakova M.A., Shikov A.N., Abrosimova O.N. Comparative Study of Rheological Properties of Gels and Creams on Different Carrier Bases. *Drug development & registration*. 2022;11(3):121–129. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129.
17. Noreen S., Pervaiz F., Ashames A., Buabeid M., Faehelebom K., Shoukat H., Maqbool I., Murtaza G. Optimization of Novel Naproxen-Loaded Chitosan/Carrageenan Nanocarrier-Based Gel for Topical Delivery: Ex Vivo, Histopathological, and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*. 2021;14(6):557. DOI: 10.3390/ph14060557.
18. Russo J., Fiegel J., Brogden N.K. Rheological and Drug Delivery Characteristics of Poloxamer-Based Diclofenac Sodium Formulations for Chronic Wound Site Analgesia. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1214. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121214.
19. Zhang Y., Li S., Huang Y., Song C., Chen W., Yang Y. Therapeutic Effect of Liquiritin Carbomer Gel on Topical Glucocorticoid-Induced Skin Inflammation in Mice. *Pharmaceutics*. 2024;16(8):1001. DOI: 10.3390/pharmaceutics16081001.
20. Maslii Y., Ruban O., Kasparaviciene G., Kalveniene Z., Materiienko A., Ivanauskas L., Mazurkeviciute A., Kopustinskiene D.M., Bernatoniene J. The Influence of pH Values on the Rheological, Textural and Release Properties of Carbomer Polacril® 40P-Based Dental Gel Formulation with Plant-Derived and Synthetic Active Components. *Molecules*. 2020;25(21):5018. DOI: 10.3390/molecules25215018.



Разработка и исследование мукоадгезивных микрокапсул для интраназальной доставки леводопы

Д. С. Гордеева¹, В. В. Хуторянский²✉, Р. И. Мустафин¹✉✉

¹ Институт фармации, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16

² Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

✉ Контактное лицо: Хуторянский Виталий Викторович. E-mail: v.khutoryanskiy@reading.ac.uk

✉✉ Контактное лицо: Мустафин Руслан Ибрагимович. E-mail: ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Д. С. Гордеева – <https://orcid.org/0009-0000-8591-3121>;

В. В. Хуторянский – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>;

Р. И. Мустафин – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Статья поступила: 29.08.2024

Статья принята в печать: 28.11.2024

Статья опубликована: 29.11.2024

Резюме

Введение. Микроразмерные частицы представляют большой интерес для применения в различных системах доставки лекарств. Особое место занимает интраназальный способ введения благодаря ряду преимуществ, включая простоту применения, минимальные побочные эффекты и возможность быстрой доставки лекарственных веществ (ЛВ) непосредственно в мозг. Лекарство в составе микрочастиц действует локально, обеспечивая тем самым выход ЛВ в нужном количестве в органе-мишени. ЛВ из носа поступает напрямую в головной мозг через обонятельную область по чувствительным нервам. Разработка микроразмерных частиц, обладающих способностью к мукоадгезии на поверхности носовой слизистой, позволит увеличить биодоступность (БД) лекарств, применяемых в терапии заболеваний и нарушений центральной нервной системы (ЦНС).

Цель. Разработка и исследование микрокапсул, обладающих мукоадгезивными свойствами, для их использования в системе интраназальной доставки леводопы.

Материалы и методы. Микрокапсулы (МК) получали методом ультразвукового электрораспыления на инкапсуляторе В-390 (BUCHI, Швейцария) с последующей фильтрацией под вакуумом, промывкой деионизированной водой и высушиванием лиофильно при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 0,05 мБар в течение 48 ч в сушилке FreeZone 1 L (Labconco, США). Изучение структурных особенностей МК проводилось методом оптической микроскопии с применением прямого микроскопа Evident CX33 с цифровой камерой высокого разрешения (Olympus, Япония). Для обработки изображений использовали программное обеспечение ImageView™. Оценку морфологии МК также проводили с применением портативного источника ультрафиолетового света (Jialitte F114, Китай) при помощи цифрового USB-микроскопа (OT-INL40 1000X, Китай). Исследование мукоадгезивных свойств МК, загруженных флуоресцеинатом натрия, проводилось с применением изолированной слизистой носа овцы в инкубаторе SI60 (Stuart, Великобритания) при температуре $37,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Получение флуоресцентных изображений осуществлялось с применением системы визуализации высокого разрешения TLC Visualizer 3 (CAMAG®, Швейцария). Программное обеспечение ImageJ 1.53e (ImageJ, США) использовали для обработки полученных макроскопических изображений и построения графиков. Оценка эффективности инкапсуляции, % (ЭИ%), и загрузочной емкости, % (ЕЗ%), МК леводопой проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Evolution™ 220 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 202 нм. Высвобождение леводопы из МК выполнялось на приборе «Проточная ячейка» CE 7smart (SOTAX AG, Швейцария), метод IV (Государственная фармакопея РФ XV издания, ГФ РФ XV), при температуре $37 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 ч в среде искусственной назальной жидкости (ИНЖ). Количество высвобождавшегося ЛВ определялось на УФ-спектрофотометре Evolution™ 220 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 202 нм.

Результаты и обсуждение. Разработана методика получения МК, подобраны параметры прибора и оптимальный состав микрочастиц. Было получено 2 типа МК: простые МК на основе альгината натрия и МК, покрытые Eudragit® EPO (EPO), обладающие мукоадгезивными свойствами. Средний диаметр простых МК составил $0,365 \pm 0,018\text{ }\mu\text{m}$, МК, покрытых EPO, – $0,426 \pm 0,017\text{ }\mu\text{m}$. Простые МК смываются с поверхности изолированной слизистой носа овцы через 5 мин после орошения ИНЖ, а МК, покрытые EPO, удерживаются в течение 1 ч. ЭИ% МК леводопой выше 90 %. ЕЗ% МК, покрытых EPO, больше, чем у простых МК. Выход леводопы в среду ИНЖ из МК, покрытых EPO, составил 100 % уже через 30 мин исследования, у простых МК – не более $60 \pm 6,1\text{ }\%$ через 3 ч.

Заключение. МК, покрытые ЕРО, обладают мукоадгезивными свойствами на поверхности слизистой носа, и их дальнейшее исследование является перспективным с целью применения в системах интраназальной доставки леводопы.

Ключевые слова: микрокапсулы, мукоадгезивная система доставки, леводопа, интраназальное введение лекарств, доставка из носа в мозг

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

Вклад авторов. Д. С. Гордеева осуществляла разработку методики получения микрочастиц, подбор параметров прибора и оптимального состава, их анализ, исследования по мукоадгезии и высвобождению леводопы, а также обработку результатов и написание драфта статьи. В. В. Хуторянский и Р. И. Мустафин принимали участие в концептуализации и методологии настоящей работы, а также осуществляли рецензирование и корректировку статьи. Все вышеуказанные авторы принимали участие в написании статьи.

Финансирование. Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 23-15-00263).

Благодарность. Авторы благодарны немецкой компании Evonik Nutrition & Care GmbH за предоставление образца Eudragit® ЕРО. Также авторы выражают благодарность к. фарм. н., доценту А. Ю. Ситенкову за помощь в разработке методики получения микрочастиц и студенту Института фармации Абделькариму Эльмантаги за помощь в ходе мукоадгезивных исследований микрочастиц.

Для цитирования: Гордеева Д. С., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И. Разработка и исследование мукоадгезивных микрокапсул для интраназальной доставки леводопы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):129–138. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1918>

Development and study of mucoadhesive microcapsules for the nasal levodopa delivery

Daria S. Gordeeva¹, Vitaliy V. Khutoryanskiy²✉, Rouslan I. Moustafine¹✉✉

¹ Institute of Pharmacy. Kazan State Medical University. 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia

² Reading School of Pharmacy, University of Reading. Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

✉ **Corresponding author:** Vitaliy V. Khutoryanskiy. **E-mail:** v.khutoryanskiy@reading.ac.uk

✉✉ **Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** ruslan.mustafin@kazangmu.ru

ORCID: Daria S. Gordeeva – <https://orcid.org/0009-0000-8591-3121>;

Vitaliy V. Khutoryanskiy – <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>;

Rouslan I. Moustafine – <https://orcid.org/0000-0002-0916-2853>.

Received: 29.08.2024

Accepted: 28.11.2024

Published: 29.11.2024

Abstract

Introduction. Microparticles are of great interest for use in various drug delivery systems. The intranasal route of administration holds a special place due to its several advantages, including ease of use, minimal side effects, and the ability for rapid delivery of drug directly to the brain. The drug in the microparticles acts locally, thereby ensuring the release of the drug in the required amount in the target organ. The drug from the nose enters directly into the brain through the olfactory region along the sensory nerves. The development of microparticles with the ability to mucoadhesion on the surface of the nasal mucosa will increase the bioavailability of drugs used in the treatment of diseases and disorders of the central nervous system (CNS).

Aim. Development and study of microcapsules with mucoadhesive properties for the intranasal delivery system of levodopa.

Materials and methods. Microcapsules (MC) were obtained by ultrasonic electro spraying method on a B-390 encapsulator (BUCHI, Switzerland) followed by filtration under vacuum, washing with deionized water and freeze-drying at –50 °C and 0.05 mBar for 48 h in a FreeZone 1 L dryer (Labconco, USA). The structural features of MC were studied by optical microscopy using Evident CX33 microscope with high-resolution camera (Olympus, Japan). For evaluation of the images, we used ImageView™ software (version x64, 4.11.22376.20230402). Morphology of prepared microcapsules were also detected using a portable ultraviolet light source (Jialitte F114, China) by a digital USB microscope (OT-INL40 1000X, China). The mucoadhesive properties of sodium fluoresceinate-loaded MC were studied using isolated sheep nasal mucosa in an SI60 incubator (Stuart, UK) at 37.0 ± 0.5 °C. Fluorescent images were obtained using a TLC Visualizer 3 high-resolution imaging system (CAMAG®, Switzerland). ImageJ 1.53e software (ImageJ, USA) was used to process the obtained macroscopic images and plot graphs. The encapsulation efficiency, % (EE%) and loading capacity, % (LC%) of levodopa loaded MC were assessed using UV spectrophotometry on an Evolution™ 220 device (Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 202 nm. The release of levodopa from MC was performed using a CE 7smart flow cell (SOTAX AG, Switzerland), method IV (State Pharmacopoeia XV of the Russian Federation), at a temperature of 37 ± 0.5 °C for 3 hours in an artificial nasal fluid (ANF) medium. The amount of released drug was determined using an Evolution™ 220 UV spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 202 nm.

Results and discussion. A method for MC preparation was developed, the device parameters and the optimal composition of microparticles were selected. Two types of MC were obtained: alginate MC and MC coated with Eudragit® EPO (EPO), which have mucoadhesive properties. The average diameter of alginate MC was 0.365 ± 0.018 mm, EPO-coated MC – 0.426 ± 0.017 mm. Alginate MC are washed off the surface of isolated sheep nasal mucosa 5 minutes after irrigation with ANF, and EPO-coated are retained for 1 hour. EE% of MC with levodopa is above 90 %. LC% of EPO-coated is higher than that of alginate MC. The release of levodopa into the ANF medium from EPO-coated MC was 100 % after just 30 minutes of the study, while for alginate MC it was no more than 60 ± 6.1 % after 3 hours.

Conclusion. EPO-coated MCs exhibit mucoadhesive properties on the nasal mucosa surface and their further study is promising for use in intranasal levodopa delivery systems.

Keywords: microcapsules, mucoadhesive delivery system, levodopa, intranasal drug delivery, nose to brain delivery

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

Contribution of the authors. Daria S. Gordeeva developed the method for obtaining microparticles, selected the device parameters and optimal composition, analyzed them, studied mucoadhesion and levodopa release, processed the results and wrote the draft of the article. Vitaliy V. Khutoryanskiy and Rouslan I. Moustafine participated in the conceptualization and methodology of this work, and reviewed and corrected the article. All the above-mentioned authors participated in writing the article.

Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF № 23-15-00263).

Acknowledgment. The authors are grateful to the German company Evonik Nutrition & Care GmbH for providing a sample of Eudragit® EPO. The authors also express their gratitude to Dr. A. Yu. Sitenkov for his help in the development of methodology used for the preparation of microcapsules and to Abdelkarim Elmantagui, a student of the Institute of Pharmacy, for his assistance during mucoadhesive studies of microparticles.

For citation: Gordeeva D. S., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Development and study of mucoadhesive microcapsules for the nasal levodopa delivery. *Drug development & registration*. 2024;13(4):129–138. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1918>

ВВЕДЕНИЕ

Микрочастицы имеют размер в диапазоне 1–1000 мкм и за счет своих структурных особенностей имеют ряд преимуществ, поэтому могут быть использованы в различных системах доставки лекарств [1, 2]. Микрочастицы в силу своего размера не проникают в межклеточное пространство и, таким образом, действуют локально [3]. Для получения микрочастиц используются полимеры природного и синтетического происхождения [4–6]. Также в производстве микрочастиц применяются производные целлюлозы [7–9], другие полисахариды [10–12] и белки [13–16]. Для сшивания и укрепления микрочастиц применяют соединения неполимерной и полимерной природы: CaCl_2 , глутаровый альдегид и поли-L-лизин соответственно, а также ряд других веществ. Природные полимеры обладают хорошей биоразлагаемостью, а продукты их разложения безопасны и нетоксичны для человеческого организма. Однако, сложно обеспечить постоянство параметров качества полимеров (в том числе размер, механиче-

ские свойства и др.) между партиями производимых частиц. Микрочастицы на основе синтетических полимеров характеризуются очень хорошими механическими свойствами, стабильностью и контролируемым высвобождением ЛВ [17].

Микросферы и МК привлекают большое внимание с точки зрения применения их в различных системах доставки лекарств. Микросферы – это матричные системы, в которых лекарство диспергировано, растворено или суспендировано равномерно и однородно [18]. Обычно они обладают плохой растворимостью в воде, но имеют способность к ее поглощению, в результате чего набухают с образованием геля [19]. МК – это гетерогенные частицы, которые имеют ядро (резервуар) и оболочку (мембрану) [20]. Данный тип «ядро – оболочка» позволяет создавать системы с заданными свойствами. Ядро может быть жидким, твердым или газообразным, а оболочка обычно твердая и может быть изготовлена из различных материалов [21]. Кроме того, ЛВ может быть загружено в разные слои ядра или

оболочки, чтобы оно могло последовательно высвобождаться в организме [22, 23]. В МК можно инкапсулировать как липофильные, так и гидрофильные материалы [24].

Интраназальная доставка микрочастиц обеспечивает местное или системное действие лекарства, способствуя быстрому всасыванию и началу действия [25–28]. Интраназальное введение ЛВ в составе микрочастиц для доставки в мозг в терапии заболеваний ЦНС увеличивает БД препаратов и повышает эффективность фармакотерапии. В литературе имеется ряд исследований по разработке микрочастиц для доставки ЛВ интраназально в терапии расстройств ЦНС. Например, БД лоразепама была увеличена за счет пролонгации высвобождения ЛВ на поверхности назальной слизи при использовании микросфер на основе Pluronic марок PF-127 и PF-68 в терапии судорожных состояний и эпилептического статуса [29]. Микросферы с применением этилцеллюлозы и хитозана для интраназальной доставки ривастигмина для лечения болезни Альцгеймера показали хорошие результаты поведенческих тестов у крыс *in vivo* [30]. Хитозановые микросферы, полученные методом распылительной сушки, повысили БД (118 %) метотрексата в сравнении с раствором лекарства, введенного интраназально. После внутривенного введения метотрексата ЛВ в срезах мозга крыс обнаружено не было [31]. Мукоадгезивные микросферы на основе гидроксипропилметилцеллюлозы обеспечивают быструю доставку трамадола гидрохлорида в головной мозг при его интраназальном введении, что было доказано в радиовизуализирующем исследовании на кроликах [32]. Интраназальная доставка дефероксамина мезилата в составе микрочастиц хитозана и метил- β -циклодекстрина обеспечивает концентрацию ЛВ в спинномозговой жидкости от $3,83 \pm 0,68$ мкг/мл (микрочастицы хитозана) до $14,37 \pm 1,69$ мкг/мл (микрочастицы метил- β -циклодекстрина) через 30 мин после введения [33].

Целью настоящего исследования стала разработка и исследование микрокапсул, обладающих мукоадгезивными свойствами, для их использования в системе интраназальной доставки леводопы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе для получения МК был использован альгинат натрия (Panreac, ЕС) с молекулярной массой 10 000–600 000 г/моль, сшивающим агентом выступал хлорид кальция. Для создания МК, обладающих мукоадгезивными свойствами, их покрывали Eudragit® EPO (EPO), терполимером *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата с метилметакрилатом и бутилметакрилатом (молярное соотношение 2:1:1, ММ 150 кДа) (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия). Раствор EPO получали путем его растворения в деионизированной воде с доведением pH до 6,0 с применением растворов 1 н NaOH и 1 н HCl. Для создания МК, загруженных ЛВ,

раствор альгината натрия готовили в водном растворе леводопы (Sigma-Aldrich, Великобритания) с концентрацией 1 мг/мл. МК получали методом ультразвукового электрораспыления на инкапсуляторе B-390 (BUCHI, Швейцария) с использованием одинарной головки и форсунки диаметром 200 мкм. Параметры прибора: давление – 130–150 мбар, частота ультразвука – 800 Гц, напряжение электрического поля – 1100 В. Затем МК отфильтровывали под вакуумом, промывали деионизированной водой и высушивали лиофильно при -50 °C и 0,05 мБар в течение 48 ч в сушилке FreeZone 1 L (Labconco, США) [34].

Определение размеров и структурных особенностей МК проводилось путем оптической микроскопии с применением прямого микроскопа Evident CX33 (Olympus, Япония), а также в УФ-свете с применением портативного источника ультрафиолетового света (Jialitte F114, КНР) при помощи цифрового USB-микроскопа (OT-INL40 1000X, КНР). Обработка полученных изображений и оценка размеров проводилась с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53e (ImageJ, США).

Для анализа мукоадгезивных свойств микрочастиц использовали изолированную слизистую носа овцы, которую получали путем диссекции носовой перегородки из голов овец [35]. Головы получали из местной скотобойни и транспортировали в лабораторию в переносном холодильнике с температурным режимом от 3 до 4 °C. Носовую перегородку ($1,5 \times 1,0$ см) извлекали с помощью ножниц. Все ткани были использованы в течение 24 ч после убоя животных. Исследования мукоадгезивных свойств МК частицы нагружали флуоресцеинатом натрия (Sigma-Aldrich, Великобритания) в концентрации 0,1 мг/мл. 0,1 г лиофильно высушенных МК, загруженных флуоресцеинатом натрия, помещали на изолированную слизистую носа овцы и размещали в инкубаторе SI60 (Stuart, Великобритания) с температурным режимом $37,0 \pm 0,5$ °C. Затем в течение 1 ч проводили смыв с использованием ИНЖ при помощи шприцевого дозатора (Legato® 110, KD Scientific Inc., США) со скоростью 0,2 мл/мин и получали флуоресцентные изображения с применением системы визуализации высокого разрешения TLC Visualizer 3 (CAMAG®, Швейцария). ИНЖ получали с использованием 7,45 г NaCl, 1,29 г KCl и 0,24 г безводного CaCl_2 (pH 5,8) в 1000 мл деионизированной воды. Каждый эксперимент повторяли трижды. Программное обеспечение ImageJ 1.53e (ImageJ, США) использовали для обработки полученных макроскопических изображений и построения графиков.

Расчет эффективности инкапсуляции (ЭИ%) (1) и загрузочной емкости (ЕЗ%) (2) МК леводопой проводился по формулам:

$$\text{ЭИ\%} = \frac{M(\text{инкапсулированное ЛВ})}{M(\text{исходное ЛВ})} \cdot 100\%, \quad (1)$$

$$\text{ЕЗ\%} = \frac{M(\text{инкапсулированное ЛВ})}{M(\text{сухие МК})} \cdot 100\%, \quad (2)$$

$M(\text{инкапсулированное ЛВ}) =$

$M(\text{исходное ЛВ}) - M(\text{неинкапсулированное ЛВ}),$

где $M_{\text{исходное ЛВ}}$ – исходное количество ЛВ;

$M_{\text{неинкапсулированное ЛВ}}$ – количество ЛВ в ретикуляционном растворе, не инкапсулированного в МК, после фильтрации;

$M_{\text{осажденное ЛВ}}$ – количество ЛВ, осажденного на последнем этапе приготовления.

Определение количества леводопы проводили УФ-спектрофотометрически на приборе Evolution™ 220 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 202 нм. Результаты количественно сравнивали с калибровочной кривой, полученной из стандартов леводопы 2, 4, 6, 8, 10 мкг/мл ($r^2 = 0,9969$).

Высвобождение леводопы из простых МК и МК, покрытых ЕРО, проводилось на приборе «Проточная ячейка» CE 7smart (SOTAX AG, Швейцария), метод IV (ГФ РФ XV), при температуре $37,0 \pm 0,5$ °С в течение 3 ч. В среде ИНЖ (рН 5,8). 0,05 г лиофильно высушенных МК, загруженных леводопой, помещали в ячейку диаметром 22,6 мм вместе со стеклянными шариками диаметром 1 мм во избежание их всплывания в процессе эксперимента и обеспечения ламинарного потока среды растворения. Скорость потока была подобрана наименьшей (2 мл/мин) с точки зрения максимального приближения к условиям передвижения секрета в назальной области. Каждые 30 мин проводился отбор проб. Количество высвободившейся леводопы определялось УФ-спектрофотометрически на приборе Evolution™ 220 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 202 нм. Результаты количественно сравнивали с калибровочной кривой, полученной из стандартов леводопы 2, 4, 6, 8, 10 мкг/мл ($r^2 = 0,9969$).

Статистический анализ проводился с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и двустороннего t -критерия Стьюдента в программном обеспечении Microsoft Excel, где $p < 0,05$ считалось значимым. Все результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (СО).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ультразвукового электрораспыления нами было получено 2 типа МК: простые, которые выступали в качестве отрицательного контроля, и МК, покрытые полимером ЕРО, обладающие мукоадгезивными свойствами. В структуре ЕРО присутствуют диметиламиногруппы, которые за счет частичного положительного заряда обеспечивают электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными муцинами слизистой [37, 38]. Наличие ЕРО на поверхности МК способствует адгезии частиц на поверхности слизистой носа, что, в свою очередь, приводит к повышению БД ЛП и эффективности фармакотерапии.

Нами был подобран оптимальный состав для получения простых МК: 1,0%-й альгинат натрия (капсулообразующий раствор) / 0,5%-й CaCl_2 (ретикуляционный раствор). Результаты оптической микроскопии простых МК до и после лиофильного высушивания представлены на рисунке 1. После получения МК круглой формы, в растворе также имеются деформированные частицы. После лиофильного высушивания, ввиду удаления жидкости, МК теряют свою первоначальную сферическую форму.

С целью более детального изучения МК и определения их размеров микроскопию проводили в УФ-свете. Для этого в раствор альгината натрия вводили флуоресцеинат натрия (рисунок 2). Средний диаметр МК составил $0,365 \pm 0,018$ мм ($n = 5$).

В ходе исследования для разработки МК, покрытых ЕРО, мы пробовали различные составы частиц с введением дополнительных вспомогательных веществ, так как после лиофильного высушивания МК

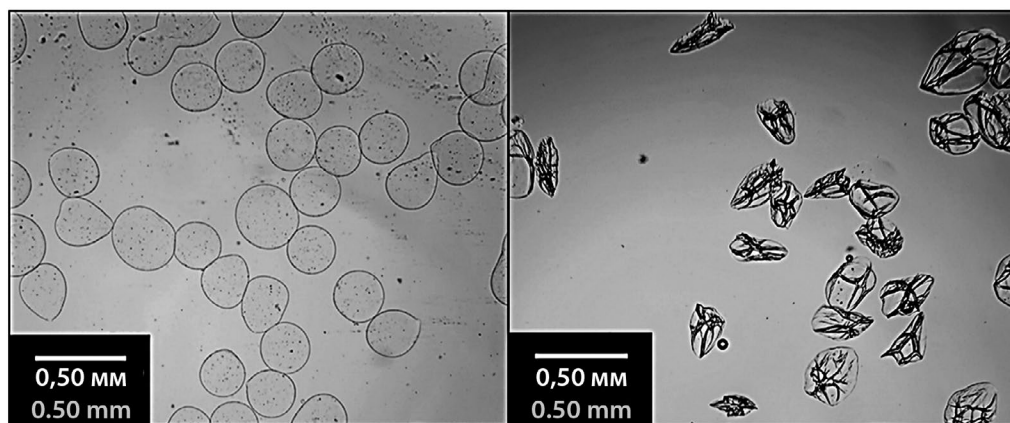


Рисунок 1. Микроскопия простых микрокапсул до и после лиофильного высушивания. Масштаб – 0,50 мм

Figure 1. Microscopy of alginate microcapsules before and after freeze drying. Scale bar – 0.50 mm

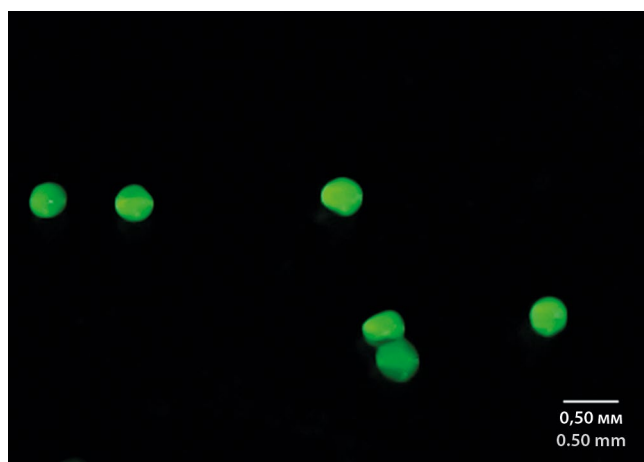


Рисунок 2. Микроскопия простых микрокапсул, загруженных флуоресцеином натрия, в УФ-свете. Масштаб – 0,50 мм

Figure 2. Microscopy of alginate microcapsules loaded with sodium fluorescein in UV light. Scale bar – 0.50 mm

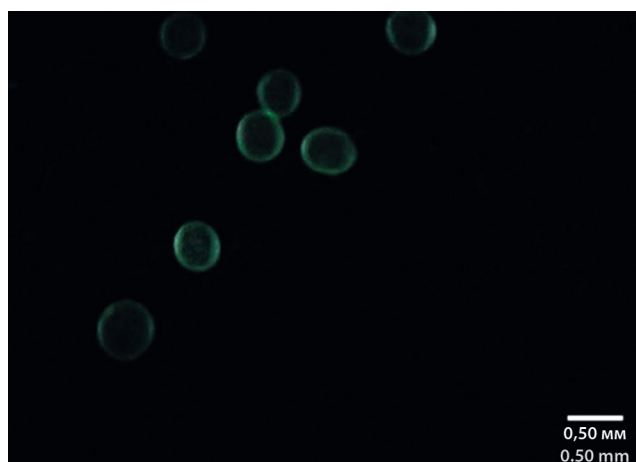


Рисунок 3. Микроскопия микрокапсул, покрытых FEPO, в УФ-свете. Масштаб – 0,50 мм

Figure 3. Microscopy of FEPO-coated microcapsules in UV light. Scale bar – 0.50 mm

агрегировали и слипались, образуя жесткий конгломерат. В результате мы подобрали оптимальный состав МК, покрытых EPO: 1,0%-й альгинат натрия (капсулообразующий раствор) / 0,5%-й CaCl_2 + 0,5%-й EPO с pH 6,0 (ретикуляционный раствор). МК, покрытые EPO, после лиофильного высушивания, представляли собой порошок белого цвета без запаха. С целью детального изучения микрочастиц и подтверждения наличия EPO на их поверхности, мы провели оптическую микроскопию МК с использованием флуоресцентно-меченого EPO (FEPO) (рисунок 3) [39]. Флуоресцентное свечение оболочки микрочастиц в УФ-свете подтверждает наличие полимера на поверхности МК. Средний диаметр МК, покрытых EPO, составил $0,426 \pm 0,017$ мм ($n = 5$).

Ввиду того, что данное исследование направлено на разработку интраназальной и мукоадгезивной системы доставки лекарств для терапии заболеваний ЦНС, была проведена оценка удерживаемости простых МК (отрицательный контроль) и МК, покрытых EPO, загруженных флуоресцеином натрия, на поверхности изолированной слизистой носа овцы в УФ-свете. Флуоресцентные изображения слизистой представлены на рисунке 4. В результате было доказано, что наличие EPO на поверхности МК обеспечивает адгезию МК к слизистой. Простые МК смываются с поверхности слизистой через 5 мин после орошения ИНЖ, а через 10 мин – полностью отсутствуют. МК, покрытые EPO, в свою очередь, удерживаются на изолированной слизистой носа в течение 1 ч (рисунок 5). Диметиламиногруппы в составе EPO на по-

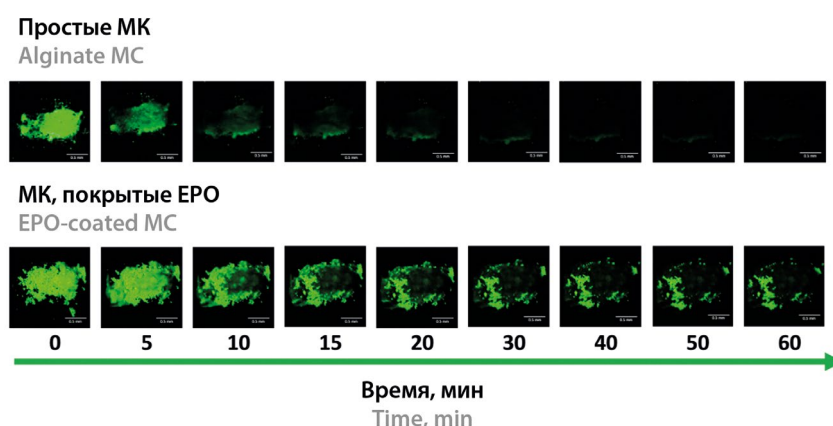


Рисунок 4. Флуоресцентные изображения изолированной слизистой оболочки носа овцы с нанесенными простыми микрокапсулами и микрокапсулами, покрытыми EPO, загруженными флуоресцеином натрия в концентрации 0,1 мг/мл, после ее орошения ИНЖ. Масштаб – 500 мкм

Figure 4. Fluorescent images of isolated sheep nasal mucosa coated with alginate microcapsules and EPO-coated microcapsules loaded with 0.1 mg/ml sodium fluorescein after washing with ANF. Scale bar is 500 μm

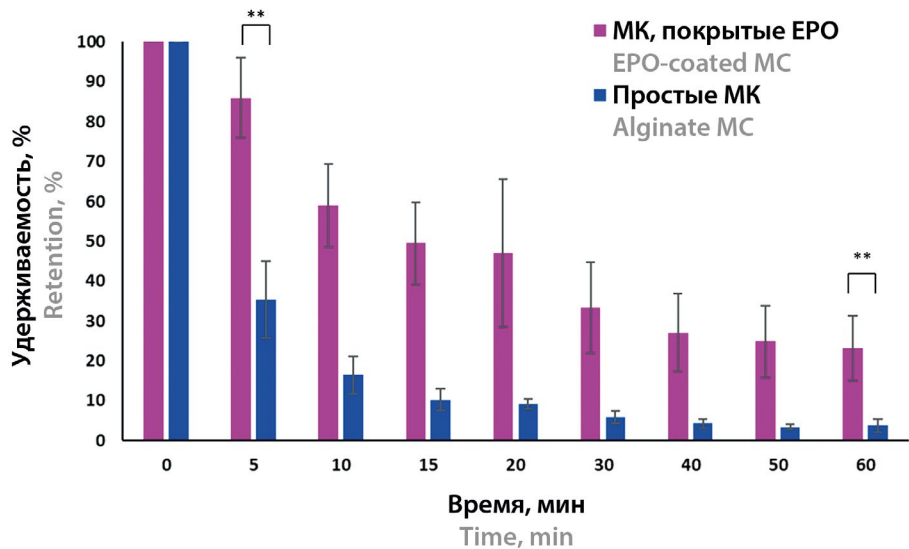


Рисунок 5. Результаты удерживаемости простых микрокапсул и микрокапсул, покрытых ЕРО, загруженных флуоресцеинатом натрия 0,1 мг/мл, на изолированной слизистой оболочке носа овцы после ее орошения ИНЖ (pH = 5,8). Удерживаемость, %, представлена как среднее значение ± СО (n = 3).
Достоверные различия: **p < 0,005

Figure 5. Retention results of alginate microcapsules and EPO-coated microcapsules loaded with 0.1 mg/mL sodium fluorescein on isolated sheep nasal mucosa after washing with ANF (pH = 5.8). Retention, % is presented as mean ± SD (n = 3).
Significant differences: **p < 0.005

верхности МК, по всей видимости, взаимодействуют с отрицательно заряженными фрагментами муцинов слизистой электростатически, тем самым придавая частицам мукоадгезивные свойства. За счет этого может повышаться БД лекарств, введенных в состав МК.

На следующем этапе работы необходимо было загрузить МК ЛВ – леводопой и оценить показатели ЭИ% и ЕЗ%. Леводопа – это основной препарат, применяемый в заместительной фармакотерапии болезни Паркинсона (БП). Леводопа относится к предшественникам дофамина, способна проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и путем декарбоксилирования образует дофамин. БД леводопы в головном мозге составляет 1–3 %, большая часть дофамина образуется на периферии, что ведет к различным побочным эффектам [40, 41]. Интраназальное введение леводопы поможет повысить БД ЛВ и снизить частоту нежелательных лекарственных реакций.

ЭИ% и ЕЗ% простых МК и МК, покрытых ЕРО, леводопой представлены в таблице 1. ЭИ% показала отличные результаты, выше 90 %. ЕЗ% МК, покрытых ЕРО, больше, чем у простых МК.

В исследовании высвобождения леводопы из простых МК и МК, покрытых ЕРО, по методу IV «Проточная ячейка» (ГФ РФ XV) на приборе SE 7smart (SOTAX AG, Швейцария) выход ЛВ из МК, покрытых ЕРО, составил 100 ± 13,1 % через 30 мин, что может быть связано с разрушением МК в ходе анализа и стремительным высвобождением леводопы в ИНЖ.

В то же время высвобождение ЛВ из простых МК составило не более 60 ± 6,1 % за тот же интервал времени эксперимента. Результаты представлены на рисунке 6.

Таблица 1. ЭИ% и ЕЗ% простых микрокапсул и микрокапсул, покрытых ЕРО.
Результаты представлены как ЭИ% и ЕЗ% ± СО (n = 3)

Table 1. EE% and LC% of alginate microcapsules and EPO-coated microcapsules.
Results are presented as EE% and LC% ± SD (n = 3)

МК MC	ЭИ% EE%	ЕЗ% LC%
Простые МК Alginate MC	94,3 ± 0,9	18,2 ± 2,9
МК, покрытые ЕРО EPO-coated MC	95,5 ± 0,8	33,6 ± 9,9

Для анализа структурных изменений микрочастиц в ходе анализа высвобождения ЛВ из МК дополнительно была проведена оптическая микроскопия лиофильно высушенных образцов до и после исследования высвобождения. Исследование МК, покрытых ЕРО, показало, что после высвобождения большая часть микрочастиц разрушена, тогда как простые МК сохраняют свою целостность (рисунок 7).

Таким образом, можно сделать вывод, что покрытие простых альгинатных МК противоположно заряженным терполимером ЕРО приводит, с одной сто-

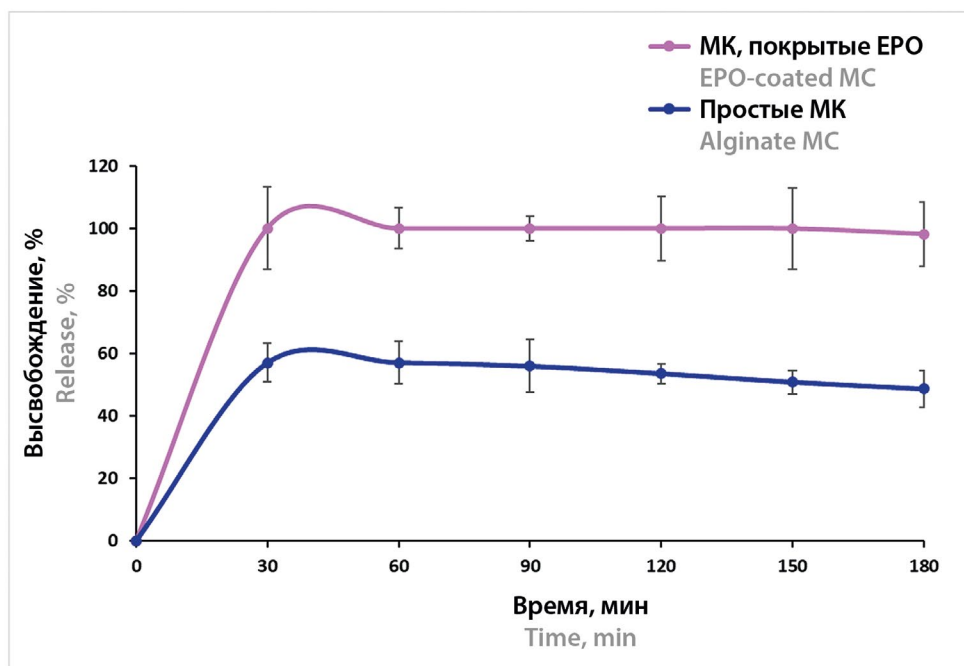


Рисунок 6. Результаты высвобождения леводопы из простых микрокапсул и микрокапсул, покрытых ЕРО, в среде ИНЖ (рН 5,8) на приборе «Проточная ячейка» в течение 3 ч. Высвобождение, %, представлено как среднее $\pm$ СО ($n = 3$)

Figure 6. Results of levodopa release from alginate microcapsules and EPO-coated microcapsules in ANF (pH 5.8) using the "Flow Cell" device during 3 h. Release, % is presented as mean $\pm$ SD ($n = 3$)

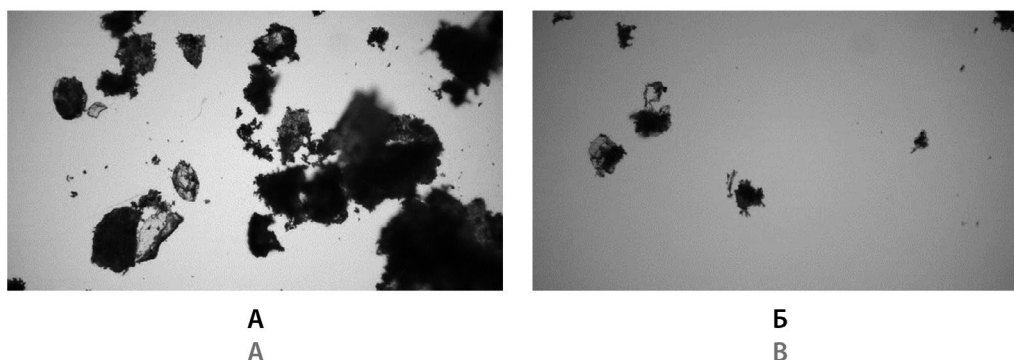


Рисунок 7. Микроскопия лиофильно высушенных микрокапсул, покрытых ЕРО, до (А) и после (Б) анализа высвобождения леводопы из микрочастиц

Figure 7. Microscopy of lyophilized EPO-coated microcapsules before (A) and after (B) analysis of levodopa release from the microparticles

роны, к увеличению длительности удерживания микрочастиц на поверхности слизистой, а с другой – к ускоренному высвобождению включенного ЛВ, что и должно обеспечивать увеличение БД леводопы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данного исследования было получено 2 типа МК методом ультразвукового электро-распыления. МК, покрытые ЕРО, обладают улучшен-

ными мукоадгезивными свойствами и обеспечивают быстрый выход леводопы на поверхности изолированной слизистой носа овцы. Дальнейшее исследование МК, покрытых ЕРО, с целью применения их в системах интраназальной доставки леводопы является перспективным направлением. БД леводопы повысится, а частота побочных аффектов снизится, что, в свою очередь, позволит увеличить эффективность фармакотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bale S., Khurana A., Reddy A. S. S., Singh M., Godugu C. Overview on Therapeutic Applications of Microparticulate Drug Delivery Systems. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2016;33(4):309–361. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016015798.
- Galogahi F. M., Zhu Y., An H., Nguyen N.-T. Core-shell microparticles: Generation approaches and applications. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2020;5(4):417–435. DOI: 10.1016/j.jsamd.2020.09.001.
- Wang B., Hu L., Siahaan T. J. Drug Delivery to the Lymphatic System. In: *Drug Delivery: Principles and Applications*. Hoboken: John Wiley and Sons Inc.; 2016. 509 p.
- Fundueanu G., Constantin M., Esposito E., Cortesi R., Nastuzzi C., Menegatti E. Cellulose acetate butyrate microcapsules containing dextran ion-exchange resins as self-propelled drug release system. *Biomaterials*. 2005;26(20):4337–4347. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.036.
- Jelvehgari M., Siahi-Shadbad M. R., Azarmi S., Martin G. P., Nokhodchi A. The microsphere delivery system of benzoyl peroxide: Preparation, characterization and release studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;308(1–2):124–132. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.11.001.
- Koga C. C., Lee S.-Y., Lee Y. Consumer Acceptance of Bars and Gummies with Unencapsulated and Encapsulated Resveratrol. *Journal of Food Science*. 2016;81:1222–1229. DOI: 10.1111/1750-3841.13274.
- Brannigan R. P., Khutoryanskiy V. V. Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties. *Macromolecular Bioscience*. 2019;19(10):1900194. DOI: 10.1002/mabi.201900194.
- Chowdary K. P. R., Srinivasa Rao Y. Design and in vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microcapsules of glipizide for oral controlled release: A technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2003;4:39. DOI: 10.1208/pt040339.
- Mansuri S., Kesharwani P., Jain K., Tekade R. K., Jain N. K. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive & Functional Polymers*. 2016;100:151–172. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011.
- Mahdi M. H., Conway B. R., Smith A. M. Development of mucoadhesive sprayable gellan gum fluid gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;488(1–2):12–19. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.011.
- Petri D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015;132(23):42035. DOI: 10.1002/app.42035.
- Varshosaz J., Ahmadi F., Emami J., Tavakoli N., Minaian M., Mahzouni P., Dorkoosh F. Microencapsulation of budesonide with dextran by spray drying technique for colon-targeted delivery: An *in vitro/in vivo* evaluation in induced colitis in rat. *Journal of Microencapsulation*. 2011;28(1):62–73. DOI: 10.3109/02652048.2010.529947.
- Foxx M., Zilberman M. Drug delivery from gelatin-based systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2015;12:1547–1563. DOI: 10.1517/17425247.2015.1037272.
- Inada A., Oue T., Yamashita S., Yamasaki M., Oshima T., Matsuyama H. Development of highly water-dispersible complexes between coenzyme Q10 and protein hydrolysates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;136:104936. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.05.014.
- Ju Z. Y., Kilara A. Gelation of pH-Aggregated Whey Protein Isolate Solution Induced by Heat, Protease, Calcium Salt, and Acidulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;8561:1830–1835.
- Ruan L., Su M., Qin X., Ruan Q., Lang W., Wu M., Chen Y., Lv Q. Progress in the application of sustained-release drug microspheres in tissue engineering. *Materials Today Bio*. 2022;16:100394. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100394.
- Shatabayeva E. O., Kaldybekov D. B., Ulmanova L., Zhaisanbayeva B. A., Mun E. A., Kenessova Z. A., Kudaibergenov S. E., Khutoryanskiy V. V. Enhancing Mucoadhesive Properties of Gelatin through Chemical Modification with Unsaturated Anhydrides. *Biomacromolecules*. 2024;25(3):1612–1628. DOI: 10.1021/acs.biomac.3c01183.
- Whelehan M., Marison I. W. Microencapsulation using vibrating technology. *Journal of Microencapsulation*. 2011;28:669–688. DOI: 10.3109/02652048.2011.586068.
- Pereswetoff-Morath L. Microspheres as nasal drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998;29(1–2):185–194. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00069-0.
- Peanparkdee M., Iwamoto S., Yamauchi R. Microencapsulation: A Review of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries. *Reviews in Agricultural Science*. 2016;4:56–65. DOI: 10.7831/ras.4.56.
- Ramli R. A., Laftah W. A., Hashim S. Core-shell polymers: a review. *RSC Advances*. 2013;3(36):15543–15565. DOI: 10.1039/C3RA41296B.
- De Cock L. J., De Koker S., De Geest B. G., Grooten J., Vervaet C., Remon J. P., Sukhorukov G. B., Antipina M. N. Polymeric multilayer capsules in drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010;49(39):6954–6973. DOI: 10.1002/anie.200906266.
- Yang X.-L., Ju X.-J., Mu X.-T., Wang W., Xie R., Liu Z., Chu L.-Y. Core-Shell Chitosan Microcapsules for Programmed Sequential Drug Release. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016;8(16):10524–10534. DOI: 10.1021/acsami.6b01277.
- Wang W., Luo T., Ju X.-J., Xie R., Liu L., Chu L.-Y. Microfluidic preparation of multicompartiment microcapsules for isolated co-encapsulation and controlled release of diverse components. *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation*. 2021;13(5):325–332. DOI: 10.1515/ijnsns-2012-0402.
- Beg S., Rahman M., Panda S. K., Alharbi K. S., Alruwaili N. K., Ameerduzzafar, Singh P. K., Thappa M., Singh B. Nasal mucoadhesive microspheres of lercanidipine with improved systemic bioavailability and antihypertensive activity. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2021;16(2):237–246. DOI: 10.1007/s12247-020-09441-5.
- Gavini E., Rassu G., Sanna V., Cossu M., Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of an antiemetic drug, metoclopramide: in-vitro/ex-vivo studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005;57(3):287–294. DOI: 10.1211/0022357055623.
- Lim S. T., Forbes B., Martin G. P., Brown M. B. In vivo and in vitro characterization of novel microparticles based on hyaluronan and chitosan hydroglutamate. *AAPS PharmSciTech*. 2015;2:20. DOI: 10.1007/BF02830560.
- Varshosaz J., Sadrai H., Alinagari R. Nasal delivery of insulin using chitosan microspheres. *Journal of Microencapsulation*. 2004;21(7):761–774. DOI: 10.1080/02652040400015403.
- Jose S., Ansa C. R., Cinu T. A., Chacko A. J., Aleykutty N. A., Ferreira S. V., Souto E. B. Thermo-sensitive gels containing lorazepam microspheres for intranasal brain targeting. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;441(1–2):516–526. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.10.049.

30. Gao Y., Almalki W. H., Afzal O., Panda S. K., Kazmi I., Alrobaian M., Katouah H. A., Altamimi A. S. A., Al-Abbasi F. A., Alshehri S., Soni K., Ibrahim I. A. A., Rahman M., Beg S. Systematic development of lectin conjugated microspheres for nose-to-brain delivery of rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;141:111829. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111829.
31. Sun Y., Shi K., Wan F., Cui F.-d. Methotrexate-loaded microspheres for nose to brain delivery: in vitro/in vivo evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2012;22(2):167–174. DOI: 10.1016/S1773-2247(12)50022-5.
32. Belgamwar V. S., Patel H. S., Joshi A. S., Agrawal A., Surana S. J., Tekade A. R. Design and development of nasal mucoadhesive microspheres containing tramadol HCl for CNS targeting. *Drug Delivery*. 2011;18(5):353–360. DOI: 10.3109/10717544.2011.557787.
33. Rassu G., Soddu E., Cossu M., Brundu A., Cerri G., Marchetti N., Ferraro L., Regan R. F., Giunchedi P., Gavini E., Dalpiaz A. Solid microparticles based on chitosan or methyl- β -cyclodextrin: a first formulative approach to increase the nose-to-brain transport of deferoxamine mesylate. *Journal of Controlled Release*. 2015;201:68–77. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.01.025.
34. Dalmoro A., Sitenkov A. Y., Lamberti G., Barba A. A., Moustafine R. I. Ultrasonic atomization and polyelectrolyte complexation to produce gastroresistant shell-core microparticles. *Journal of Applied Polymer Science*. 2016;133:42976. DOI: 10.1002/app.42976.
35. Kaldybekov D. B., Tonglairoum P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;111:83–90. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.039.
36. Phuong Ta L., Bujna E., Kun S., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V. V. Electrosprayed mucoadhesive alginate-chitosan microcapsules for gastrointestinal delivery of probiotics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;597:120342. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120342.
37. Porfiryeva N. N., Nasibullin S. F., Abdullina S. G., Tukhbatullina I. K., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Acrylated Eudragit® EPO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;562:241–248. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.027.
38. Brannigan R. P., Khutoryanskiy V. V. Synthesis and evaluation of mucoadhesive acryloyl-quaternized PDMAEMA nanogels for ocular drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;155:538–543. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.050.
39. Porfiryeva N. N., Semina I. I., Salakhov I. A., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Mucoadhesive and mucus-penetrating interpolyelectrolyte complexes for nose-to-brain drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2021;37:102432. DOI: 10.1016/j.nano.2021.102432.
40. Contin M., Martinelli P. Pharmacokinetics of levodopa. *Journal of Neurology*. 2010;257:253–261. DOI: 10.1007/s00415-010-5728-8.
41. Navaratnam P., Arcona S., Friedman H. S., Leoni M., Sasane R. Levodopa treatment patterns in Parkinson's disease: A retrospective chart review. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders*. 2022;6:100135. DOI: 10.1016/j.prdoa.2022.100135.

Оригинальная статья / Research article

УДК 543.544.5; 615.451.16

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1728>



Development of a liquid chromatography method for the analysis of oil extract of artemisia cina

Saule K. Ordabayeva¹, Aigul D. Serikbayeva¹, Hosseini Shirazi Farshad², Gaukhar Bakhytkyzy¹✉

¹ JSC "South Kazakhstan Medical Academy". 1, Al-Farabi square, Shymkent, 160019, Kazakhstan

² Shahid Beheshti Medical University, School of Pharmacy, Department of pharmaceutical and toxicological chemistry. Bldg No. 2 SBMU, Arabi Ave, Daneshjoo Blvd, Velenjak, Tehran, Iran

✉ **Corresponding author:** Gaukhar Bakhytkyzy. **E-mail:** bakhytkyzy00@bk.ru

ORCID: Saule K. Ordabayeva – <https://orcid.org/0000-0002-6944-5548>;

Aigul D. Serikbayeva – <https://orcid.org/0000-0002-4803-8708>;

Hosseini Shirazi Farshad – <https://orcid.org/0000-0003-1356-385X>;

Gaukhar Bakhytkyzy – <https://orcid.org/0000-0002-9012-6584>.

Received: 26.01.2024

Accepted: 31.10.2024

Published: 01.11.2024

Abstract

Introduction. The problem of development and implementation of own drugs in Kazakhstan today is acute and urgent. The solution to this problem is possible through the use of own resources – domestic medicinal plant raw materials. A promising medicinal raw material is *Artemisia cina* – an endemic medicinal plant of the of the Turkestan region of Kazakhstan.

Aim. Designing a liquid chromatography methodology to analyze the oil extract obtained from *Artemisia cina*.

Materials and methods. Standard sample (SS) of santonin, *Artemisia cina*'s oil extract. The substance was identified and quantitatively determined using an Agilent Technologies 1200 liquid chromatograph (USA) equipped with ChemStation software.

Results and discussion. The main active substance of the oil extract was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) method. Choosing the separation conditions for the column involves determining the best composition of the mobile phase and the rate of elution. There were used a reversed-phase system with sorbent C18 and a mobile phase consisting of acetonitrile and a phosphate buffer with a pH of 6.8. Chromatographic studies of the substance were carried out in a gradient mode at an analytical wavelength of 237 nm. The retention time of the standard sample (SS) of santonin matched the retention time (t_R) of santonin isolated from the oil extract of *Artemisia cina* and amounted to 14.3 minutes.

Conclusion. A liquid chromatography method has been established for the identification and quantitative determination of the oil extract, focusing on the main active substance, santonin.

Keywords: oil extract of artemisia cina, santonin, identification, assay, high-performance liquid chromatography, 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. Hosseini Shirazi Farshad developed the concept of the study and was responsible for planning the experiment, and participated in the data analysis. Gaukhar Bakhytkyzy and Aigul D. Serikbayeva performed the liquid chromatography experiments and participated in data processing and interpretation. Saule K. Ordabayeva made significant corrections to the text of the article, edited it, and prepared the final version for publication. All authors were fully involved in the development of the analytical method and statistical processing of the data.

For citation: Ordabayeva S. K., Serikbayeva A. D., Farshad H. S., Bakhytkyzy G. Development of a liquid chromatography method for the analysis of oil extract of artemisia cina. *Drug development & registration*. 2024;13(4):139–147. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1728>

Разработка методики жидкостной хроматографии для анализа масляного экстракта полыни цитварной

С. К. Ордабаева¹, А. Д. Серикбаева¹, Ш. Х. Фаршад², Г. Бахыткызы¹✉

¹ Акционерное общество «Южно-Казахстанская медицинская академия» (АО «ЮКМА»). 160019, Казахстан, г. Шымкент, пл. Аль-Фараби, д. 1

² Медицинский университет Шахида Бехешти, фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической и токсикологической химии. Иран, Тегеран, Веленджак, бульвар Данешджу, проспект Араби, корпус № 2 СБМУ

© Ordabayeva S. K., Serikbayeva A. D., Farshad H. S., Bakhytkyzy G., 2024

© Ордабаева С. К., Серикбаева А. Д., Фаршад Ш. Х., Бахыткызы Г., 2024

✉ Контактное лицо: Бахыткызы Гаухар. E-mail: bakhytkyzy00@bk.ru

ORCID: С. К. Ордабаева – <https://orcid.org/0000-0002-6944-5548>;
А. Д. Серикбаева – <https://orcid.org/0000-0002-4803-8708>;
Ш. Х. Фаршад – <https://orcid.org/0000-0003-1356-385X>;
Г. Бахыткызы – <https://orcid.org/0000-0002-9012-6584>.

Статья поступила: 26.01.2024

Статья принята в печать: 31.10.2024

Статья опубликована: 01.11.2024

Резюме

Введение. Проблема разработки и внедрения отечественных препаратов в Казахстане на сегодняшний день является острой и актуальной. Решение данной проблемы возможно посредством использования собственных ресурсов – отечественного лекарственного растительного сырья. Перспективным лекарственным сырьем является полынь цитварная – эндемичное лекарственное растение Туркестанской области Казахстана.

Цель. Разработка методики жидкостной хроматографии для анализа масляного экстракта полыни цитварной.

Материалы и методы. Стандартный образец (СО) сантонина масляный экстракт полыни цитварной (МЭПЦ). Идентификацию и количественное определение вещества проводили на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1200 (США) с программным обеспечением ChemStation.

Результаты и обсуждение. Исследование хроматографического поведения основного действующего вещества масляного экстракта проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Подбор условий разделения на колонке включает в себя выбор оптимального состава подвижной фазы и скорости элюирования. Использовалась обращенно-фазовая система с сорбентом C18 и подвижной фазой, состоящей из ацетонитрила и фосфатного буфера с pH 6,8. Хроматографические исследования субстанции проводили в градиентном режиме при аналитической длине волны 237 нм. Время удерживания стандартного образца (СО) сантонина совпало со временем удерживания (t_R) сантонина выделенного из масляного экстракта полыни цитварной и составило 14,3 мин.

Заключение. Разработана методика идентификации и количественного определения масляного экстракта по основному действующему веществу – сантонину методом жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: масляный экстракт полыни цитварной, сантонин, идентификация, анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация

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

Вклад авторов. Ш. Х. Фаршад разработал концепцию исследования и был ответственным за планирование эксперимента, а также принял участие в анализе данных. Г. Бахыткызы и А. Д. Серикбаева провели эксперименты по жидкостной хроматографии, участвовали в обработке и интерпретации данных. С. К. Ордабаева внесла значительные правки в текст статьи, занималась ее редактированием и подготовила окончательный вариант для публикации. Все авторы в полной мере занимались разработкой аналитического метода и статистической обработкой данных.

Для цитирования: Ордабаева С. К., Серикбаева А. Д., Фаршад Ш. Х., Бахыткызы Г. Разработка методики жидкостной хроматографии для анализа масляного экстракта полыни цитварной. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):139–147. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1728>

INTRODUCTION

The problem of the evolution of diseases and increasing the resistance of pathological microorganisms, parasites to drugs is becoming more and more widespread due to the unfavorable global dynamics of the ecological situation. According to the WHO expert assessment, diseases caused by helminths rank third globally among the most significant infectious and parasitic diseases. Official statistics indicate that approximately 2 billion people worldwide are infected with helminths [1, 2].

The demand for anthelmintic agents in the Kazakhstani market is predominantly met by imported drugs [3–6]. The problem of development and implementation

of own drugs in Kazakhstan today is acute and urgent. The solution to this problem is possible through the use of own resources – domestic medicinal plant raw materials. A promising medicinal raw material is *Artemisia cina* – an endemic medicinal plant of the of the Turkestan region of Kazakhstan. For many years, citvar seed and santonin have been an effective anthelmintic. Sesquiterpenoid of *Artemisia cina* – santonin has a wide spectrum of pharmacological action: anthelmintic, anti-inflammatory, antipyretic, hemolytic, cardiostimulant, immunomodulatory, including its own antitumor activity [7–10].

The department of pharmaceutical and toxicological chemistry of the South Kazakhstan medical academy has developed a method for obtaining *Artemisia ci-*

na's oil extract. Preliminary studies indicate that santonin is the primary active ingredient of the oil extract. Therefore, the study of quality indicators, standardization of oil extract according to santonin and the development of a draft regulatory document for oil extract is relevant in order to further introduce it into medical practice [11–14].

The efficacy of pharmaceutical analysis is intricately linked to the application of physicochemical research methodologies. The development of techniques for evaluating medication quality constitutes a multifaceted endeavor that can be solved using the HPLC method, which allows combining the stages of separation, identification and quantitative determination. The determination of santonin in the oil extract was hampered by the presence of extraneous chromatographic peaks of related substances. Thus, we optimized the chromatography conditions and developed optimal sample preparation conditions for the maximum transfer of santonin from the oil extract to the test solution [15–17].

Aim

Standard sample of santonin (α -santonin, purity >99.9 %, Sigma-Aldrich, USA), *Artemisia cina*'s oil extract (ACOE), acetonitrile for HPLC (purity >99.9 %, Honeywell, USA), deionized water (obtained at the Milli-Q D-8 installation Water purification system, USA), phosphate buffer (850 ml of orthophosphoric acid is dissolved in 250 ml of deionized water, and the pH is corrected with a solution of 0.1 M sodium hydroxide).

MATERIALS AND METHODS

Chromatography equipment and conditions

Identification and quantitative determination was carried out on an Agilent Technologies 1200 liquid chromatograph (USA) with ChemStation software equipped with a G1322A degasser and a variable wavelength spectrophotometric detector MWD G1314. Separation was carried out on a column with a reversed phase Agilent C18. 5 μ , (4.6 $\times$ 150 mm) with a pre-column (Agilent C18. 5 μ). Also, a concentrator centrifuge (Concentrator plus eppendorf, USA) and an ultrasonic bath (Elmascript S., Germany) were used for sample preparation of oil extract of *Artemisia cina*.

Analytical determinations were carried out under the following conditions: the flow rate is 1.0 ml/min, the volume of the injected sample is 20 μ l, the column temperature is 40 °C. Chromatography was passed under conditions of gradient elution with acetonitrile (A) and phosphate buffer with pH 6.8 (B): 0 min – 35:65 (A:B); 5 min – 20:80; 10 min – 20:80; 15 min – 20:80; 20 min – 35:65. Optimization of chromatographic separation conditions was carried out according to the system suitability parameters: resolution, number of theoretical plates, peak asymmetry factor. Different va-

riants of the mobile phase, stationary phase, elution modes, and ionization modes were tested. Acetonitrile was used as the mobile phase, which is characterized by low viscosity, mixes with water in any ratio, does not create pressure at the inlet to the column and a phosphate buffer pH 6.8. Chromatographic studies of the substance were run in gradient mode at an analytical wavelength of 237 nm.

Identification of santonin peaks on the chromatogram was pursued by comparative analysis of chromatographic characteristics with a standard sample.

Preparation of standard sample solution of santonin

About 1.0 mg (exact weight) of a standard sample of santonin is placed in a vial, 1 ml of acetonitrile is added, shaken on a shaker and centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes (solution A).

100, 250, 500, 750 of a standard sample of santonin solution are placed in 1000 μ l volumetric flasks, diluted to the mark with acetonitrile and mixed (solutions B).

Preparation of samples

Approximately 5.0 grams (exact mass) of the oil extract from *Artemisia cina* are introduced into a 25 ml conical flask, followed by the addition of 10 ml of acetonitrile. To ensure complete transfer of santonin into the acetonitrile phase, the resulting mixture is subjected to ultrasonication for 15 minutes at 60 °C. Subsequently, centrifugation is performed at a rate of 14.000 rpm for 10 minutes. The acetonitrile layer is separated using a micropipette and transferred to a 50 ml chemical beaker and tightly closed. Extraction is carried out 2 more times. The resulting extracts are combined and centrifuged for 10 minutes. Then, they are placed in a vacuum concentrator until the extractant completely evaporates. The dry residue is dissolved in 10 ml of acetonitrile and placed in an ultrasonic bath for 15 minutes at a temperature of 60 °C (test solution).

About 1.0 ml (exact weight) of the test solution of *Artemisia cina*'s oil extract is placed in a vial, shaken on a shaker for 5 minutes and chromatographed under the above conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Method validation

Validation of the developed methodology was conducted in accordance with the relevant provisions outlined in the General Pharmacopoeia Article of the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan (SP RK), as well as modern recommendations from the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [18–20].

The method of quantitative determination is validated according to the main characteristics: specificity, linearity, precision and limit of quantitative determination (LOQ) [8, 19–54].

Specificity

The specificity of the assay was evaluated by analyzing five samples of a standard santonin solution within the concentration range of 100–1000 µg/ml. No extraneous peaks corresponding to the retention

time of santonin isolated from the oil extract of *Artemisia cina* were observed on the chromatograms of the standard samples (figures 1–3).

Figures 1–3 show chromatograms of the tested santonin solution of *Artemisia cina*'s oil extract and SS solution of santonin under the selected conditions of chromatographic analysis. The chromatogram shows the specificity and selectivity of the developed method for identifying the oil extract by santonin: the retention time of the obtained peak of the studied santonin solution isolated from the oil extract coincides with

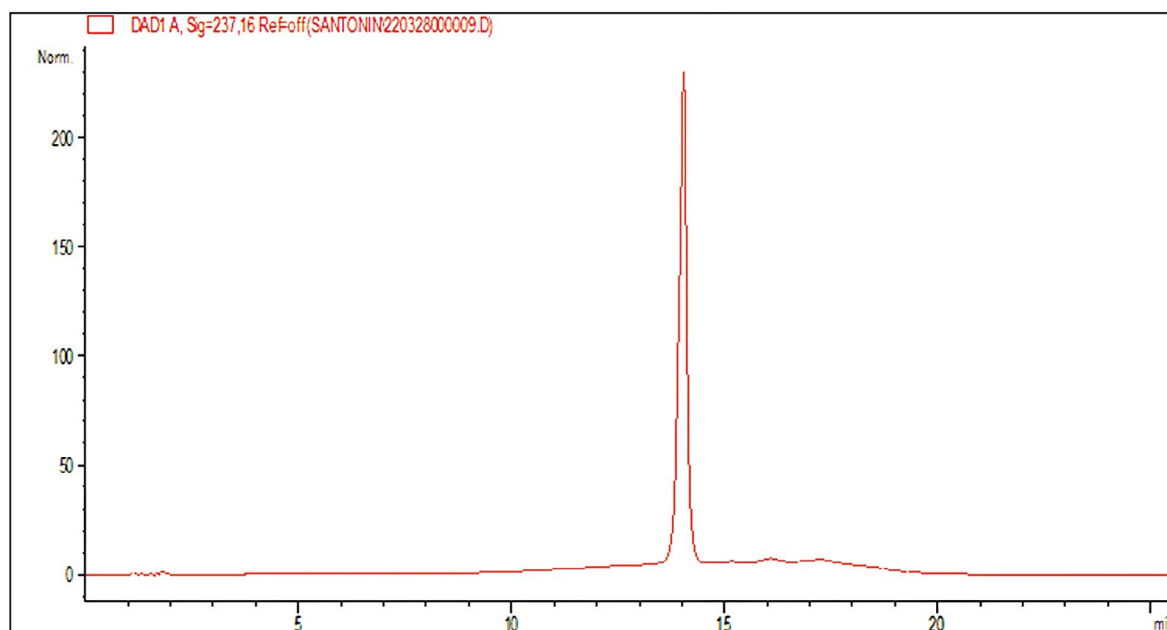


Figure 1. Chromatogram of a standard sample of santonin

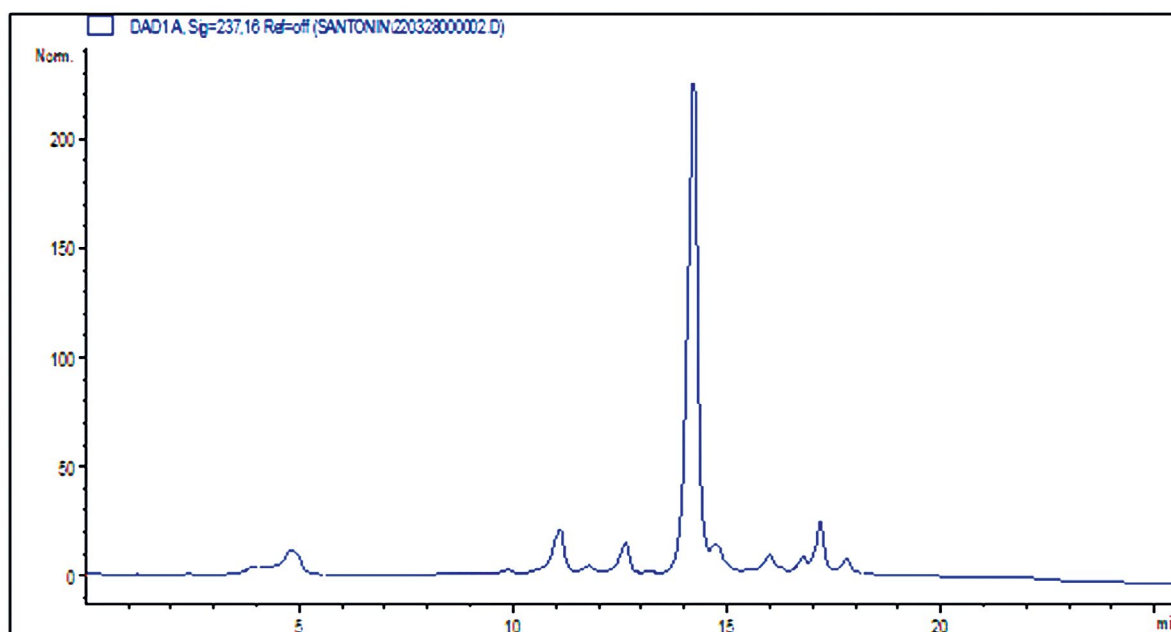


Figure 2. Chromatogram of *Artemisia cina*'s oil extract

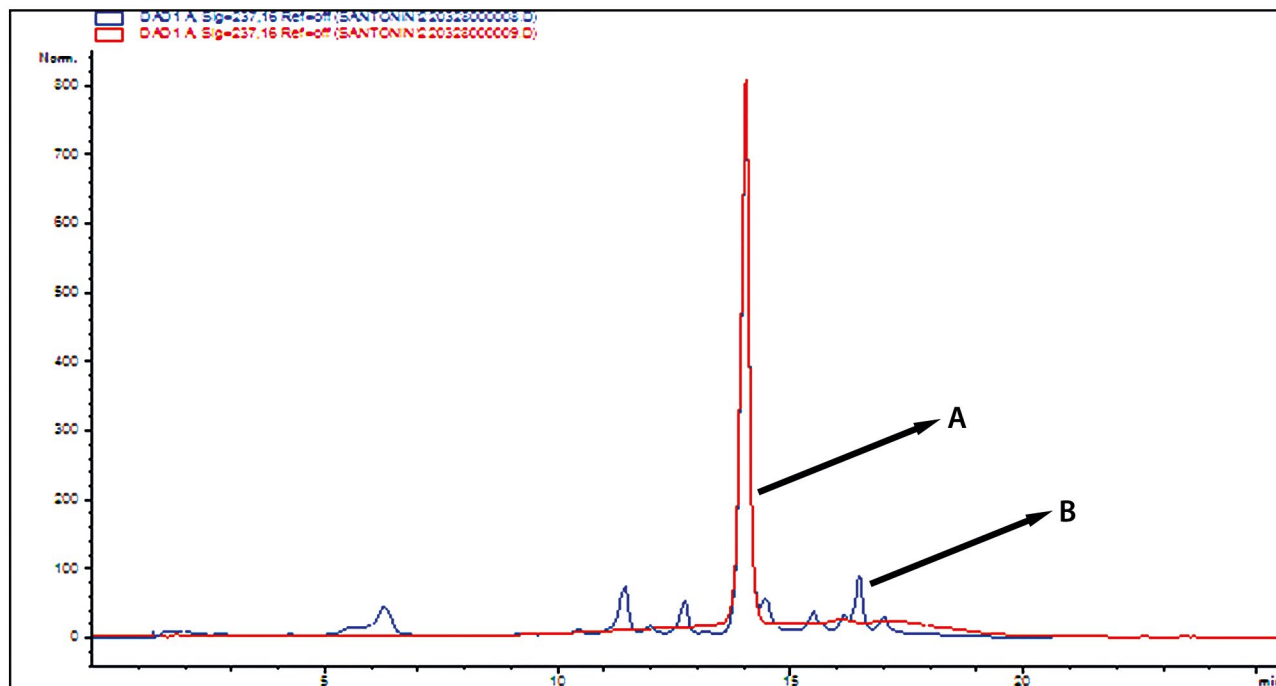


Figure 3. Chromatogram:

A – standard sample of santonin; **B** – oil extract of *Artemisia cina*

the retention time (t_R) of the peak of the SS santonin solution and is within 14.3 minutes with 99.9 % purity of the pharmaceutical substance. In order to show the separating ability of the system, we calculated the indicator R_s by the formula (1).

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R1} - t_{R2})}{W_{s1} + W_{s2}} = 0.69. \quad (1)$$

Linearity

The linearity was evaluated according to the graph of the dependence of the chromatographic peak area on the concentrations of santonin in the sample: 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/ml}$. When statistically processing the linear dependence according to the equation $y = 30.41x + 555.4$, the correlation coefficient of the linear regression graph r was 0.99960. The results obtained support the assertion that the developed methodology exhibits linearity (figure 4, table 1).

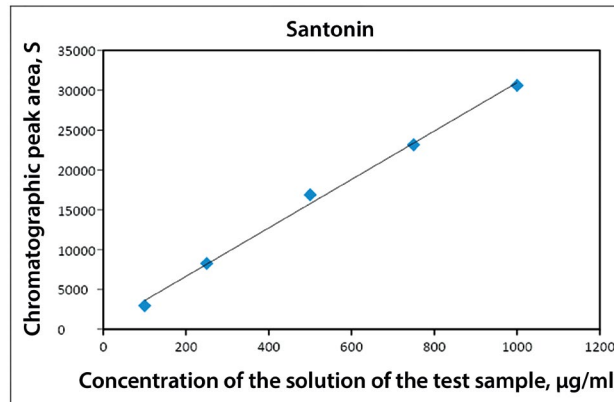


Figure 4. Calibration graph of the linear relationship between the concentration of santonin and the area of chromatographic peaks

Table 1. Estimation of the linear relationship between the concentration of santonin and the area of chromatographic peaks

№	Samples Concentration, $\mu\text{g/ml}$	Peak area, S	Metrological characteristics			
			SD	RSD	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	$\epsilon_{av}, \%$
1	100.0	2944.6	246.3	1.891	1.93	0.9996
2	250.0	8265.2				
3	500.0	16878.7				
4	750.0	23161.0				
5	1000.0	30602.5				

Precision

Standard samples santonin solution with concentrations of 100, 500, 1000 µg/ml were analyzed. Each solution was chromatographed 6 times. The study was conducted during day 1 (intra-day) and 2 day (inter-day). Standard deviation (SD), relative standard deviation (RSD) and relative error of the method (ϵ , %) of the obtained concentration values.

The relative error of the method was observed in the range of 1.02–1.91 % for sequence No. 1 and in the range of 1.01–1.63 % for sequence No. 2 and does not exceed the permissible standard deviation, which confirms the precision and correctness of the developed method (tables 2 and 3).
95 % confidence intervals were calculated. The true values fall within the obtained intervals, which confirms the precision and correctness of the developed method.

Table 2. Precision (intra-day). Sequence № 1

Conc, µg/ml	Peak area S	Obtained		Metrological characteristics						
		µg/ml	%	$\bar{X}$	S^2	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{X}$	SD	RSD	CI (95 %)
100	2944.6	99.11	99.11	98.97	0.450	0.274	0.704	0.671	0.006	98.97 ± 0.82
	2957.6	97.93	97.93							
	2978.3	99.61	99.61							
	2896.2	98.93	98.93							
	2963,1	98.27	98.27							
	2947.7	99.98	99.98							
500	16878.7	496.3	99.26	498.0	2.179	0.602	1.548	1.476	0.016	498.00 ± 1.23
	16882.8	498.6	99.72							
	16879.3	497.2	99.45							
	16879.5	498.3	99.66							
	16881.4	497.9	99.58							
	16896.5	499.7	99.95							
1000	30602.5	998.3	99.83	999.0	0.759	0.355	0.914	0.871	0.009	999.05 ± 0.80
	30611.2	999.3	99.93							
	30605.3	998.9	99.89							
	30601.2	998.1	99.81							
	30703.9	999.7	99.97							
	31062.8	1000.0	100.0							

Table 3. Precision (inter-day). Sequence № 2

Conc, µg/ml	Peak area, S	Obtained		Metrological characteristics						
		µg/ml	%	$\bar{X}$	S^2	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{X}$	SD	RSD	CI (95 %)
100	2943.9	97.5	97.55	98.42	1.872	0.558	1.431	1.368	0.015	98.42 ± 1.16
	2977.6	99.8	99.81							
	2958.5	99.7	99.78							
	2946.2	97.6	97.69							
	2943.1	97.4	97.43							
	2947.7	98.5	98.56							
500	16888.7	498.9	99.78	498.2	1.265	0.272	1.18	1.125	0.012	498.20 ± 0.85
	16892.8	499.3	99.86							
	16799.3	497.1	99.42							
	16879.1	498.2	99.64							
	16861.2	497.6	99.52							
	16876.3	498.1	99.62							
1000	30592.5	998.2	99.82	999.28	0.745	0.352	0.907	0.863	0.009	999.28 ± 0.79
	31351.2	1000.0	100.0							
	30685.3	998.8	99.88							
	30601.4	998.9	99.89							
	31056.3	999.9	99.99							
	30962.6	999.9	99.99							

The stability

The stability of the standard solutions of santonin and tested solutions of *Artemisia cina*'s oil extract according to santonin for chromatographic analysis was investigated. Short-term stability was studied within 24 hours after sample preparation and during the next day of analysis. The study of long-term stability showed that during chromatography of the studied solutions for 14 days when stored in a refrigerator from 2 to 8 °C, the standard solutions of santonin and tested solutions of the oil extract were stable. At the same time, the area of the chromatographic peak did not change more than 10 % during repeated analyses.

Reproducibility

There were prepared 9 test solutions to determine the reproducibility criterion and analyzed. The data obtained are shown in table 4. The method exhibits high reproducibility, as evidenced by the relative error of 1.67 %.

Limit of detection and limit of quantification

The analytical range of the technique of quantitative determination of santonin in the oil extract of *Artemisia cina* is determined, based on the accuracy, linearity and precision of the technique. The detection limit was 50 µl, the limit of quantitative determination was 100 µl, and the range of quantitative detection is in the range of 100–1000 µl.

We carried out a quantitative determination of laboratory samples (LS) of the oil extract of *Artemisia cina* for santonin, which was calculated using the formula (2):

$$X = \frac{S_1 \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot a_{CT} \cdot 100 \cdot W\%}{S_2 \cdot a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 1000} = \frac{S_1 \cdot a_{CT} \cdot W\%}{S_2 \cdot a} \quad (2)$$

The content of santonin in the oil extract is presented in Table 5.

Validation of the developed method of quantitative determination by the method of high-performance liquid chromatography showed that it is specific, characterized by correct accuracy and reproducibility in the analytical domain in relation to the established working concentration of santonin in solution, which allows it to be used for a reliable assessment of the quality of the oil extract by santonin.

CONCLUSION

A liquid chromatography technique has been developed for the identification and assay of the oil extract from *Artemisia cina*, focusing on its main active substance, santonin. validation of the developed technique revealed a linear relationship between the concentration of santonin and the area of chromatographic peaks, with a correlation coefficient (*r*) of 0.9996 Across a span of concentrations from 100–1000 µg/ml; the relative standard deviation of the technique is within 0.097–0.018 % (inter day) and within 0.096–0.272 % (int-

Table 4. Evaluation of the reproducibility of the method for the quantitative determination of santonin in the oil extract of *Artemisia cina*

№	Santonin content in model mixtures of oil extract, %	Metrological characteristics (SP RK v.1, p.100)						
		<i>n</i>	<i>x</i> _{av.}	<i>S</i>	$\Delta x_{av.}$	<i>P_f</i>	<i>x</i> _{av.} ± $\Delta x_{av.}$	$\epsilon_{av.}, \%$
1	0.612	9	0.61	0.009	0.010	0.372	0.61 ± 0.01	1.67
2	0.597							
3	0.619							
4	0.614							
5	0.599							
6	0.619							
7	0.620							
8	0.621							
9	0.616							

Table 5. Quantitative content of santonin in oil extract

№	Santonin substance in oil extract	Metrological characteristics						
		<i>n</i>	<i>x</i> _{av.}	<i>S</i>	$\Delta x_{av.}$	<i>Sx</i>	<i>x</i> _{av.} ± $\Delta x_{av.}$	$\epsilon_{av.}, \%$
1	0,620	6	0,61	5,7 · 10 ⁻³	8,8 · 10 ⁻³	3,4 · 10 ⁻³	0,61 ± 0,0088	1,45
2	0,615							
3	0,599							
4	0,612							
5	0,619							
6	0,593							

ra day) the relative error is within 1.01–1.91 % confirms the reliable reproducibility and accuracy of the developed methodology. Quantitative determination of laboratory samples of *Artemisia cina*'s oil extract by santonin using the developed liquid chromatography technique was about 0.6 %.

REFERENCES

1. Bykov V. A., Kolkhir V. K., Vichkanova S. A. The effectiveness of the development of medicines from plant raw materials. In: Bykov V. A., Kolkhir V. K., Vichkanova S. A., Sokol'skaya T. A., Krutikova N. M. Chemistry, technology, medicine. Moscow: Proceedings of the All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants; 2000. P. 177–185. (In Russ.)
2. Bagirova V. L., Sataeva L. G. The development of innovative drugs is the basis for improving the quality of drug provision in the Republic of Kazakhstan. *Russian Medical Journal*. 2008;3:33–37. (In Russ.)
3. WHO monographs on medicinal plants widely used in the Newly Independent States (NIS). Moscow: WHO; 2010. 464 p. (In Russ.)
4. Vasiliev A. S., Kalinkina G. I., Tikhonov V. N. Medicinal products of plant origin. Tomsk: SSMU; 2006. 122 p. (In Russ.)
5. Bogoyavlensky A. P., Alekxyuk P. G., Turmagambetova A. S., Berezin V. E. Current problems of standardization of phytopreparations and plant materials for their production. *Fundamental research*. 2013;6(5):1184–1187. (In Russ.)
6. Nurlybekova A., Kudaibergen A., Kazymbetova A. Traditional use, phytochemical profiles and pharmacological properties of the genus *Artemisia* from Central Asia. Berlin: ResearchGate; 2015. 307 p.
7. Nurlybekova A., Kudaibergen A., Kazymbetova A., Amangeldi M., Baiseitova A., Ospanov M., Aisa H. A., Ye Y., Ibrahim M. A., Jemis J. Traditional use, phytochemical profiles and pharmacological properties of *Artemisia* genus from Central Asia. *Molecules*. 2022;27(16):5128. DOI: 10.3390/molecules27165128.
8. Omarova R. A., Sakipova Z. B., Bekezhanova T. S., Tokhtakhunova A. A. Ways and prospects of using *Artemisia cina* in medicine. *Bulletin of KazNMU*. 2014;5:177–179. (In Russ.)
9. Ordabayeva S. K., Seitzhanova Zh. S., Serikbayeva A. D., Tursubekova B. I., Asilbekova A. D., Makhova E. G., Dzhanaralieva K. S. Method of obtaining *Artemisia cina* oil extract. Patent of the Republic of Kazakhstan for invention No. 2020.0737.1 10.23.2020. (In Russ.)
10. Bakhytkyzy G., Serikbayeva A. D., Ordabayeva S. K., Asilbekova A. D., Shirazi F. Kh. IR spectroscopy in the analysis of *Artemisia cina*'s oil extract. In: Collection of materials of the XXX Russian National Congress "Man and medicine". Moscow: Cardiovascular therapy and prevention; 2023. P. 95. (In Russ.)
11. Bakhytkyzy G., Ordabayeva S. K., Serikbayeva A. Zh., et al. Determination of numerical indicators of *Artemisia cina* oil extract. In: Proceedings of the Congress on Pharmacy Updates "International Pharmacy Acta. I.P.". 2023 54 p. (In Russ.)
12. "Artemisia cina". Germplasm Resources Information Network (GRIN). Agricultural Research Service (ARS). Washington: United States Department of Agriculture (USDA); 2018. P. 96.
13. El-Feraly F. S., Benigni D. A., McPhail A. T. Biogenetic-type synthesis of santonin, chrysanolide, dihydrochrysanolide, tulirinol, arbusculin-C, tanacetin, and artemin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1983;12:355–364. DOI: 10.1039/p19830000355.
14. Elisabetta M., Sara F. and Gian Gabriele F. Santonin: A New Method of Extraction from and Quantitative Determination in *Artemisia caerulescens* ssp. *cretacea* (Fiori). In: Horváth C., editor. High-Performance Liquid Chromatography. New York: Academic Press; 1998. P. 296–298.
15. Bakhytkyzy G., Iacob B. S., Ordabayeva S. K., Serikbayeva A. D., Mirsoatova M. A. Development of a validated liquid chromatography technique for the study of santonin. *Pharmacy of Kazakhstan*. 2023;2(247):112–119. (In Russ.)
16. Kenny A. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Rockville. In: Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2018. P. 5–12.
17. Rockville C. European Medicines Agency Guideline on Validation of Bioanalytical Methods. In: Committee for Medicinal Products for Human Use. 2011. P. 4–21.
18. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. Volume 1. Almaty: Publishing House "Zhibek Zholy". 2009. 199 p. (In Russ.)
19. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. Volume 3. Almaty: Publishing house "Zhibek zholy". 2014. 293 p. (In Russ.)
20. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. Volume 2. Almaty: Publishing house "Zhibek zholy". 2009. 292 p. (In Russ.)
21. Karomatov I. D., Ruzieva I. G. Prospects of Application of the Herb *Artemisia Cina*. *Biologiya i integrativnaya medicina*. 2018;9(26):102–109. (In Russ.)
22. Isani G., Bertocchi M., Andreani G., Farruggia G., Cappadone C., Salaroli R., Forni M., Bernardini C. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and Pure Artemisinin on the D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;1615758. DOI: 10.1155/2019/1615758.
23. Vasiliev A. N., Romanova A. P., Goloskokov V. P., et al. Floristic finds in the Central Kazakhstan. Alma-Ata: Nauka; 1966. 638 p. (In Russ.)
24. Aggarwal S., Shailendra G., Ribnick D. M., Burk D., Karki N., Qingxia Wang M. S. An extract of *Artemisia dracunculoides* L. stimulates insulin secretion from β cells, activates AMPK and suppresses inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;170:98–105. DOI: 10.1016/j.jep.2015.05.003.
25. Loux J. J., DePalma P. D., Yankell S. L. Antipyretic testing of aspirin in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1972;22(4):672–675. DOI: 10.1016/0041-008x(72)90295-5.
26. Klockhov S. G., Afanas'eva S. V., Pushin A. N., Gerasimova G. K., Vlasenkova N. K., Bulychiev Yu. N. Synthesis and cytotoxic activity of α -santonin amino-derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009;45:817–823. DOI: 10.1007/s10600-010-9499-3.
27. Morsy T. A., Mazyad S. A., el-Sharkawy I. M. The larvicidal activity of solvent extracts of three medicinal plants against third instar larvae of *Chrysomya albiceps*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 1998;28(3):699–709.
28. Chen H., Yan X., Yu Z., Cheng Z., Yuan H., Zhao Z., Wu G., Xie N., Yuan X., Sun Q., Zhang W. Synthesis and biological evaluation of α -santonin derivatives as anti-he-

- patoma agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;149:90–97. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.02.073.
29. Gafurov N. M., Seitembetov T. S., Adekenov S. M., et al. Synthesis and biological activity of new derivatives of α -santonins and estafiatin In: *Phytochemistry for the development of the domestic pharmaceutical industry: Tr. rep. scientific-practical conf., dedicated. 60th anniversary of the scientist M. N. Mukhametzhannov. Karaganda; 2000. P. 80–82. (In Russ.)*
30. Khazir J., Singh P. P., Reddy D. M., Hyder I., Shafi S., Sawant S. D., Chashoo G., Mahajan A., Alam M. S., Saxena A. K., Arvinda S., Gupta B. D., Sampath Kumar H. M. Synthesis and anticancer activity of novel spiro-isoxazoline and spiro-isoxazolidine derivatives of α -santonin. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;63:279–289. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.01.003.
31. Tanaguzova B. M., Ivasenko S. A., Atazhanova G. A., Adekenov S. M. Towards standardization of patronymic phytopreparations based on essential oils. *Pharmacy of Kazakhstan*. 2005;25–26. (In Russ.)
32. Beisenbayev A. A., Uzbekov V. A., Rakhmanov K. D., et al. Toxic and locally irritating properties of wormwood essential oil. *Pharmaceutical Bulletin*. 2001;5:18–19. (In Russ.)
33. Tanaguzova B. M., Sadyrbekova D. T., Atazhanova G. A., et al. Standardization of essential oils of wormwood. In: *New achievements in the creation of 137 herbal medicines. Tomsk; 2006. P. 314–317. (In Russ.)*
34. Bhakuni R. S., Jain D. C., Sharma R. P., Kumar S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*. 2001;80(1):35–48.
35. Asanova Zh. K., Suleimenov E. M., Atazhanova G. A., Dembitsky A. D., Pak R. N., Dar A., Adekenov S. M. 1,8-cineole from *Artemisia citravens* and its biological activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2003;37(1):30–32. (In Russ.)
36. Satyavan S., Nitya A. Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs. Amsterdam: Elsevier; 1997. 511 p.
37. Pharmacopoeia of the USA. Volume 3. 1998. 196 p.
38. Passreiter C. M., Sandoval-Ramirez J., Wright C. W. Sesquiterpene lactones from *Neurolaena oaxacana*. *Journal of Natural Products*. 1999;62(8):1093–1095. DOI: 10.1021/np990038t.
39. Izhanova H. I. Pharmacological study of white wormwood and the development of the dosage form of arglabin. [Dissertation.] Tomsk; 2003. 25 p. (In Russ.)
40. Woodward R. B., Brutschy F. J., Baer H. The structure of santonin acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1948;70(12):4216–4221. DOI: 10.1021/ja01192a070.
41. Badria F. A. E., Zaghloul A. M., Maatooq G. T., El-Sharkawy S. H. Biotransformation of α -santonin. *Pharmaceutical Biology*. 1997;35(5):375–378.
42. Clemo G. R., Haworth R. D. CCCXL. – The composition of santonin. Part III. Proof of the position of methyl groups. *Journal of the Chemical Society*. 1930. P. 2579–2582 DOI: 10.1039/JR9300002579.
43. Ivasenko S. A. Chemical modification and biological activity of sesquiterpene lactones in the form of santonin and grosshemin. [Dissertation.] Karaganda; 2004. 70 p. (In Russ.)
44. Balammal G., Sekar Babu M., Jayachandra Reddy P. Analysis of herbal medicines by modern chromatographic techniques. *International Journal of Preclinical and Pharmaceutical Research*. 2012;3(1):50–63.
45. Atanasov A. G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.-M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Temml V., Wang L., Schwaiger S., Heiss E. H., Rollinger J. M., Schuster D., Breuss J. M., Bochkov V., Mihovilovic M. D., Kopp B., Bauer R., Dirsch V. M., Stuppner H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*. 2015;33(8):1582–1614. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
46. Ivasenko S. A., Edil'baeva T. T., Kulyyasov A. T., Atazhanova G. A., Drab A. I., Turdybekov K. M., Raldugin V. A., Adekenov S. M. Structure and biological activity of α -santonin chloro-derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*. 2006;42:36–40. DOI: 10.1007/s10600-006-0031-8.
47. De Kraker J. U., Franssen M. S., et al. The chemical composition of santonin. *J. from the American Pharmaceutical Association*. 2006;16(7):1.
48. Ata A., Nachtigall J. A. Microbial transformations of α -santonin. *Research Gate*. 2004;209–214.
49. Abe Y., Harukawa T., Ishikawa H., et al. Santonin. III. 1 Complete synthesis of Santonin 2. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;78(7):1422–1426.
50. Sakipova Z., Wong N., Bekezhanova T., Sadykova A. et al. Quantitative determination of santonin in eight types of wormwood from Kazakhstan using HPLC-UV: development and verification of the method. *Scientist. Google*. 2017.
51. Atta-ur-Rahman, Farooq A., Anjum S., Choudhary Marshall J. Microbial transformations of xanthohumol. *Phytochemistry. Nat. Customize. Lett.* 1978. 62 p.
52. Kawai S., Kataoka T., Sugimoto H. et. al. Santonin-related compound 2 inhibits ICAM-1 expression in response to IL-1 stimulation by blocking signal transmission. *Immunopharmacology*. 2000;6:3109.
53. Chen H., Yan X., Yu Z., Chen J., et. al. Synthesis and biological evaluation of α -santonin derivatives as antiparasitic agents. *European Journal of Medical Chemistry*. 2018;6:652.
54. Stereokon M. I. Microbial transformations of cytotoxically controlled synthesis of α - and β -santonin. Organization. *Chemical.. natural products. Current Organic Chemistry*. 1999;43:1086–1089.



Количественное определение дубильных веществ методами титриметрии и спектрофотометрии в сырье некоторых представителей рода *Rumex* трех сроков вегетации

А. М. Полуянов^{1,2}✉, А. Е. Савельева¹, А.-Д. Койнова², А. Г. Полухина²,
Ф. И. Гаджиева³, А. Ю. Соколова¹, А. М. Анцышкина², Н. В. Бобкова^{2,4}

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 автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ). 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

⁴ 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: Полуянов Андрей Михайлович. E-mail: a.poluyanov@scientific-compliance.ru

ORCID: А. М. Полуянов – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;

А. Е. Савельева – <https://orcid.org/0009-0004-9691-9560>;

А.-Д. Койнова – <https://orcid.org/0009-0003-8969-8854>;

А. Г. Полухина – <https://orcid.org/0009-0005-5651-4996>;

Ф. И. Гаджиева – <https://orcid.org/0009-0008-5019-7602>;

А. Ю. Соколова – <https://orcid.org/0000-0002-7500-5880>;

А. М. Анцышкина – <https://orcid.org/0000-0003-2129-9585>;

Н. В. Бобкова – <https://orcid.org/0000-0003-1591-4019>.

Статья поступила: 20.09.2024

Статья принята в печать: 02.11.2024

Статья опубликована: 02.11.2024

Резюме

Введение. Изучение химического состава лекарственного растительного сырья и сравнительный анализ динамики накопления биологически активных веществ в родственных лекарственных растениях необходимы для создания высокоэффективных и безопасных лекарственных средств. Сходным с официальным представителем рода *Rumex* (далее *R.*) – *R. confertus* – метаболом обладают широко распространенные в России виды: шавель курчавый, шавель туполистный, шавель водный, что обуславливает перспективность изучения данных видов. Научный и практический интерес представляет изучение обладающей антибактериальной активностью группы БАВ – дубильных веществ на различных фенологических стадиях развития растения.

Цель. Количественное определение дубильных веществ методами перманганатометрии и спектрофотометрии в подземных органах шавеля конского, щ. курчавого, щ. водного, щ. туполистного, заготовленных в различные фазы вегетации: отрастания, цветения и отмирания надземной части.

Материалы и методы. Анализировались водные извлечения из подземных органов изучаемых видов щавеля. Извлечения и полученные в ходе исследования растворы анализировались с помощью методов перманганатометрии, спектрофотометрии и ВЭЖХ. Соединения из группы дубильных веществ идентифицировали по длине волны максимума поглощения.

Результаты и обсуждение. Проведена оценка количественного содержания дубильных веществ методами перманганатометрии, спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Заключение. В извлечениях из подземных органов щ. конского, щ. курчавого, щ. туполистного, щ. водного были обнаружены и количественно определены дубильные вещества, проанализирована зависимость между их количественным содержанием и фазой вегетации.

Ключевые слова: дубильные вещества, *Rumex confertus*, *Rumex crispus*, *Rumex obtusifolius*, *Rumex aquaticus*

© Полуянов А. М., Савельева А. Е., Койнова А.-Д., Полухина А. Г., Гаджиева Ф. И., Соколова А. Ю., Анцышкина А. М., Бобкова Н. В., 2024

© Poluyanov A. M., Savelyeva A. E., Koinova A.-D., Polukhina A. G., Gadzhieva F. I., Sokolova A. Yu., Antsyshkina A. M., Bobkova N. V., 2024

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

Вклад авторов. А. М. Полуянов и Н. В. Бобкова придумали и разработали эксперимент. А. М. Полуянов, А.-Д. Койнова, А. Ю. Соколова, А. Е. Савельева, А. Г. Полухина и Ф. И. Гаджиева провели исследования методами перманганатометрии, спектрофотометрии и ВЭЖХ-УФ. А. М. Полуянов, А.-Д. Койнова, А. Ю. Соколова и А. М. Анцышкину участвовали в обработке данных. А. М. Полуянов, А.-Д. Койнова, А. Ю. Соколова и А. Е. Савельева участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Полуянов А. М., Савельева А. Е., Койнова А.-Д., Полухина А. Г., Гаджиева Ф. И., Соколова А. Ю., Анцышкина А. М., Бобкова Н. В. Количественное определение дубильных веществ методами титриметрии и спектрофотометрии в сырье некоторых представителей рода *Rumex* трех сроков вегетации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):148–160. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1937>

Quantitative determination of tannins by titrimetry and spectrophotometry in raw materials of some representatives of the genus *Rumex* of three growing seasons

Andrey M. Poluyanov^{1,2}✉, Anna E. Savelyeva¹, Anna-Daniella Koinova²,
Alexandra G. Polukhina², Fidan I. Gadzhieva³, Anna Yu. Sokolova¹,
Alla M. Antsyshkina², Natalia V. Bobkova^{2,4}

¹ Limited Liability Company "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 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 National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute). 31, Kashirskoe shosse, Moscow, 115409, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University. 27/1, Lomonosovsky prospect, Moscow, 119192, Russia

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

ORCID: Andrey M. Poluyanov – <https://orcid.org/0000-0002-9960-6699>;
Anna E. Savelyeva – <https://orcid.org/0009-0004-9691-9560>;
Anna-Daniella Koinova – <https://orcid.org/0009-0003-8969-8854>;
Alexandra G. Polukhina – <https://orcid.org/0009-0005-5651-4996>;
Fidan I. Gadzhieva – <https://orcid.org/0009-0008-5019-7602>;
Anna Yu. Sokolova – <https://orcid.org/0000-0002-7500-5880>;
Alla M. Antsyshkina – <https://orcid.org/0000-0003-2129-9585>;
Natalia V. Bobkova – <https://orcid.org/0000-0003-1591-4019>.

Received: 20.09.2024

Accepted: 02.11.2024

Published: 02.11.2024

Abstract

Introduction. Study of the chemical composition of medicinal plant raw materials and comparative analysis of the dynamics of accumulation of biologically active substances in related medicinal plants is necessary for the creation of highly effective and safe drugs. Similar metabolome to the officinal representative of the genus *Rumex* (hereinafter referred to as *R.*) – *R. confertus* – the metabolome of species widely distributed in Russia: *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *R. aquaticus*, which determines the perspectivity of studying these species. Scientific and practical interest is represented by the study of the group of biologically active substances possessing antibacterial activity – tannins at different phenological stages of plant development.

Aim. Quantitative determination of tannins by permanganatometry and spectrophotometry methods in underground organs of *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *R. aquaticus*, harvested in different phases of vegetation: regrowth, flowering and withering periods.

Materials and methods. Aqueous extracts from underground organs of the studied *Rumex* species were analyzed. Extractions and solutions obtained during the study were analyzed by permanganatometry, spectrophotometry and HPLC. The compounds from the group of tannins were identified by the wavelength of absorption maximum.

Results and discussion. The quantitative content of tannins was evaluated by permanganatometry, spectrophotometry and HPLC.

Conclusion. Tannins were detected and quantified in extracts from underground organs of *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *R. aquaticus* and the dependence between their quantitative content and vegetation phase was analyzed.

Keywords: tannins, *Rumex confertus*, *Rumex crispus*, *Rumex obtusifolius*, *Rumex aquaticus*

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

Contribution of the authors. Andrey M. Poluyanov and Natalia V. Bobkova conceived and designed the experiment. Andrey M. Poluyanov, Anna-Daniella Koinova, Anna Y. Sokolova, Anna E. Savelyeva, Alexandra G. Polukhina, and Fidan I. Gadzhieva carried out the studies by permanganatometry, spectrophotometry, and HPLC-UV methods.

Andrey M. Poluyanov, Anna-Daniella Koinova, Anna Y. Sokolova, and Alla M. Antsyshkina participated in data processing. Andrey M. Poluyanov, Anna-Daniella Koinova, Anna Y. Sokolova, and Anna E. Savelyeva participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Poluyanov A. M., Savelyeva A. E., Koinova A.-D., Polukhina A. G., Gadzhieva F. I., Sokolova A. Yu., Antsyshkina A. M., Bobkova N. V. Quantitative determination of tannins by titrimetry and spectrophotometry in raw materials of some representatives of the genus *Rumex* of three growing seasons. *Drug development & registration*. 2024;13(4):148–160. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1937>

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Rumex* семейства Polygonaceae, широко распространенные по всему миру, содержат ряд биологически активных веществ (БАВ): хиноны, флавоноиды, дубильные вещества (ДВ), терпены, терпеновые алкалоиды, лигнаны, каротиноиды, аскорбиновую кислоту, антраценпроизводные [1]. Согласно метаисследованиям, сырье представителей рода *Rumex* может применяться в комплексной терапии при легких формах диабета, обстипации, различных инфекциях, диарее, желтухах, как антигипертензивное средство и гепатопротектор [2–22].

Важной группой БАВ, содержащихся в сырье представителей данного рода, являются полифенольные соединения, обладающие антиоксидантной активностью и образующие хелатные комплексы с металлами [14]. К группе полифенольных соединений относятся, в частности, ДВ, находящие применение в медицине благодаря своим антибактериальным, противогельминтным и противовоспалительным свойствам [4]. Количественное определение ДВ проводилось в отношении таких представителей рода *Rumex*, как *R. acetosa*, *R. acetosella*, *R. crispus*, *R. confertus*, *R. maritimus*, *R. obtusifolius*, *R. acetosella*, *R. japonicus*, *R. dentatus* [1, 5, 6].

Количественное содержание ДВ в корнях щавеля конского в различных литературных источниках составляет от 5 до 22,65 % [8, 9]. Согласно фармакопее ДВ определяются двумя методами: прямой перманганатометрии и спектрофотометрии с кожным порошком¹. В литературных источниках приведены более чувствительные и селективные инструментальные методы анализа: высокоэффективная жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез [15, 16].

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания, ОФС 1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Доступно по: <https://docs.ruslml.ru/feml/pharma/v14/vol2/551/> Ссылка активна на 02.08.2023

Несмотря на преимущества, они имеют и ряд недостатков, к основным из которых можно отнести невысокую воспроизводимость методик, связанную с низкой стабильностью ДВ.

Большой интерес представляет изучение некоторых видов рода щавель, широко произрастающих на территории России: щ. курчавого (*R. crispus*), щ. туполистного (*R. obtusifolius*) и щ. водного (*R. aquaticus*). Содержание ДВ в них, согласно литературным источникам, представлено в таблице 1.

Таблица 1. Содержание дубильных веществ в подземных органах, листьях и плодах выбранных видов щавелей согласно литературным источникам

Table 1. Content of tannins in the underground organs, leaves and fruits of selected *Rumex* species according to literary sources

Виды щавеля <i>Rumex species</i>	Содержание дубильных веществ в подземных органах и надземных органах, % Tannin content in underground and aboveground organs, %	
	Подземные органы Underground organs	Надземная часть Aerial part
Щ. конский <i>R. confertus</i>	От 19,1 до 22,65 [8, 18]	От 6,55 до 10,36 [8, 18]
Щ. курчавый <i>R. crispus</i>	От 10,0 до 19,36 [8, 21]	От 1,4 до 4,88 [6, 8, 19]
Щ. туполистный <i>R. obtusifolius</i>	От 12,98 до 15,5 [8, 21]	От 1,7 до 6,00 [6, 8]
Щ. водный <i>R. aquaticus</i>	15,37 [10]	Нет данных No data available

В литературе отмечается несоответствие периода максимального содержания различных групп БАВ в подземных органах общепринятому сроку их

заготовки [11, 12]. О щ. водном в целом очень мало информации в литературных источниках. В связи с этим особенно важно провести сравнительный анализ динамики накопления дубильных веществ в некоторых видах щавеля в зависимости от стадии вегетации.

Целью данного исследования являлось количественное определение дубильных веществ различными методами в подземных органах *R. confertus*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *R. aquaticus*, заготовленных в различные фазы вегетации: отрастания, цветения и отмирания надземной части.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе исследования были использованы следующие реактивы: железа (II) сульфат 7-водный (ч.д.а., АО «ЛенРеактив», Россия), калий-натрий виннокислый 4-водный (ч.д.а., АО «ЛенРеактив», Россия), индигокармин (ч.д.а., АО «ЛенРеактив», Россия), серная кислота (ос.ч., ООО «СигмаТек», Россия); калий марганцовокислый, стандарт-титр (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия), свинец уксуснокислый (II) 3-водный (ч.д.а., АО «ЛенРеактив», Россия), натрий фосфорнокислый двузамещенный, 12-водный (ч., ООО «АО РЕАХИМ», Россия), натрия гидроксид (ч.д.а., ООО «Компонент-Реактив», Россия), ортофосфорная кислота концентрированная (for HPLC, Scharlau, Испания).

Стандартные образцы: эпигаллокатехина галлат (Fluka, Германия), галловая кислота (Sigma-Aldrich), эпикатехин (Sigma-Aldrich, Германия), катехин (Sigma-Aldrich, Германия).

В качестве оборудования для выполнения эксперимента были использованы: спектрофотометр СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия), водяная баня STEGLER WB-4 (STEGLER, Китай), дозаторы переменного объема от 100–1000 мкл, от 1000 до 5000 мкл (Sartorius AG, Германия), весы аналитические R200D (Sartorius AG, Германия).

Количественную оценку осуществляли на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Хроматэк-Кристалл ВЭЖХ 2014» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия), оснащенном ультрафиолетовым детектором; хроматографическая колонка Grace HPLC Column Platinum C18-EPS, 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Grace, США).

Обнаружение осуществлялось при длине волны $\lambda = 275 \pm 2$ нм. Подвижная фаза содержала водный раствор муравьиной кислоты с pH = 2,5 (элюент А); ацетонитрил (элюент В) со скоростью потока: 1 мл/мин. Использованный градиент подвижной фазы показан на рисунке 1 [22].

В качестве объектов исследования выступало лекарственное растительное сырье растений семейства гречишных (Polygonaceae): официальное лекарственное растительное сырье – щавеля конского корня (*Rumex confertus* Willd., radices) и нефармакопейное

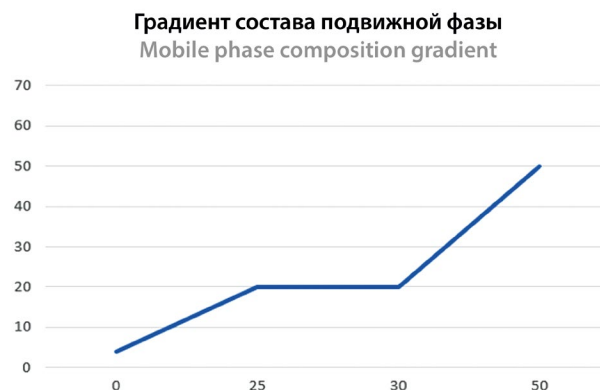


Рисунок 1. Градиент подвижной фазы

Figure 1. Mobile phase gradient

сырье растений, лекарственные свойства которых описаны в литературных источниках, – подземные органы щавеля водного (*Rumex aquaticus* L.), щавеля курчавого (*Rumex crispus* L.), щавеля туполистного (*Rumex obtusifolius* L.), заготовленные в период весеннего отрастания (апрель-май 2022 года, «отрастание») и в период увядания надземной части (октябрь 2021 года, «увядание»). Также сырье было заготовлено в период цветения (июнь-июль 2021 года, «цветение»).

Местом заготовки щ. конского, щ. водного, щ. туполистного было поселение Роговское, Москва, Россия (координаты: 55.245626, 37.009576). Щ. курчавый был заготовлен в поселении Краснопахорское, Москва, Россия (координаты: 55.384859, 37.225441).

Собранные подземные органы были промыты от земли проточной холодной водой. Перед сушкой наиболее массивные подземные органы были разделены вдоль на две части. Сушка производилась при комнатной температуре в хорошо проветриваемом помещении, без доступа солнечных лучей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перманганатометрия

Водные извлечения из сырья были получены в соответствии с методикой, представленной в нормативной документации¹. Для максимального извлечения из сырья дубильных веществ проводилась экстракция кипящей водой. Данный способ экстракции позволяет экстрагировать преимущественно гидрофильные вещества фенольной структуры.

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания, ОФС 1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/551/> Ссылка активна на 02.08.2023

С целью оценки общего содержания полифенолов была проведена перманганатометрия по методике из нормативной документации. Полученные данные отображены в таблице 2 и на рисунке 2.

Несмотря на простоту и экспрессность метода, ошибка определения является высокой из-за способности перманганата калия окислять другие группы БАВ. Анализ полученных значений содержания показал: самое низкое значение дубильных веществ обнаружено у щ. туполистного в фазе отмирания над-

земной части; наибольшее – у щ. конского в фазе цветения. У всех объектов наименьший процент содержания был в фазе отмирания, за исключением щ. курчавого.

Спектрофотометрия

Определение методом спектрофотометрии проводилось тремя различными способами: была измерена оптическая плотность нативных водных из-

Таблица 2. Оценка количественного содержания дубильных веществ в подземных органах методом перманганатометрии

Table 2. Content of tannins in the underground organs, estimated using permanganometry

Вид щавеля <i>Rumex</i> sp. Фаза вегетации <i>Rumex</i> sp. Vegetative phase	Содержание дубильных веществ, % Content of tannins, %		
	Отрастание Regrowth	Цветение Flowering	Отмирание Senescence
Щ. конский <i>Rumex confertus</i> <i>Rumex confertus</i>	11,91 ± 0,43	12,07 ± 0,12	5,97 ± 0,21
Щ. курчавый <i>R. crispus</i> <i>R. crispus</i>	4,14 ± 0,41	5,73 ± 0,48	5,02 ± 0,3
Щ. туполистный <i>R. obtusifolius</i> <i>R. obtusifolius</i>	5,45 ± 0,2	3,53 ± 0,21	2,57 ± 0,0
Щ. водный <i>R. aquaticus</i> <i>R. obtusifolius</i>	8,83 ± 0,24	8,81 ± 0,43	4,95 ± 0,16



Рисунок 2. Количественное содержание дубильных веществ в подземных органах в трех фазах вегетации, определенное методом перманганатометрии, %

Figure 2. Quantitative content of tannins in the underground organs during three vegetative phases, %

влечений из подземных органов изучаемых видов щавеля трех различных вегетаций; извлечений с добавлением фосфатного буфера и железо-тарtratного реактива (ЖТР).

Измерение нативных водных извлечений проводилось при длине волны 282 нм [3]. Данный максимум поглощения относится к веществам преимущественно фенольного характера и наблюдается у всех изучаемых объектов. Полученные спектры изображены на рисунке 3.

Определение оптической плотности при длине волны 282 нм у нативных извлечений имеет существенный недостаток, связанный с низким уровнем селективности методики. Несмотря на это, полученные предварительные данные, приведенные в таблице 3, можно использовать с целью скрининга содержания изучаемой группы БАВ. Наибольшее полученное значение составило $4,56 \pm 0,018$ % у щ. конского в фазе цветения, наименьшее – у щ. туполистного – $0,77 \pm 0,006$ %. У всех видов отмечена тенденция к снижению содержания от фазы отрастания к фазе отмирания, исключением является щ. курчавый, у которого меньшее значение обнаружено в фазе цветения (рисунок 4).

С целью увеличения селективности методики с водными извлечениями было решено провести реакцию, которая обеспечит батохромный сдвиг максимума поглощения анализируемых веществ. Методика представлена на рисунке 5. Реакция, происходящая между ДВ и ЖТР, представлена на рисунке 6.

В качестве раствора сравнения использовались те же извлечения, очищенные от дубильных веществ с помощью ацетата свинца, образующего комплексы с дубильными веществами, выпадающими в осадок (рисунок 7).

Измерение извлечений с ЖТР проводилось при селективной длине волны 545 нм, что позволило отделить дубильные вещества от других фенольных соединений. Данный факт можно подтвердить сравнением количественных результатов для нативных соединений при длине волны 282 нм и после реакции тех же экстрактов с ЖТР (рисунок 8).

Значения количественного содержания дубильных веществ после реакции с ЖТР характерно ниже, чем у нативных извлечений (таблица 4). У щ. туполистного отмечается полное отсутствие дубильных веществ в фазах отрастания и отмирания.

В сравнении с нативными извлечениями в фазе отрастания можно отметить в целом большее содержание фенольных соединений, но дубильных ве-

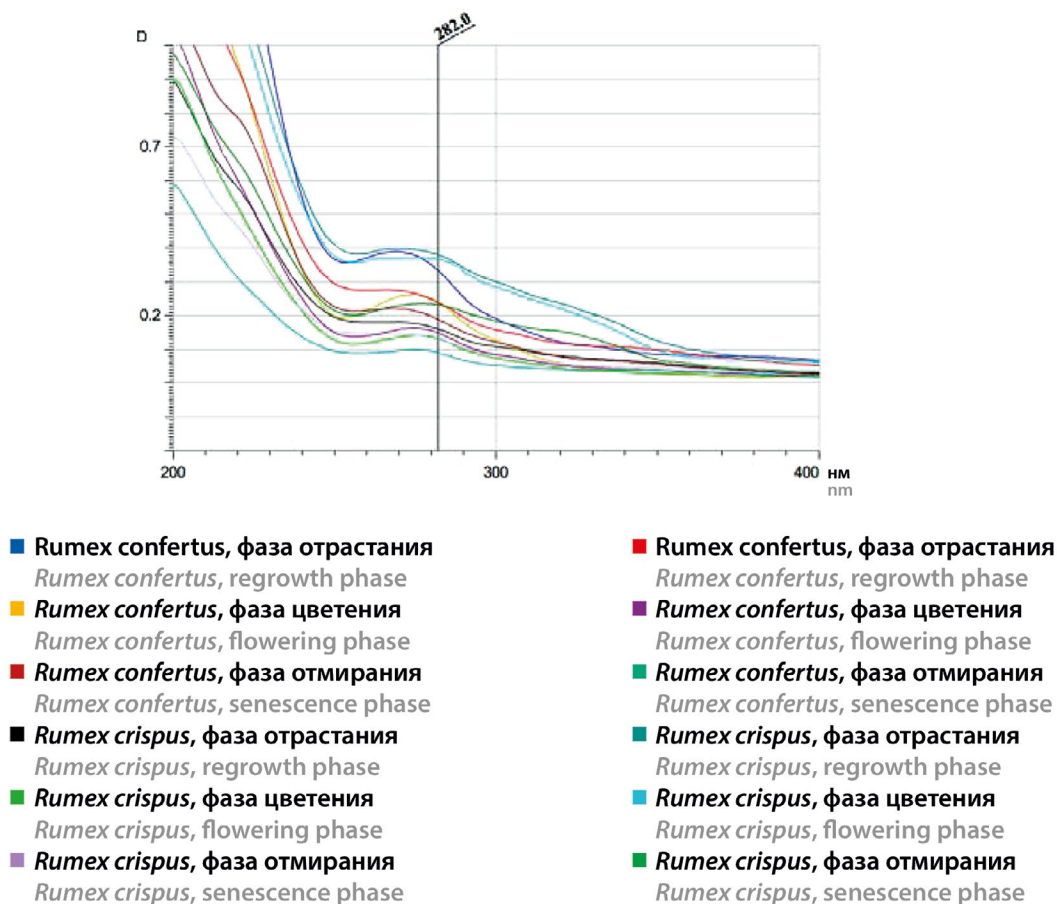


Рисунок 3. Спектры нативных извлечений

Figure 3. Spectra of original extracts

Таблица 3. Оценка содержания дубильных веществ в нативных извлечениях методом спектрофотометрии

Table 3. Content of tannins in the original extracts, estimated using spectrophotometry

Вид щавеля <i>Rumex</i> sp. Фаза вегетации Vegetative phase <i>Rumex</i> sp.	Содержание дубильных веществ в нативных извлечениях, % Content of tannins in the original extracts, %		
	Отрастание Regrowth	Цветение Flowering	Отмирание Senescence
Щ. конский <i>Rumex confertus</i> <i>Rumex confertus</i>	2,88 ± 0,015	4,56 ± 0,018	1,61 ± 0,008
Щ. курчавый <i>Rumex crispus</i> <i>R. crispus</i>	1,39 ± 0,009	1,14 ± 0,007	1,25 ± 0,005
Щ. туполистный <i>Rumex obtusifolius</i> <i>R. obtusifolius</i>	2,02 ± 0,004	1,13 ± 0,003	0,77 ± 0,006
Щ. водный <i>Rumex aquaticus</i> <i>R. obtusifolius</i>	3,29 ± 0,002	3,15 ± 0,005	1,98 ± 0,016

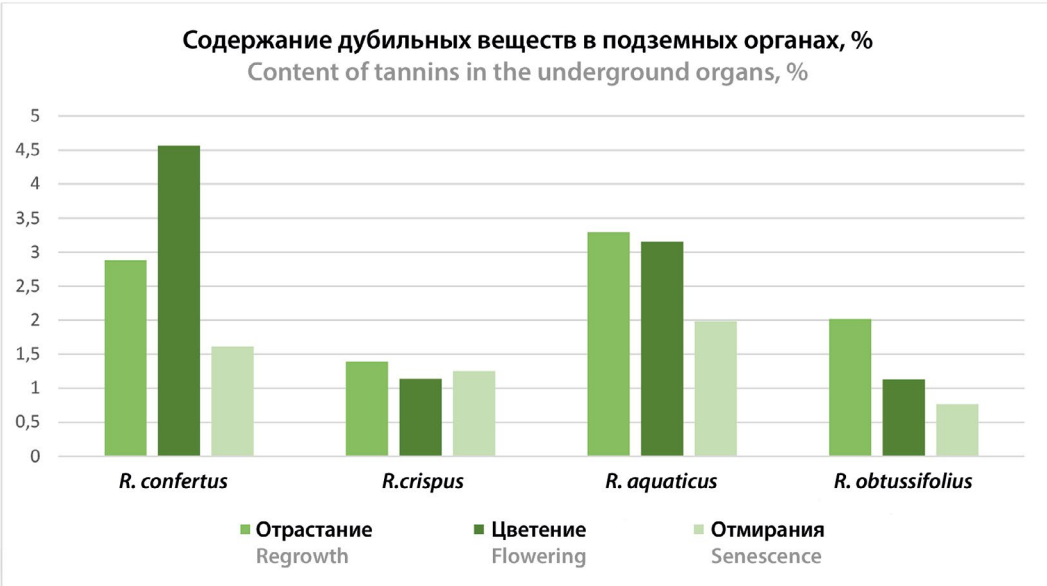


Рисунок 4. Накопление дубильных веществ в подземных органах в трех вегетативных фазах в нативных извлечениях

Figure 4. Accumulation of tannins in the underground organs during three vegetative phases of native extracts

ществ больше именно в фазе цветения. Сравнение содержания ДВ после реакции с ЖТР по фазам вегетации приведено на рисунке 9.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Хроматографическое определение было проведено в присутствии 4 стандартных образцов из группы дубильных веществ: галловой кислоты, катихина, эпикатехина и элгаллокатехин галлата, хроматограмма которых приведена на рисунке 10. Полученные хроматограммы приведены на рисунке 11.

Согласно полученным данным, в изучаемых объектах индивидуальные вещества обнаружены не были. Лишь у щ. конского в фазе отмирания надземной части было обнаружено 0,04 % эпикатехина.

В изучаемых объектах было подтверждено крайне низкое содержание анализируемых соединений, однако, исходя из литературных данных и результатов спектрофотометрии с ЖТР, можно предположить, что в видах рода *Rumex* преобладают именно гидролизуемые танины. Данная теория требует дополнительного исследования.

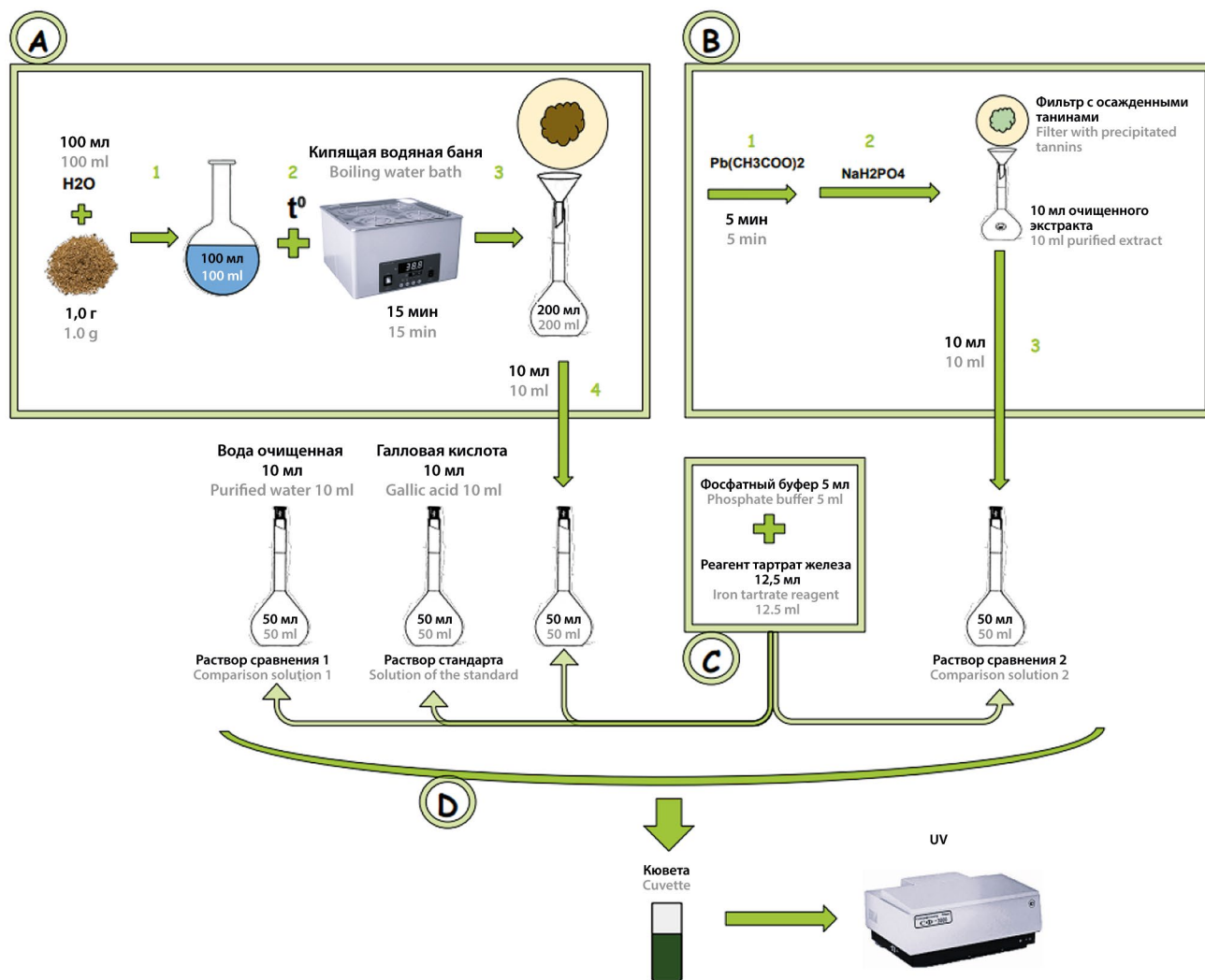


Рисунок 5. Схема пробоподготовки для спектрофотометрии с ЖТР.

А – получение извлечения:

1 – помещение в круглодонную колбу объемом 250 мл 1 г точной навески образца и 100 мл воды очищенной; 2 – нагрев на водяной бане в течение 15 минут; 3 – фильтрование извлечения в колбу объемом 200 мл и доведение до метки водой очищенной; 4 – отбор 10 мл извлечения для дальнейшей реакции с ЖТР.

В – получение очищенного от ДВ извлечения:

1 – добавление раствора ацетата свинца к 10 мл извлечения для осаждения ДВ; 2 – добавление дигидрофосфата натрия для освобождения раствора от солей свинца и отфильтровывание осадка; 3 – взятие 10 мл очищенного от ДВ извлечения для получения раствора сравнения № 2.

С – приготовление анализируемых растворов, стандартного образца галловой кислоты и двух растворов сравнения.

Д – спектрофотометрия полученных растворов

Figure 5. Sample preparation scheme for spectrophotometry with FTR

A – receiving extract:

1 – placing 1 g of an accurately weighed sample and 100 ml of purified water into a 250 ml round-bottom flask; 2 – heating in a water bath for 15 minutes; 3 – filtering the extract into a 200 ml flask and bringing it to the mark with purified water; 4 – selection of 10 ml of extract for further reaction with FTR.

B – obtaining extract purified from tannins:

1 – adding a solution of lead acetate to 10 ml of extract to precipitate the active substance; 2 – adding sodium dihydrogen phosphate to free the solution from lead salts and filtering out the precipitate; 3 – taking 10 ml of the extract purified from DV to obtain reference solution No. 2.

C – preparation of analyzed solutions, a standard sample of gallic acid and two reference solutions.

D – spectrophotometry of the resulting solutions

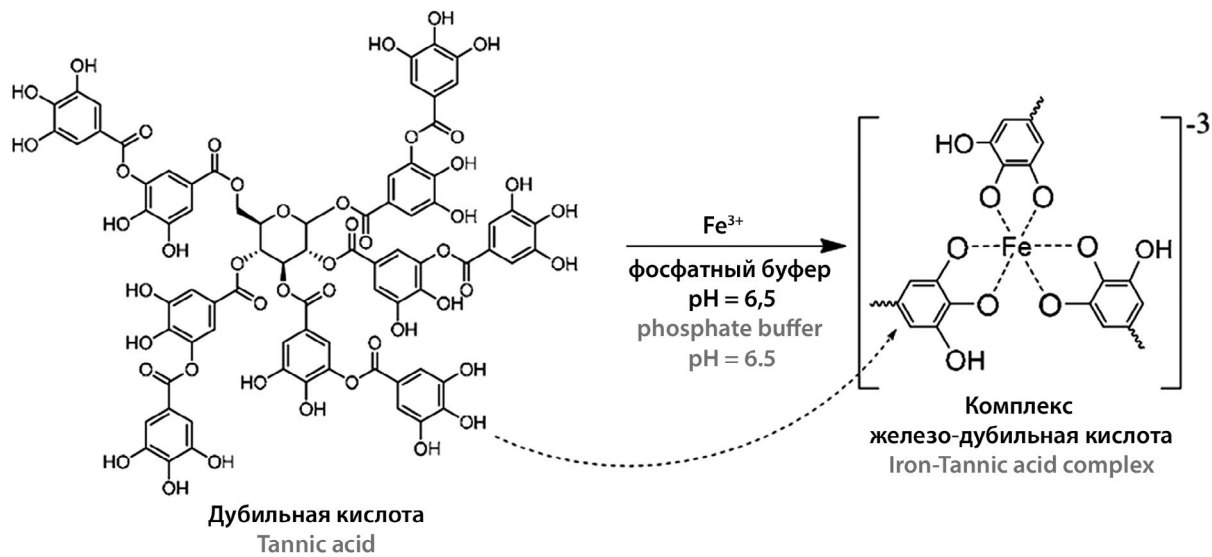


Рисунок 6. Реакция ЖТР с дубильными веществами
Figure 6. FTR reaction with tannins

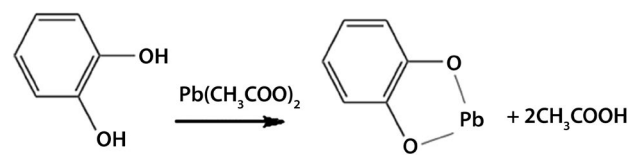


Рисунок 7. Схема реакции ДВ и раствора ацетата свинца
Figure 7. Tannins reaction with lead (II) acetate reagent

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках исследования щ. конского (*Rumex confertus* L.), щ. водного (*Rumex aquaticus* L.), щ. курчавого (*Rumex crispus* L.), щ. туполистного (*Rumex obtusifolius* L.) трех различных сроков вегетации были апробированы методики количественного определения ДВ. Определено количество и выявлены закономерности динамики накопления дубильных веществ в зависимости от фазы вегетации.

Таблица 4. Оценка содержания ДВ после реакции с ЖТР методом спектрофотометрии
Table 4. Content of tannins in the extracts after reaction with FTR, estimated using spectrophotometry

Вид щавеля <i>Rumex</i> sp. Фаза вегетации Vegetative phase <i>Rumex</i> sp.	Содержание дубильных веществ, % Content of tannins, %		
	Отрастание Regrowth	Цветение Flowering	Отмирание Senescence
Щ. конский <i>Rumex confertus</i> <i>Rumex confertus</i>	2,026 ± 0,012	4,321 ± 0,068	1,105 ± 0,005
Щ. курчавый <i>R. crispus</i> <i>R. crispus</i>	0,479 ± 0,004	1,171 ± 0,025	0,229 ± 0,001
Щ. туполистный <i>R. obtusifolius</i> <i>R. obtusifolius</i>	0	0,750 ± 0,003	0
Щ. водный <i>R. aquaticus</i> <i>R. obtusifolius</i>	1,588 ± 0,007	1,52 ± 0,015	0,290 ± 0,003

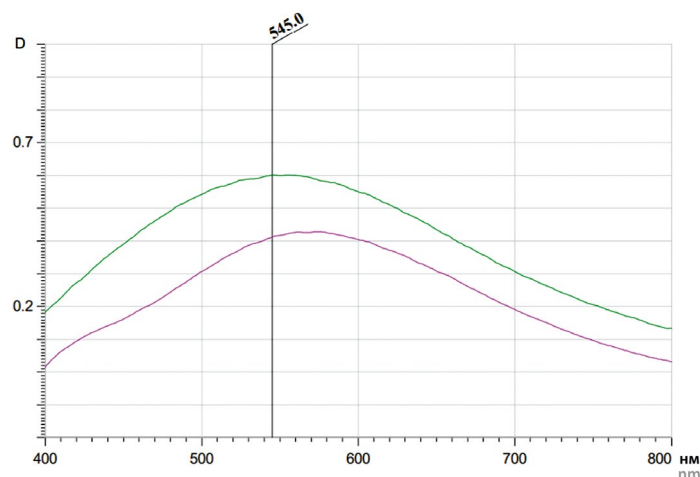


Рисунок 8. Спектры извлечений после реакции с ЖТР

Figure 8. Spectra of extracts after reaction with FTR

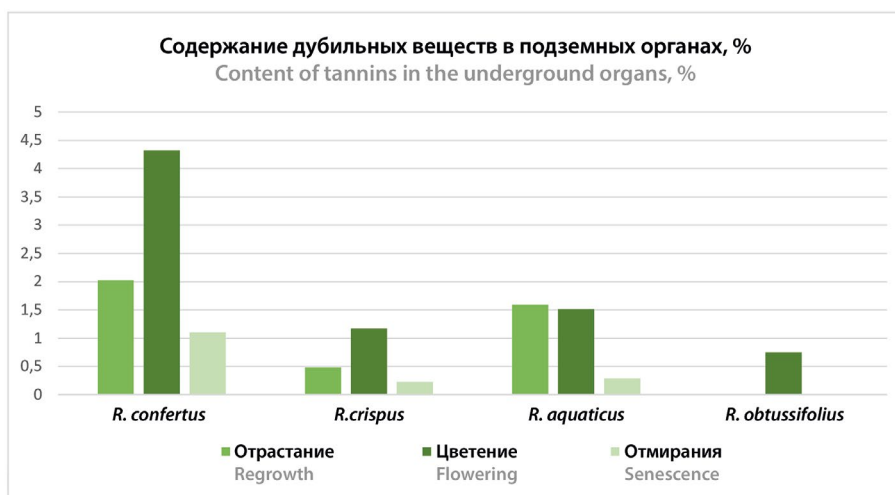


Рисунок 9. Накопление дубильных веществ в подземных органах в трех вегетативных фазах после реакции с ЖТР

Picture 9. Accumulation of tannins in the underground organs during three vegetative phases after reaction with FTR

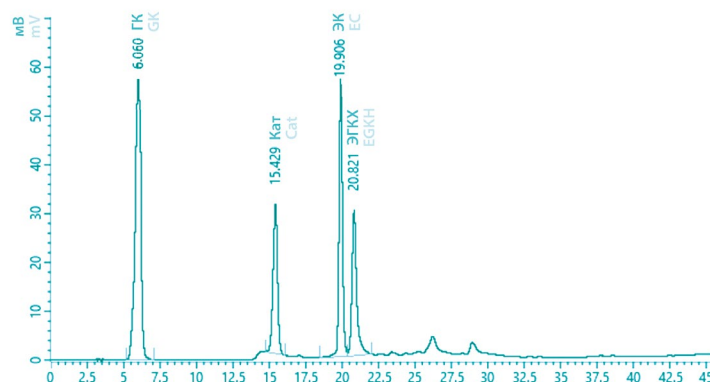


Рисунок 10. Хроматограмма смеси растворов стандартных образцов галловой кислоты, катехина, эпикатехина и эпигаллокатехин галлата

Figure 10. Chromatogram of a mixture of solutions of standard samples of gallic acid, catechin, epicatechin and epigallocatechin gallate

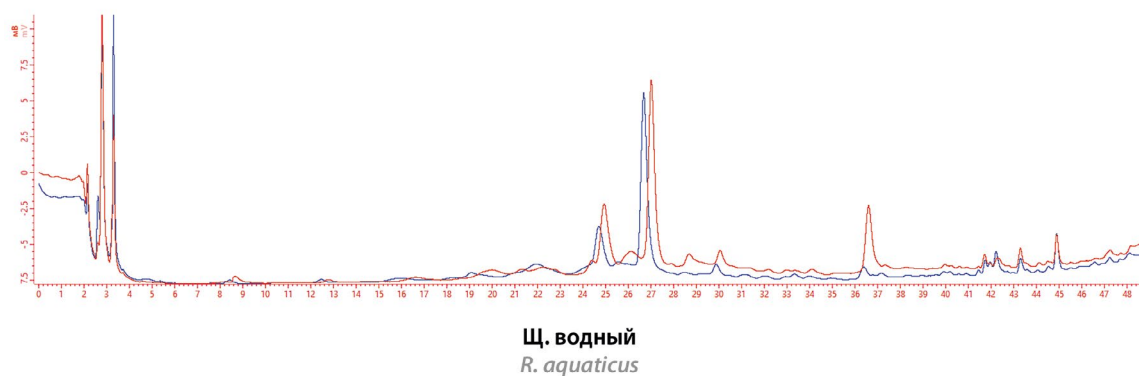
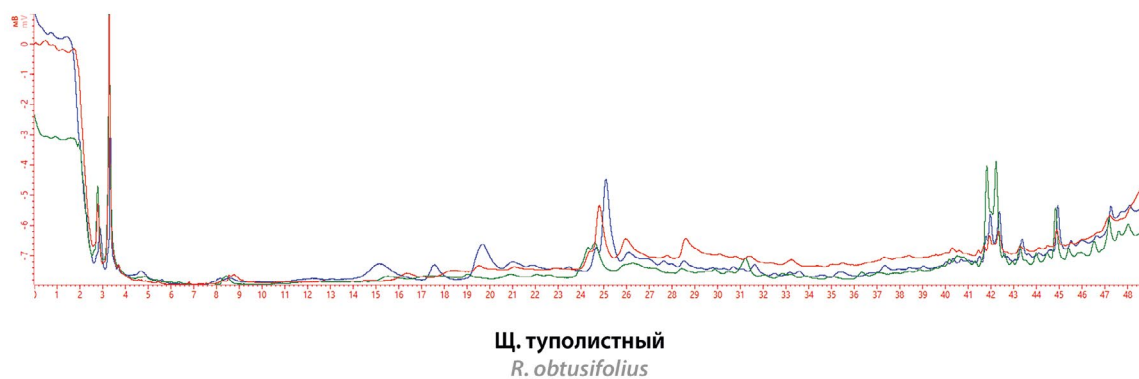
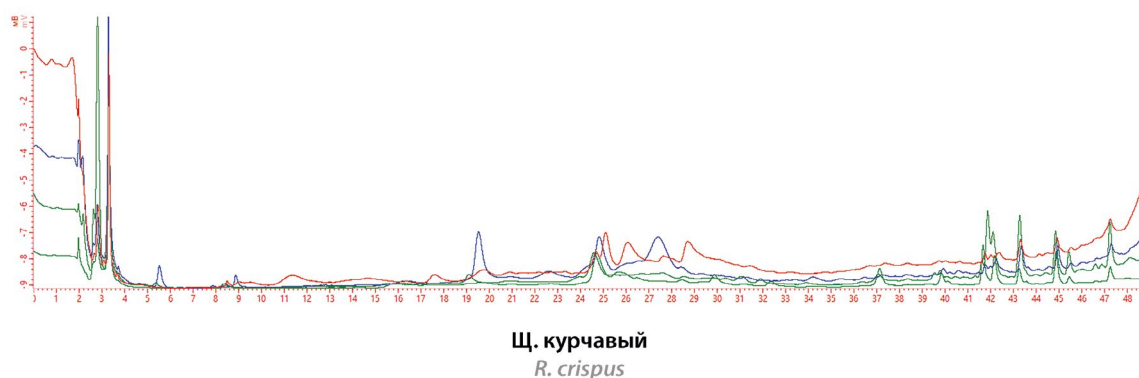
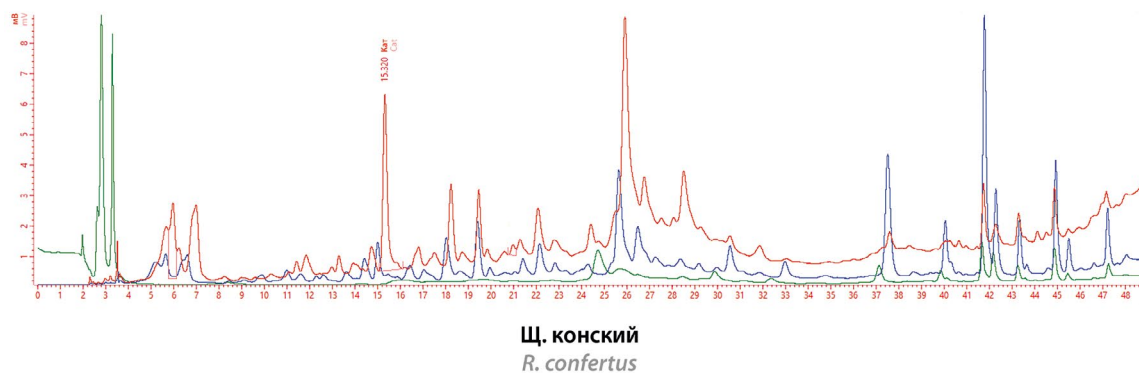


Рисунок 9. Хроматограммы экстрактов из подземных органов:

красная линия – фаза цветения; зеленая линия – конец вегетационного периода; синяя линия – фаза цветения. Начало вегетационного периода

Picture 9. Chromatograms of extracts from underground organs:

red line – flowering period; green line – withering period; blue line – regrowth period

ЛИТЕРАТУРА

- Li J.-J., Li Y.-X., Li N., Zhu H.-T., Wang D., Zhang Y.-J. The genus *Rumex* (Polygonaceae): an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Natural Products and Bioprospecting*. 2022;12:21. DOI: 10.1007/s13659-022-00346-z.
- Vasas A., Orbán-Gyapai O., Hohmann J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;175:198–228. DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.001.
- Aleixandre-Tudo J. L., Buica A., Nieuwoudt H., Aleixandre J. L., du Toit W. Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds in Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(20):4009–4026. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01724.
- Sharma K., Kumar V., Kaur J., Tanwar B., Goyal A., Sharma R., Gat Y., Kumar A. Health effects, sources, utilization and safety of tannins: a critical review. *Toxin Reviews*. 2019;40(4):432–444. DOI: 10.1080/15569543.2019.1662813.
- Prakash Mishra A., Sharifi-Rad M., Shariati M. A., Mabhkhot Y. N., Al-Showiman S. S., Rauf A., Salehi B., Župunski M., Sharifi-Rad M., Gusain P., Sharifi-Rad J., Suleria H. A. R., Iriti M. Bioactive compounds and health benefits of edible *Rumex* species-A review. *Cellular and Molecular Biology*. 2018;64(8):27–34. DOI: 10.14715/cmb/2018.64.8.5.
- Feduraev P., Skrypnik L., Nebreeva S., Dzhobadze G., Vatagina A., Kalinina E., Pungin A., Maslennikov P., Riabova A., Krol O., Chupakhina G. Variability of Phenolic Compound Accumulation and Antioxidant Activity in Wild Plants of Some *Rumex* Species (Polygonaceae). *Antioxidants*. 2022;11(2):311 DOI: 10.3390/antiox11020311.
- Емшанова С. В., Потанина О. Г., Буданова Е. В., Чистяков В. В., ред. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. Том 4. Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018. 7020 с.
- Wegiera M., Grabarczyk P., Baraniak B., Smolarz H. Antiradical Properties OF Extracts From Roots, Leaves and Fruits of Six *Rumex* L. Species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 2011;53. DOI: 10.2478/v10182-011-0018-z.
- Данилова Н. А., Попов Д. М. Количественная определение дубильных веществ в корнях щавеля конского методом спектрофотометрии в сравнении с методом перманганатометрии. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2004;2:179–182.
- Litvinenko Yu. A., Muzychkina R. A. Phytochemical Investigation of Biologically Active Substances in Certain Kazakhstan *Rumex* Species. 1. *Chemistry of Natural Compounds*. 2003;39(5):446–449. DOI: 10.1023/b:conc.0000011117.01356.4c.
- Feduraev P., Chupakhina G., Maslennikov P., Tascenko N., Skrypnik L. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at Different Growth Stages. *Antioxidants*. 2019;8(7):237. DOI: 10.3390/antiox8070237.
- Полуянов А. М., Соколова А. Ю., Малашенко Е. А., Сергунова Е. В., Бобкова Н. В. Выделение, идентификация и количественное определение антраценпроизводных методом ВЭЖХ-УФ в сырье некоторых представителей рода Щавель (*Rumex*) трех сроков вегетации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4):216–225. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-216-225.
- Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013;18(2):2328–2375. DOI: 10.3390/molecules18022328.
- Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Huđek A., Bačun-Družina V., Komes D. Overview of polyphenols and their properties. In: Galanakis C. M., editor. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Sawston: Woodhead Publishing; 2018. P. 3–44. DOI: 10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4.
- Gautam R., Srivastava A., Jachak S. M. Simultaneous determination of naphthalene and anthraquinone derivatives in *Rumex nepalensis* Spreng. Roots by HPLC: comparison of different extraction methods and validation. *Phytochemical Analysis*. 2011;22(2):153–157. DOI: 10.1002/pca.1261.
- Başkan S., Daut-Özdemir A., Günaydın K., Erim F. B. Analysis of anthraquinones in *Rumex crispus* by micellar electrokinetic chromatography. *Talanta*. 2007;71(2):747–750. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.05.018.
- Бузук Г. Н., Фомичева А. П., Корожан Н. В., Родионова Н. Н. О возможности применения казеина для количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье. *Вестник фармации*. 2011;4(54):12–17.
- Shermatova G. D., Eshbakova K. A. Determination of tannin content of *Rumex confertus* Willd and *Rumex pamicus* Rech. f. Plants by using standard method. *Austrian Journal of Technical and Natural Sciences*. 2022;5–6:66–67. DOI: 10.29013/AJT-22-5.6-66-67.
- Saoudi M. M., Bouajila J., Rahmani R., Alouani K. Phytochemical Composition, Antioxidant, Antiacetylcholinesterase, and Cytotoxic Activities of *Rumex crispus* L. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2021;2021:6675436. DOI: 10.1155/2021/6675436.
- Eom T., Kim E., Kim J.-S. In Vitro Antioxidant, Antiinflammation, and Anticancer Activities and Anthraquinone Content from *Rumex crispus* Root Extract and Fractions. *Antioxidants*. 2020;9(8):726. DOI: 10.3390/antiox9080726.
- Costan C.-A., Godsoe W., Bufford J. L., Hulme P. E. Comparing the Above and Below-Ground Chemical Defences of Three *Rumex* Species Between Their Native and Introduced Provenances. *Journal of Chemical Ecology*. 2023;49(5–6):276–286. DOI: 10.1007/s10886-023-01427-0.
- Тутельяна В. А., Эллера К. И., ред. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи. М.: Диалог; 2010. 180 с.

REFERENCES

- Li J.-J., Li Y.-X., Li N., Zhu H.-T., Wang D., Zhang Y.-J. The genus *Rumex* (Polygonaceae): an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Natural Products and Bioprospecting*. 2022;12:21. DOI: 10.1007/s13659-022-00346-z.
- Vasas A., Orbán-Gyapai O., Hohmann J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;175:198–228. DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.001.
- Aleixandre-Tudo J. L., Buica A., Nieuwoudt H., Aleixandre J. L., du Toit W. Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds in Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(20):4009–4026. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01724.

4. Sharma K., Kumar V., Kaur J., Tanwar B., Goyal A., Sharma R., Gat Y., Kumar A. Health effects, sources, utilization and safety of tannins: a critical review. *Toxin Reviews*. 2019;40(4):432–444. DOI: 10.1080/15569543.2019.1662813.
5. Prakash Mishra A., Sharifi-Rad M., Shariati M. A., Mabhkhot Y. N., Al-Showiman S. S., Rauf A., Salehi B., Župunski M., Sharifi-Rad M., Gusain P., Sharifi-Rad J., Suleria H. A. R., Iriti M. Bioactive compounds and health benefits of edible *Rumex* species-A review. *Cellular and Molecular Biology*. 2018;64(8):27–34. DOI: 10.14715/cmb/2018.64.8.5.
6. Feduraev P., Skrypnik L., Nebreeva S., Dzhobadze G., Vatagina A., Kalinina E., Pungin A., Maslennikov P., Riabova A., Krol O., Chupakhina G. Variability of Phenolic Compound Accumulation and Antioxidant Activity in Wild Plants of Some *Rumex* Species (Polygonaceae). *Antioxidants*. 2022;11(2):311 DOI: 10.3390/antiox11020311.
7. Emshanova S. V., Potanina O. G., Budanova E. V., Chistyakov V. V., editors. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 4. Moscow: Ministry of Health of Russian Federation; 2018. 7020 p. (In Russ.)
8. Wegiera M., Grabarczyk P., Baraniak B., Smolarz H. Antiradical Properties OF Extracts From Roots, Leaves and Fruits of Six *Rumex* L. Species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 2011;53. DOI: 10.2478/v10182-011-0018-z.
9. Danilova N. A., Popov D. M. The Quantitative evaluation of tannins in *Rumex confertus* using spectrophotometry in comparison with the permanganometry method. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2004;2:179–182. (In Russ.)
10. Litvinenko Yu. A., Muzychkina R. A. Phytochemical Investigation of Biologically Active Substances in Certain Kazakhstan *Rumex* Species. 1. *Chemistry of Natural Compounds*. 2003; 39(5):446–449. DOI: 10.1023/b:conc.0000011117.01356.4c.
11. Feduraev P., Chupakhina G., Maslennikov P., Tacenko N., Skrypnik L. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from *Rumex crispus* L. and *Rumex obtusifolius* L. at Different Growth Stages. *Antioxidants*. 2019;8(7):237. DOI: 10.3390/antiox8070237.
12. Poluyanov A. M., Sokolova A. Yu., Malashenko E. A., Sergunova E. V., Bobkova N. V. Isolation, Identification and Quantitative Determination of Anthracene Derivatives by HPLC-UV Method in the Raw Materials of Some Representatives of the Genus *Rumex* of Three Vegetation Times. *Drug development & registration*. 2022;11(4):216–225. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-4-216-225.
13. Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013;18(2):2328–2375. DOI: 10.3390/molecules18022328.
14. Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Huđek A., Bačun-Družina V., Komes D. Overview of polyphenols and their properties. In: Galanakis C. M., editor. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Sawston: Woodhead Publishing; 2018. P. 3–44. DOI: 10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4.
15. Gautam R., Srivastava A., Jachak S. M. Simultaneous determination of naphthalene and anthraquinone derivatives in *Rumex nepalensis* Spreng. Roots by HPLC: comparison of different extraction methods and validation. *Phytochemical Analysis*. 2011;22(2):153–157. DOI: 10.1002/pca.1261.
16. Başkan S., Daut-Özdemir A., Günaydin K., Erim F. B. Analysis of anthraquinones in *Rumex crispus* by micellar electrokinetic chromatography. *Talanta*. 2007;71(2):747–750. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.05.018.
17. Buzuk G. N., Fomicheva A. R., Korozhan N. V., Rodionova N. N. On the possibility of using casein for the quantitative determination of tannins in medicinal plant raw materials. *Bulletin of Pharmacy*. 2011;4(54):12–17. (In Russ.)
18. Shermatova G. D., Eshbakova K. A. Determination of tannin content of *Rumex confertus* Willd and *Rumex pamiricus* Rech. f. Plants by using standard method. *Austrian Journal of Technical and Natural Sciences*. 2022;5–6:66–67. DOI: 10.29013/AJT-22-5.6-66-67.
19. Saoudi M. M., Bouajila J., Rahmani R., Alouani K. Phytochemical Composition, Antioxidant, Antiacetylcholinesterase, and Cytotoxic Activities of *Rumex crispus* L. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2021;2021:6675436. DOI: 10.1155/2021/6675436.
20. Eom T., Kim E., Kim J.-S. In Vitro Antioxidant, Antiinflammation, and Anticancer Activities and Anthraquinone Content from *Rumex crispus* Root Extract and Fractions. *Antioxidants*. 2020;9(8):726. DOI: 10.3390/antiox9080726.
21. Costan C.-A., Godsoe W., Bufford J. L., Hulme P. E. Comparing the Above and Below-Ground Chemical Defences of Three *Rumex* Species Between Their Native and Introduced Provenances. *Journal of Chemical Ecology*. 2023;49(5–6):276–286. DOI: 10.1007/s10886-023-01427-0.
22. Tutelyan V. A., Ellera K. I., editors. *Methods for analyzing minor biologically active substances in food*. Moscow: Dynasty; 2010. 180 p. (In Russ.)



Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения

Р. Э. Ермаченков¹✉, А. Л. Марков¹, М. М. Агаев¹, Е. В. Бурцева², И. И. Тернинко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, литера А

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (КФУ им. В. И. Вернадского). 295007, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, просп. Академика Вернадского, д. 4

✉ Контактное лицо: Ермаченков Роман Энверович. E-mail: ermachenkov.roman@pharminnotech.com

ORCID: Р. Э. Ермаченков – <https://orcid.org/0009-0006-7785-7143>;

А. Л. Марков – <https://orcid.org/0009-0006-4995-8529>;

М. М. Агаев – <https://orcid.org/0009-0007-8026-2981>;

Е. В. Бурцева – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>;

И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 22.05.2024

Статья принята в печать: 13.11.2024

Статья опубликована: 15.11.2024

Резюме

Введение. Хроматографическое профилирование является наиболее эффективным способом установления подлинности эфирных масел, ключевым ограничением которого является число разработанных хроматографических профилей. Методология профилирования позволяет учесть географическую вариабельность эфирных масел путем дифференцирования профиля на зоны произрастания эфиромасличного сырья. Несмотря на наличие разработанных хроматографических профилей, на текущий момент отсутствуют сведения о возможной географической вариабельности востребованных эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного, полученных из отечественного эфиромасличного сырья.

Цель. Сравнительное исследование компонентного состава эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного, произведенных из сырья российского и зарубежного происхождения, для характеристики отечественных эфирных масел.

Материалы и методы. Анализ эфирных масел выполнен на программно-аппаратном комплексе газового хроматографа «Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектированием. Разделение проводилось на капиллярной колонке HP-5MS UI и на капиллярной колонке DB-WAX. Идентификация компонентов проводилась путем сравнения расчетных линейных индексов удерживания, полученных на двух колонках различной полярности, со справочными значениями.

Результаты и обсуждение. В ходе проведенного анализа эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного было идентифицировано 42 и 33 соединения, в среднем представляющих 93,7 и 96,2 % от всех компонентов пробы соответственно. Для образцов шалфея мускатного крымского происхождения отмечен ряд закономерностей, потенциально пригодных для обособления его компонентного состава от эфирных масел иного происхождения. На основании изучения компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения выдвинуто предположение о его отнесении к эфирному маслу розмарина испанского типа в соответствии с ISO и Ph. Eur.

Заключение. Результаты исследования позволили выдвинуть ряд предположений относительно возможности выделения специфического хроматографического профиля эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного крымского происхождения. Дальнейшая экспериментальная проверка выдвинутых предположений позволит определить возможность введения четких классификационных критериев для масел крымского происхождения.

Ключевые слова: *Salvia sclarea* L., шалфей мускатный, *Rosmarinus officinalis* L., розмарин лекарственный, эфирные масла, хроматографический профиль, газовая хроматография

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

Вклад авторов. Р. Э. Ермаченков отвечал за выполнение эксперимента, обработку, интерпретацию данных и формулирование выводов. А. Л. Марков и М. М. Агаев участвовали в выполнении эксперимента. Е. В. Бурцева предоставила часть исследуемых образцов эфирных масел. И. И. Тернинко принадлежит идея эксперимента, осуществление планирования эксперимента, редактирования рукописи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр» ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Для цитирования: Ермаченков Р. Э., Марков А. Л., Агаев М. М., Бурцева Е. В., Тернинко И. И. Изучение компонентных особенностей эфирных масел розмарина лекарственного и шалфея мускатного крымского происхождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):161–179. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1832>

Study of component features of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia sclarea* of Crimean origin

Roman E. Ermachenkov¹✉, Andrey L. Markov¹, Musafir M. Agaev¹,
Elena V. Burtseva², Inna I. Terninko¹

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² V. I. Vernadsky Crimean Federal University. 4, Prospekt Vernadskogo, Simferopol, Republic of Crimea, 295007, Russia

✉ **Corresponding author:** Roman E. Ermachenkov. **E-mail:** ermachenkov.roman@pharminnotech.com

ORCID: Roman E. Ermachenkov – <https://orcid.org/0009-0006-7785-7143>;

Andrey L. Markov – <https://orcid.org/0009-0006-4995-8529>;

Musafir M. Agaev – <https://orcid.org/0009-0007-8026-2981>;

Elena V. Burtseva – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>;

Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Received: 22.05.2024

Accepted: 13.11.2024

Published: 15.11.2024

Abstract

Introduction. Chromatographic profiling is the most efficient way to authenticate essential oils, the key limitation of which is the number of chromatographic profiles developed. The profiling methodology allows to take into account the geographical variability of essential oils by differentiating the profile into essential oilseed growing zones. Despite the presence of developed chromatographic profiles at the moment there is no information about the possible geographical variability of the demanded essential oils of clary sage and rosemary, obtained from local essential oilseed raw materials.

Aim. Comparative study of the component composition of essential oils of clary sage and rosemary produced from raw materials of Russian and foreign origin for the characterisation of domestic essential oils.

Materials and methods. The essential oils were analysed on the software and hardware complex of the gas chromatograph "Crystal 5000.2" with flame ionisation detection. Separation was carried out on a capillary column HP-5MS UI and on a capillary column DB-WAX. The components were identified by comparing the calculated linear retention indices obtained on two columns of different polarity with reference values.

Results and discussion. The analysis of the essential oils of clary sage and rosemary identified 42 and 33 compounds, on average representing 93.7 and 96.2 % of all sample components, respectively. For the samples of clary sage of Crimean origin, a number of patterns were noted, potentially suitable for separating its component composition from essential oils of other origin. Based on the study of the component composition of the essential oil of rosemary Crimean origin, it is suggested that it is attributed to the essential oil of rosemary Spanish type in accordance with ISO and Ph.Eur.

Conclusion. The results of the study allowed to put forward a number of assumptions regarding the possibility of isolation of a specific chromatographic profile of essential oils of clary sage and rosemary from Crimea. Further experimental verification of the put forward assumptions will allow to determine the possibility of introducing clear classification criteria for oils of Crimean origin.

Keywords: *Salvia sclarea* L., clary sage, *Rosmarinus officinalis* L., rosemary, essential oils, chromatographic profile, gas chromatography

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

Contribution of the authors. Roman E. Ermachenkov was responsible for the experiment, processing, interpretation of data, and formulation of conclusion. Andrey L. Markov and Musafir M. Agaev were involved in the experiment. Elena V. Burtseva provided some of the samples of essential oils under study. Inna I. Terninko was responsible for the idea and planning of the experiment, and editing of the manuscript.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center" of the Federal State. Budgetary Educational University of Higher Education SPCPU of the Ministry of Health of Russia.

For citation: Ermachenkov R. E., Markov A. L., Agaev M. M., Burtseva E. V., Terninko I. I. Study of component features of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia sclarea* of Crimean origin. *Drug development & registration*. 2024;13(4):161–179. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1832>

ВВЕДЕНИЕ

Эфирные масла нашли разнообразное применение в сферах промышленности и человеческой деятельности. Ключевыми потребителями эфирных масел являются предприятия пищевой, парфюмерной и химико-фармацевтической промышленности [1]. Существующий большой спрос на эфирные масла и их высокая потребительская стоимость являются главными и очевидными предпосылками для их фальсификации. Ранее на отечественном рынке уже были отмечены сообщения о наличии фальсифицированной эфиромасличной продукции [2, 3].

Современный подход к контролю качества эфирных масел основан на определении их компонентного состава хроматографическими методами. Ввиду сложности химического состава эфирных масел, его вариативности необходимо применение наиболее эффективных методологических подходов к анализу. Среди факторов, влияющих на накопление БАВ, одним из наиболее важных является регион произрастания, оказывающий влияние на общее содержание эфирного масла в растении и на его компонентный состав [4–6].

Контроль качества эфирных масел согласно ISO¹ и Ph. Eur 11² проводят с использованием хроматографических профилей – перечня репрезентативных и характерных компонентов с указанием пределов их концентраций. При составлении хроматографического профиля зачастую проводят его дифференциацию

в зависимости от региона происхождения эфирного масла, что, например, отражено в стандартах для масла герани³ и лаванды⁴.

Поскольку в основу хроматографического профиля положена необходимость учета естественных вариаций в химическом составе эфирного масла, обусловленная эколого-фитоценотическими условиями произрастания, то для его составления необходима значительная выборка – анализ большого числа проб различных регионов происхождения, различных сезонов и годов заготовки [6–8], что является трудоемким процессом.

Тем не менее хроматографическое профилирование остается наиболее эффективным методом контроля качества эфирных масел, несмотря на достаточно небольшое количество опубликованных стандартов, включающих регламентированный хроматографический профиль. Для адекватного контроля качества эфирных масел, произведенных из локально произрастающих эфиромасличных растений, при отсутствии утвержденных стандартов качества необходима разработка их хроматографического профиля. К наиболее востребованным растениям с точки зрения источников эфирного масла российского происхождения относятся шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.) и розмарин лекарственный (*Rosmarinus officinalis* L.), культивируемые на юге России (в т. ч. на территории Крыма).

В Российской Федерации эфирное масло розмарина лекарственного контролируется согласно требованиям ГОСТ ISO и/или монографии Европейской фармакопеи, в которых приведены специфические

¹ International Organization for Standardization. (1998). ISO 11024-2:1998 – Essential oils. General guidance on chromatographic profiles. Part 2: Utilization of chromatographic profiles of samples of essential oils. <https://www.iso.org/standard/19009.html>. Accessed: 22.05.2024.

² European Pharmacopoeia, 11th edition. European Department for the Quality and Medicines. Available at: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>. Accessed: 22.05.2024.

³ ГОСТ ISO 3515-2017. Масло эфирное лавандовое (*Lavandula angustifolia* Mill.). Технические условия. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200147039>. Ссылка активна на 22.05.2024.

⁴ ГОСТ ISO 4731-2014. Масло эфирное гераниевое (*Pelargonium x ssp.*). Технические условия (издание с поправкой). Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200113816>. Ссылка активна на 22.05.2024.

хроматографические профили для тунисского/марокканского и испанского типов масла¹, что не учитывает специфическую вариабельность состава для масел российского происхождения.

Требования к эфирному маслу шалфея мускатного представлены в соответствующей монографии Европейской фармакопеи, где выделен единый недифференцированный хроматографический профиль. На текущий момент стандарт ISO для эфирного масла шалфея отсутствует, но в разработке находится ISO/CD 24255, посвященный контролю качества эфирного масла шалфея мускатного французского типа, что подтверждает наличие географически обусловленной вариабельности компонентного состава эфирного масла и актуальность профилирования эфирных масел российского происхождения.

Цель – сравнительное исследование компонентного состава эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного, произведенных из сырья российского и зарубежного происхождения, для характеристики отечественных эфирных масел.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ проводился для коммерчески доступных эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного.

Газохроматографический анализ проводился на аппаратно-программном комплексе газового хроматографа «Кристалл 5000.2», оснащенного пламенно-ионизационным детектором (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия). Разделение проводилось на капиллярной колонке HP-5MS UI с неподвижной жидкой фазой (НЖФ) (5%-фенил)-метилполисилоксан (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) (Agilent Technologies, США) и на капиллярной колонке DB-WAX с НЖФ в виде полиэтиленгликоля. В качестве газа-носителя использовался гелий, скорость потока газа-носителя – 1 мл/мин в режиме постоянного потока. Эфирные масла вводились в чистом виде, объем вводимой пробы – 0,1 мкл, деление потока – 1:200. Температура узла ввода пробы – 250 °С, температура детектора – 300 °С. Температурная программа термостата колонок: изотерма при 75 °С в течение 1 мин, программируемый нагрев до 240 °С со скоростью 4 °С/мин и изотерма при 240 °С в течение 20 мин.

Идентификацию компонентов эфирных масел проводили с помощью сравнения линейных индексов удерживания (LRI) с индексами из базы Адамса [6] и NIST (National Institute of Standards and Technology, США), для расчета индексов удерживания использовался раствор *n*-алканов состава C7–C22 (гептан-докозан) с концентрацией 0,25 мг/мл в гексане. Коли-

чественную оценку содержания проводили с использованием метода внутренней нормализации без оценки коэффициента отклика детектора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перечень исследуемых эфирных масел, информация о регионе происхождения (по данным упаковки) и анализируемой серии представлена в таблице 1.

Репрезентативные хроматограммы эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного представлены на рисунках 1 и 2 соответственно.

В соответствии с последними требованиями [9] идентификация компонентов считалась достоверной, если разница между справочными индексами и расчетными для колонки с неполярной НЖФ составляет не больше 5 единиц, а для колонки с полярной НЖФ – не более 10.

Результаты идентификации и количественного определения компонентов эфирного масла шалфея мускатного и розмарина лекарственного представлены в таблицах 2 и 3 соответственно. Хроматографические профили исследуемых эфирных масел в соответствии с требованиями ISO и Ph. Eur 11 представлены в таблицах 4 и 5.

Различие между расчетными и справочными индексами удерживания для каждого из компонентов пробы не превышает 5 единиц для колонки с неполярной НЖФ и 10 единиц для колонки с полярной НЖФ, что свидетельствует о правильности проведенной идентификации. Суммарное количество идентифицированных компонентов для образцов эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного составляет 42 и 33 соединения, в среднем представляющих 93,7 и 96,2 % от всех компонентов пробы соответственно.

При рассмотрении компонентного состава каждого из анализируемых объектов в первую очередь следует удалить из полученных выборок образцы, которые содержат нетипичные для компонентов эфирных масел соединения. Так, в составе образцов №№ 6, 8 и 18 обнаружены соединения, используемые для разбавления эфирных масел [3, 10, 11]. В составе образцов №№ 6 и 18 обнаружен диэтилфталат (CAS № 84-66-2) в количестве 34,17 и 62,51 % от общей доли компонентов пробы. Обнаруженный в составе образца № 8 изопропилмиристан (CAS № 110-27-0) составляет 13,74 % от общей доли компонентов пробы. Наличие в составе исследуемых эфирных масел данных соединений не позволяет использовать результаты анализа этих масел в целях профилирования. В составе образца № 10 отмечено наличие лишь одного мажоритарного компонента – линалоола в количестве 89,47 %, что не характерно ни для эфирного масла шалфея, ни для эфирных масел в целом, поэтому логичным является удаление данного образца из общего числа анализируемых объектов.

¹ ГОСТ ISO 1342-2017. Масло эфирное розмариновое (*Rosmarinus officinalis* L.). Технические условия. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/557225894>. Ссылка активна на 22.05.2024.

Таблица 1. Перечень исследуемых эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного
Table 1. List of studied essential oils of clary sage and rosemary oil

№	Испытуемое эфирное масло (производитель) Tested essential oil (manufacturer)	Регион происхождения Region of origin	Серия Batch
Эфирное масло шалфея мускатного (<i>Salvia sclarea</i> L.) Essential oil of clary sage (<i>Salvia sclarea</i> L.)			
1	FirOil	Республика Крым, Россия Republic of Crimea, Russia	октябрь 2023 october 2023
2–3	Агрофирма «Тургеневская» Agrofirma "Turgenevskaya"	Республика Крым, Россия Republic of Crimea, Russia	P41 P51
4	АЭМСЗ AEMSZ	Республика Крым, Россия Republic of Crimea, Russia	14042023
5	«Аспера» Aspera	Австрия Austria	010123
6	«Ботавикос» Botavikos	Франция France	5461
7	«Лазурин» Lazurin	Республика Крым, Россия Republic of Crimea, Russia	п035
8	«Олеос» Oleos	н/пр n.s.	5501
9	«Сиберина» Siberina	Республика Крым, Россия Republic of Crimea, Russia	22618
10	«Эльфарма» Elfarma	Австрия Austria	30
Эфирное масло розмарина лекарственного (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) Essential oil of rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)			
11	FirOil	Марокко Morocco	октябрь 2023 october 2023
12	Gunna	Марокко Morocco	октябрь 2023 october 2023
13	АЭМСЗ AEMSZ	Республика Крым, Россия Republic of Crimea, Russia	18052023
14	«Аспера» Aspera	Индия India	030423
15	«Сиберина» Siberina	Тунис Tunisia	22738
16	«Ботавикос» Botavikos	Испания Spain	2664
17	«Лазурин» Lazurin	Испания Spain	п440
18	«Олеос» Oleos	н/пр n.s.	4401
19	«Спивакъ» Spivak	Испания Spain	29092023
20	«Эльфарма» Elfarma	Германия Germany	30

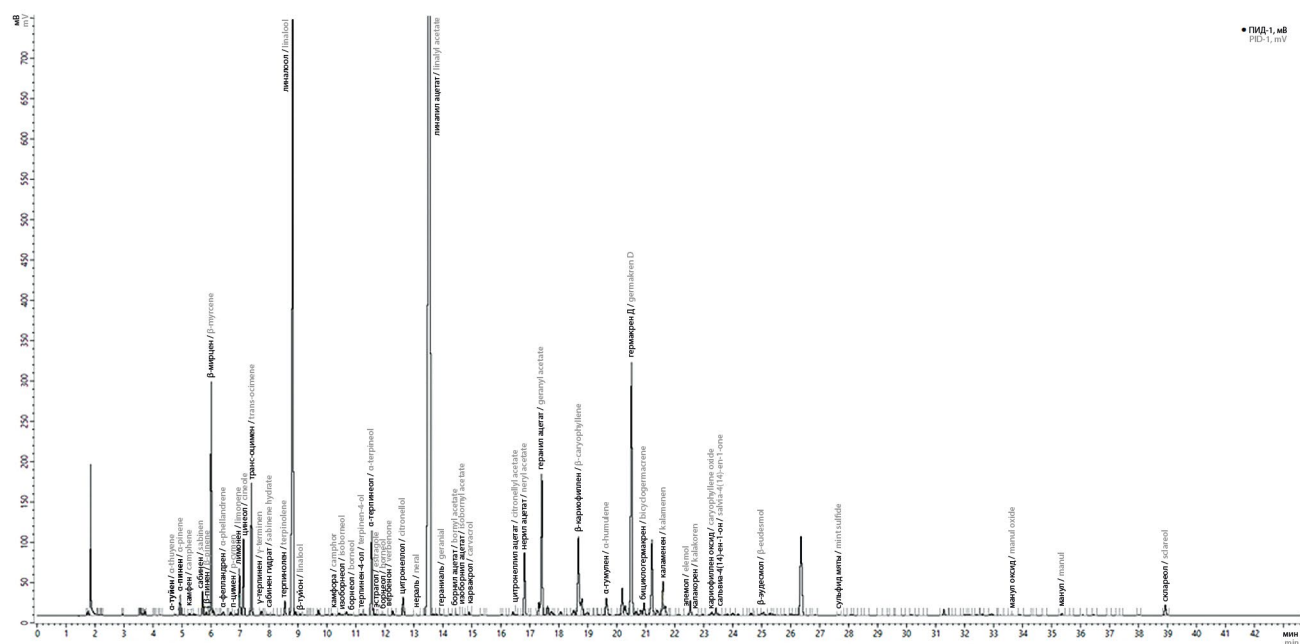


Рисунок 1. Репрезентативная хроматограмма эфирного масла шалфея мускатного. Произведено: Агрофирма «Тургеневская», с. Тургеневка, Крым. Сбор урожая: июль 2022 г.

Figure 1. Representative chromatogram of essential oil of clary sage. Produced by Agrofirma "Turgenevskaya", Turgenevka village, Crimea. Harvesting: July 2022

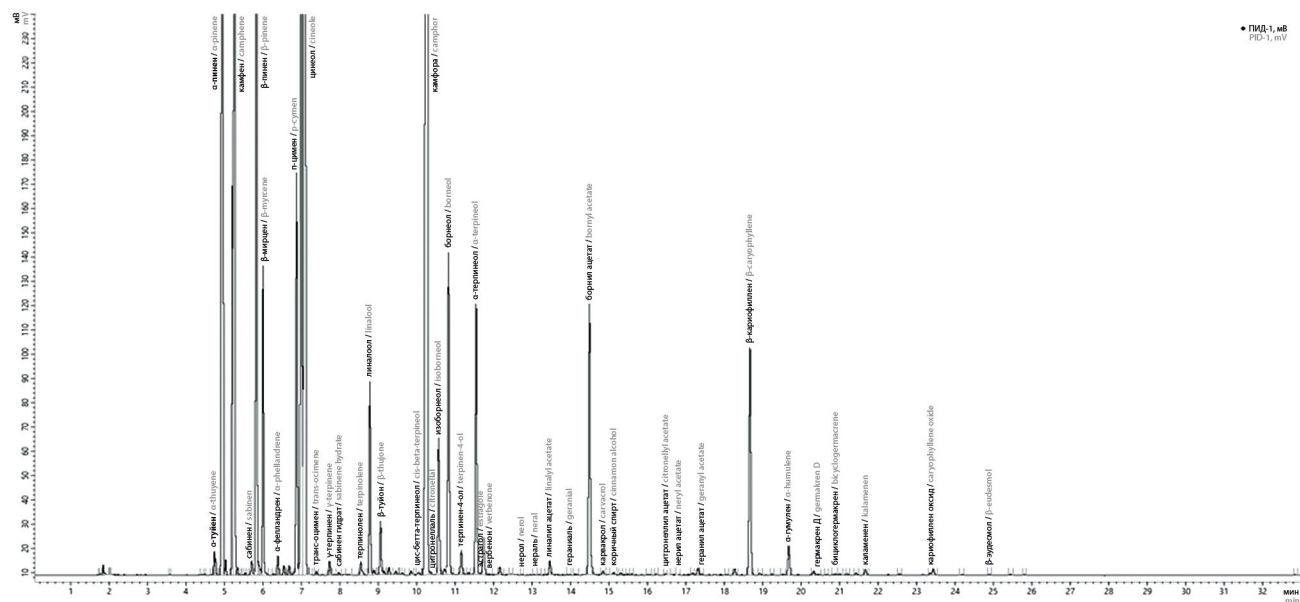


Рисунок 2. Репрезентативная хроматограмма эфирного масла розмарина лекарственного. Произведено: ПАО «АЭМСЗ», г. Алушта, Крым. Урожай 2023 г., собран в Ялтинском округе

Figure 2. Representative chromatogram of essential oil of rosemary. Produced by PJSC "AEMSZ", Alushta, Crimea. Harvest of 2023, collected in Yalta district

Таблица 2. Компонентный состав эфирных масел шалфея мускатного
Table 2. Component composition of clary sage essential oils

№	Компонент Component	CAS №	Линейные индексы удерживания (LRI) Linear retention indices (LRI)				Исследуемый образец эфирного масла Tested sample of essential oil									
			LRI ¹	LRI ²	LRI ³	LRI ⁴	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
			Содержание компонента, % Component content, %													
1	α-туйен α-thujene	2867-05-2	928	930 [12]	1030	1035 [13]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,10	сл. tr.	0,01	0,09	0,01	0,01
2	α-пинен α-pinene	80-56-8	936	939 [12]	1039	1029 [14]	0,50	0,10	0,31	0,02	7,53	0,01	0,08	6,89	0,01	0,19
3	камфен camphene	79-92-5	952	954 [12]	1090	1085 [16]	0,04	0,03	0,04	0,01	6,63	0,01	0,12	0,23	сл. tr.	0,02
4	сабинен sabinene	3387-41-5	975	975 [12]	1230	1231 [14]	0,12	0,10	0,40	0,05	0,92	0,02	0,07	1,39	0,03	0,03
5	β-пинен β-pinene	127-91-3	982	979 [12]	1130	1129 [14]	0,17	0,17	0,06	0,03	4,41	0,01	0,03	0,85	0,04	0,05
6	β-мирцен β-myrcene	123-35-3	992	990 [12]	1171	1170 [16]	3,91	4,79	3,85	5,45	2,01	3,11	7,20	5,52	7,56	0,74
7	α-фелландрен α-phellandrene	99-83-2	1007	1002 [12]	1184	1176 [17]	0,12	0,16	0,12	0,05	0,11	0,08	0,11	0,23	0,13	0,02
8	α-терпинен α-terpinene	99-86-5	1019	1017 [12]	1200	1196 [17]	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	2,35	0,08	0,25	0,24	0,15	0,02
9	п-цимол p-cymene	99-87-6	1026	1024 [12]	1291	1288 [16]	0,06	0,03	0,03	0,02	0,86	0,02	0,05	1,24	сл. tr.	0,24
10	лимонен limonene	138-86-3	1032	1029 [12]	1218	1213 [14]	1,25	1,13	0,93	1,10	5,06	0,81	1,91	4,52	1,59	0,48
11	1,8-цинеол 1,8-cineole	470-82-6	1036	1031 [12]	1234	1231 [13]	1,38	1,79	1,41	2,02	25,28	н.о. n.d.	н.о. n.d.	9,73	н.о. n.d.	н.о. n.d.
12	цис-β-оцимен (Z)-β-ocimene	3338-55-4	1037	1037 [12]	1243	1234 [24]	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,83	1,17	2,74	н.о. n.d.	2,89	0,32
13	транс-β-оцимен (E)-β-ocimene	3779-61-1	1053	1050 [12]	1244	1250 [24]	2,22	3,02	2,37	3,31	0,27	1,88	4,43	3,07	4,69	0,37
14	γ-терпинен γ-terpinene	99-85-4	1062	1059 [12]	1265	1262 [14]	0,06	0,08	0,09	0,08	0,24	0,06	0,14	0,44	0,12	0,02
15	цис-сабинена гидрат (E)-sabinene hydrate	17699-16-0	1069	1070 [12]	1483	1489 [14]	н.о. n.d.	0,01	0,01	н.о. n.d.	0,40	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.
16	терпинолен terpinolene	586-62-9	1091	1088 [12]	1304	1301 [14]	0,28	0,39	0,30	0,35	0,37	0,27	1,00	0,56	0,39	0,44
17	линалоол linalool	78-70-6	1100	1096 [12]	1557	1562 [14]	20,88	21,59	14,89	20,04	1,57	41,26	16,09	20,46	23,17	89,47

Продолжение таблицы 2

№	Компонент Component	CAS №	Линейные индексы удерживания (LRI) Linear retention indices (LRI)				Исследуемый образец эфирного масла Tested sample of essential oil									
			LRI ¹	LRI ²	LRI ³	LRI ⁴	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
			Содержание компонента, % Component content, %													
18	β-туйон β-thujone	471-15-8	1110	1114 [12]	1450	1449 [17]	0,05	0,01	0,02	сл. tr.	0,01	н.о. n.d.	0,02	0,09	н.о. n.d.	н.о. n.d.
19	цис-β-терпинеол (Z)-β-terpineol	7299-41-4	1144	1144 [12]	1650	1641 [21]	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,72	0,01	0,04	0,03	0,02	н.о. n.d.
20	камфора camphor	76-22-2	1150	1146 [12]	1552	1545 [14]	н.о. n.d.	0,01	сл. tr.	н.о. n.d.	23,66	0,01	н.о. n.d.	4,97	н.о. n.d.	0,11
21	цитронеллаль citronellal	106-23-0	1153	1153 [12]	1496	1486 [16]	0,07	0,01	н.о. n.d.	сл. tr.	0,79	н.о. n.d.	0,01	0,01	н.о. n.d.	н.о. n.d.
22	изоборнеол isoborneol	124-76-5	1161	1160 [12]	1692	1682 [20]	0,00	н.о. n.d.	0,01	н.о. n.d.	0,04	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,01	н.о. n.d.	н.о. n.d.
23	борнеол borneol	507-70-0	1169	1169 [12]	1723	1728 [14]	0,03	0,16	0,02	0,01	2,62	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05
24	ментол menthol	15356-60-2	1176	1171 [12]	1661	1652 [16]	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,37	н.о. n.d.	0,05	н.о. n.d.	0,01	сл. tr.
25	терпинен-4-ол terpinen-4-ol	562-74-3	1180	1177 [12]	1603	1613 [16]	0,04	0,04	0,04	0,02	0,44	0,03	0,02	0,04	0,04	н.о. n.d.
26	α-терпинеол α-terpineol	98-55-5	1193	1188 [12]	1719	1721 [14]	3,06	2,41	1,91	1,65	0,55	1,02	1,13	0,04	0,21	1,33
27	вербенон verbenone	80-57-9	1205	1205 [12]	1703	1701 [19]	сл. tr.	0,01	0,01	н.о. n.d.	0,01	0,02	0,01	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.
28	цитронеллол citronellol	106-22-9	1230	1225 [12]	1777	1772 [16]	0,58	0,46	0,42	0,33	н.о. n.d.	0,22	0,11	0,02	0,05	0,59
29	гераниол geraniol	106-24-1	1256	1252 [12]	1864	1859 [16]	0,58	0,46	0,42	0,33	н.о. n.d.	0,22	0,11	0,02	0,05	1,19
30	линалиацетат linalyl acetate	115-95-7	1257	1257 [12]	1570	1570 [16]	50,68	47,86	44,15	52,15	1,76	8,99	39,11	17,65	48,98	0,25
31	борниацетат bornyl acetate	76-49-3	1289	1285 [12]	1601	1592 [16]	0,03	0,08	0,03	сл. tr.	0,87	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,02	н.о. n.d.
32	карвакрол carvacrol	499-75-2	1304	1299 [12]	2249	2240 [15]	0,05	0,07	0,08	0,12	0,01	н.о. n.d.	0,02	0,02	0,01	н.о. n.d.
33	цитронеллилацетат citronellyl acetate	150-84-5	1352	1352 [12]	1671	1668 [16]	0,15	0,14	0,11	0,15	0,77	0,05	0,36	0,11	0,18	н.о. n.d.
34	нерилацетат neryl acetate	141-12-8	1365	1361 [12]	1738	1734 [16]	1,66	1,67	1,49	1,55	0,11	0,87	2,14	0,95	1,64	0,02
35	геранилацетат geranyl acetate	105-87-3	1385	1381 [12]	1772	1766 [16]	3,60	3,59	3,20	3,51	0,40	1,79	4,67	2,36	3,92	0,05

Окончание таблицы 2

№	Компонент Component	CAS №	Линейные индексы удерживания (LRI) Linear retention indices (LRI)				Исследуемый образец эфирного масла Tested sample of essential oil									
			LRI ¹	LRI ²	LRI ³	LRI ⁴	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
			Содержание компонента, % Component content, %													
36	β-кариофиллен β-caryophyllene	87-44-5	1422	1419 [12]	1626	1618 [14]	1,23	1,59	2,27	1,52	0,96	0,96	0,28	n.o. n.d.	0,10	0,03
37	гермакрен Д germacrene D	23986-74-5	1485	1481 [12]	1728	1726 [15]	0,83	2,44	6,77	1,84	0,06	0,10	0,04	n.o. n.d.	0,15	n.o. n.d.
38	γ-куркумен γ-curcumene	28976-68-3	1486	1482 [12]	1677	1685 [22]	0,20	0,12	0,58	0,09	0,32	0,14	0,09	n.o. n.d.	0,01	n.o. n.d.
39	бициклогермакрен bicyclogermacrene	24703-35-3	1502	1500 [12]	1745	1752 [18]	0,08	0,31	0,36	0,33	0,10	0,03	0,33	0,05	0,22	n.o. n.d.
40	каламенен calamenene	72937-55-4	1527	1529 [12]	1851	1851 [13]	0,08	0,13	0,28	0,09	0,11	0,09	0,03	n.o. n.d.	0,01	n.o. n.d.
41	кариофиллена оксид caryophyllene oxide	1139-30-6	1583	1583 [12]	2024	2023 [18]	0,17	0,07	0,12	0,09	0,11	0,00	0,26	n.o. n.d.	0,01	n.o. n.d.
42	склареол sclareol	515-03-7	2219	2223 [12]	2379	2387 [23]	0,26	0,31	0,31	0,26	n.o. n.d.	0,03	0,62	n.o. n.d.	0,03	n.o. n.d.
Монотерпены Monoterpenes							8,74	10,01	8,51	10,48	31,69	7,53	18,14	25,27	17,61	2,95
Монотерпеноиды Monoterpenoids							82,84	80,37	68,22	81,88	60,38	54,51	63,9	56,53	78,27	93,11
Сесквитерпены Sesquiterpenes							2,42	4,59	10,26	3,87	1,55	1,32	0,77	0,05	0,49	0,03
Сесквитерпеноиды Sesquiterpenoids							0,17	0,07	0,12	0,09	0,11	–	0,26	–	0,01	–
Дитерпены Diterpenes							0,26	0,31	0,31	0,26	–	0,03	0,62	–	0,03	–
Остальные Others							–	–	–	–	–	34,17	–	13,74	–	–
Сумма Sum							94,43	95,35	87,42	96,58	93,73	97,53	83,69	95,59	96,41	96,09

Примечания. Компоненты представлены в порядке элюирования на колонке HP-5MS UI. Содержание мажоритарных компонентов выделено полужирным шрифтом.
n.o. – не обнаружен; сл. – обнаружены следовые количества (не более 0,01 %); LRI¹ – линейные индексы удерживания, полученные на колонке с неполярной НЖФ; LRI² – справочные линейные индексы удерживания для колонки с неполярной НЖФ; LRI³ – линейные индексы удерживания, полученные на колонке с полярной НЖФ; LRI⁴ – справочные линейные индексы удерживания для колонки с полярной НЖФ.

Notes. The components are presented in the order of elution on the HP-5MS UI column. The content of major components is shown in bold.
n.b. – not detected; t.r. – trace amounts detected (not more than 0.01 %); LRI¹ – Linear retention indices obtained on a column with nonpolar SLP; LRI² – Reference linear retention indices for a column with nonpolar SLP; LRI³ – Linear retention indices obtained on a column with polar SLP; LRI⁴ – Reference linear retention indices for a column with polar SLP.

Таблица 3. Компонентный состав эфирных масел розмарина лекарственного
Table 3. Component composition of rosemary essential oils

№	Компонент Component	CAS №	Линейные индексы удерживания (LRI) Linear retention indices (LRI)				Исследуемый образец эфирного масла Tested sample of essential oil										
			LRI ¹	LRI ²	LRI ³	LRI ⁴	Содержание компонента, % Component content, %										
							11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	α-туиен α-thujene	2867-05-27	928	930 [12]	1030	1035 [13]	0,04	0,04	0,07	0,04	0,09	0,10	0,05	0,06	0,25	н.о. n.d.	
2	α-пинен α-pinene	80-56-8	936	939 [12]	1039	1029 [14]	11,29	11,41	21,64	23,88	26,35	44,77	20,04	19,62	3,67	4,66	
3	камфен camphene	79-92-5	952	954 [12]	1090	1085 [16]	4,2	4,15	8,91	4,44	1,89	0,82	8,45	0,71	2,1	3,63	
4	сабинен sabinene	3387-41-5	975	975 [12]	1230	1231 [14]	0,02	0,02	0,09	0,14	1,51	0,01	0,08	0,52	3,59	0,08	
5	β-пинен β-pinene	127-91-3	982	979 [12]	1130	1129 [14]	7,8	8,04	6,06	9,15	10,84	0,62	5,36	2,46	2,28	2,90	
6	β-мирцен β-myrcene	123-35-3	992	990 [12]	1171	1170 [16]	0,38	0,43	1,48	1,37	0,78	0,18	1,33	0,58	4,6	1,36	
7	α-фелландрен α-phellandrene	99-83-2	1007	1002 [12]	1184	1176 [17]	0,03	0,18	0,1	0,27	0,2	сл. tr.	0,07	0,04	1,79	0,12	
8	α-терпинен α-terpinene	99-86-5	1019	1017 [12]	1200	1196 [17]	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	1,19	0,58	н.о. n.d.	0,03	0,02	1,04	0,02	
9	п-цимол p-cymene	99-87-6	1026	1024 [12]	1291	1288 [14]	2,38	2,01	2,24	2,06	3,61	сл. tr.	2,2	0,52	4,2	1,17	
10	лимонен limonene	138-86-3	1032	1029 [12]	1218	1213 [14]	3,44	3,53	4,56	11,48	6,73	2,36	4,23	3,56	20,25	3,84	
11	1,8-цинеол 1,8-cineole	470-82-6	1036	1031 [12]	1234	1231 [14]	38,33	38,1	21,77	16,67	28,58	н.о. n.d.	22,35	2,54	20,64	16,49	
12	цис-β-оцимен (Z)-β-ocimene	3338-55-4	1037	1037 [12]	1243	1234 [24]	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,05	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	
13	транс-β-оцимен (E)-β-ocimene	3779-61-1	1053	1050 [12]	1244	1250 [24]	сл. tr.	сл. tr.	0,02	0,03	0,03	0,07	0,03	0,14	0,06	0,38	
14	γ-терпинен γ-terpinene	99-85-4	1062	1059 [12]	1265	1262 [14]	0,02	0,31	0,08	0,35	0,55	н.о. n.d.	0,05	0,02	0,33	0,11	
15	цис-сабинена гидрат (E)-sabinene hydrate	17699-16-0	1069	1070 [12]	1483	1489 [14]	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,02	0,52	н.о. n.d.	н.о. n.d.	сл. tr.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,01	

Продолжение таблицы 3

№	Компонент Component	CAS №	Линейные индексы удерживания (LRI) Linear retention indices (LRI)				Исследуемый образец эфирного масла Tested sample of essential oil									
			LRI ¹	LRI ²	LRI ³	LRI ⁴	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
			Содержание компонента, % Component content, %													
16	терпинолен terpinolene	586-62-9	1091	1088 [12]	1304	1301 [14]	0,03	0,03	0,1	0,16	0,12	0,01	0,09	0,07	0,20	0,15
17	линалоол linalool	78-70-6	1100	1096 [12]	1557	1562 [14]	1,41	1,46	1,11	0,44	0,27	9,22	1,12	0,7	1,28	24,72
18	β-туйон β-thujone	471-15-8	1110	1114 [12]	1450	1449 [17]	0,02	н.о. n.d.	0,33	0,3	0,06	0,48	0,23	0,04	0,25	4,19
19	цис-β-терпинеол (Z)-β-terpineol	7299-41-4	1144	1144 [12]	1650	1641 [21]	0,07	0,02	0,02	0,07	0,04	0,01	0,03	0,02	сл. tr.	0,04
20	камфора camphor	76-22-2	1150	1146 [12]	1552	1545 [14]	15,96	15,96	19,33	20,24	2,29	39,74	19,81	2,66	18,47	15,12
21	изоборнеол isoborneol	124-76-5	1161	1160 [12]	1692	1682 [20]	1,38	1,40	0,90	0,05	0,20	0,15	0,94	сл. tr.	1,58	3,52
22	борнеол borneol	507-70-0	1169	1169 [12]	1723	1728 [14]	2,77	2,82	2,14	1,08	0,38	0,26	2,25	0,02	2,73	7,28
23	терпинен-4-ол terpinen-4-ol	562-74-3	1180	1177 [12]	1603	1613 [16]	0,19	0,20	0,17	0,22	0,05	н.о. n.d.	0,17	0,02	0,13	0,34
24	α-терпинеол α-terpineol	98-55-5	1193	1188 [12]	1719	1721 [14]	1,45	1,53	1,65	0,34	8,05	0,03	1,56	0,05	2,74	1,18
25	вербенон verbenone	80-57-9	1205	1205 [12]	1703	1701 [19]	сл. tr.	сл. tr.	сл. tr.	0,02	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,01	н.о. n.d.	0,05	н.о. n.d.
26	цитронеллол citronellol	106-22-9	1230	1225 [12]	1777	1772 [16]	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	сл. tr.	сл. tr.	0,02	н.о. n.d.	н.о. n.d.	сл. tr.	0,02
27	герианиол geraniol	106-24-1	1256	1252 [12]	1864	1859 [16]	0,01	0,01	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,14	0,03	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,02	0,23
28	линалилacetат linalyl acetate	115-95-7	1257	1257 [12]	1570	1570 [16]	0,01	н.о. n.d.	0,09	0,05	0,02	н.о. n.d.	0,07	0,44	сл. tr.	1,60
29	борнилацетат bornyl acetate	76-49-3	1289	1285 [12]	1601	1597 [16]	0,03	0,03	1,94	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	2,12	н.о. n.d.	0,95	0,86
30	β-кариофиллен β-caryophyllene	87-44-5	1422	1419 [12]	1626	1618 [14]	5,07	6,4	1,68	0,58	0,33	сл. tr.	1,61	0,04	1,48	1,15

Окончание таблицы 3

№	Компонент Component	CAS №	Линейные индексы удерживания (LRI) Linear retention indices (LRI)				Исследуемый образец эфирного масла Tested sample of essential oil									
			LRI ¹	LRI ²	LRI ³	LRI ⁴	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
			Содержание компонента, % Component content, %													
31	γ-куркумен γ-curcumen	28976-68-3	1486	1482 [12]	1677	1685 [22]	0,08	0,1	0,21	0,17	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,18	0,01	0,02	0,88
32	каламенен calamenene	72937-55-4	1527	1529 [12]	1851	1851 [13]	сл. tr.	сл. tr.	0,05	0,03	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,04	н.о. n.d.	н.о. n.d.	0,01
33	кариофиллена оксид caryophyllene oxide	1139-30-6	1583	1583 [12]	2024	2023 [18]	0,2	0,06	0,02	н.о. n.d.	н.о. n.d.	н.о. n.d.	сл. tr.	н.о. n.d.	сл. tr.	0,03
Монотерпены Monoterpenes							29,64	30,16	45,35	54,56	53,28	49,01	42,01	28,32	44,36	18,42
Монотерпеноиды Monoterpenoids							61,63	61,53	49,47	39,99	40,09	49,94	50,66	6,5	48,82	75,6
Сесквитерпены Sesquiterpenes							5,16	6,51	1,94	0,78	0,33	0,01	1,83	0,05	1,5	2,04
Сесквитерпеноиды Sesquiterpenoids							0,21	0,07	0,03	0,02	–	–	0,02	–	0,06	0,03
Остальное Other							–	–	–	–	–	–	–	62,51	–	–
Сумма Sum							96,64	98,27	96,79	95,35	93,7	98,96	94,52	97,38	94,74	96,02

Примечания. Компоненты представлены в порядке элюирования на колонке HP-5MS UI. Содержание мажоритарных компонентов выделено полужирным шрифтом.
н.о. – не обнаружен; сл. – обнаружены следовые количества (не более 0,01 %); LRI¹ – линейные индексы удерживания, полученные на колонке с неполярной НЖФ; LRI² – справочные линейные индексы удерживания для колонки с неполярной НЖФ; LRI³ – линейные индексы удерживания, полученные на колонке с полярной НЖФ; LRI⁴ – справочные линейные индексы удерживания для колонки с полярной НЖФ.

Notes. The components are presented in the order of elution on the HP-5MS UI column. The content of major components is shown in bold.
n.d. – not detected; t.r. – trace amounts detected (not more than 0.01 %); LRI¹ – Linear retention indices obtained on a column with nonpolar SLP; LRI² – Reference linear retention indices for a column with nonpolar SLP; LRI³ – Linear retention indices obtained on a column with polar SLP; LRI⁴ – Reference linear retention indices for a column with polar SLP.

Таблица 4. Хроматографический профиль эфирного масла шалфея мускатного в соответствии с Ph. Eur 11
Table 4. Chromatographic profile of the essential oil of clary sage according to Ph. Eur 11

Компонент Component	Нормированное содержание в Ph. Eur 11 Normalised content in Ph. Eur 11	Исследуемый образец эфирного масла Tested sample of essential oil									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Содержание компонента, % Component content, %									
линалилацетат linalyl acetate	(56...78) %	66,89	64,14	64,87	68,67	44,59	17,48	68,60	46,15	67,52	1,29
линалоол linalool	(6,5...24) %	27,57	28,94	21,88	26,39	39,64	80,26	28,23	53,50	31,95	97,26
гермакрен Д germacrene D	(1,0...12) %	1,09	3,27	9,95	2,43	1,41	0,20	0,06	н.о. n.d.	0,20	н.о. n.d.
α-терпинеол α-terpineol	не более 5,0 % not more than 5,0 %	4,04	3,23	2,80	2,17	13,99	1,99	1,99	0,12	0,29	1,45
склареол sclareol	(0,4...2,6) %	0,34	0,42	0,46	0,35	н.о. n.d.	0,06	1,09	н.о. n.d.	0,04	н.о. n.d.
α- и β-туйон α- and β-thujone	не более 0,2 % not more than 0,2 %	0,07	0,01	0,04	сл. tr.	0,37	н.о. n.d.	0,04	0,24	н.о. n.d.	н.о. n.d.

Примечания. н.о. – не обнаружен; сл. – обнаружены следовые количества (не более 0,01 %).
Notes. n.d. – not detected; tr. – trace amounts detected (not more than 0.01 %).

Таблица 5. Хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного в соответствии с Ph. Eur 11 и ГОСТ ISO 1342-2017
Table 5. Chromatographic profile of essential oil of rosemary according to Ph. Eur 11 and GOST ISO 1342-2017

Нормированное содержание, % Normalised content, %			Исследуемый образец эфирного масла Tested sample of essential oil													
Компонент Component	Розмарин лекарственный (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Тунисский или марокканский вид Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Tunisian or Moroccan species		Розмарин лекарственный (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Испанский вид Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Spanish specie		Содержание компонента, % Component content, %											
	ГОСТ ISO 1342-2017 GOST ISO 1342-2017	Ph. Eur 11	ГОСТ ISO 1342-2017 GOST ISO 1342-2017	Ph. Eur 11	11	12	13	14	15	16	17	19	20			
α-пинен α-pinene	(9,0...14,0) %	(9,0...14,0) %	(18,0...26,0) %	(18,0...26,0) %	12,62	12,75	23,31	26,04	29,35	45,66	22,06	4,37	5,60			
1,8-цинеол 1,8-cineole	(38,0...55,0) %	(38,0...55,0) %	(16,0...23,0) %	(16,0...25,0) %	42,84	42,58	23,46	18,18	31,84	0,06	24,61	24,59	19,82			
камфора camphor	(5,0...15,0) %	(5,0...15,0) %	(12,5...22,0) %	(13,0...21,0) %	17,85	17,84	20,82	22,07	2,55	40,53	21,82	22,00	18,17			
линалоол linalool	(0,3...2,0) %	–	(0,5...2,5) %	–	1,58	1,64	1,19	0,48	0,30	9,40	1,23	1,52	29,70			
лимонен limonene	(1,5...4,0) %	(1,5...4,0) %	(2,5...5,5) %	(2,5...5,0) %	3,84	3,94	4,91	12,53	7,49	2,41	4,66	24,13	4,61			
β-пинен β-pinene	(4,0...9,0) %	(4,0...9,0) %	(2,0...5,0) %	(2,0...6,0) %	8,72	8,99	6,52	9,98	12,08	0,63	5,90	2,72	3,48			
камфен camphene	(2,5...6,0) %	(2,5...6,0) %	(7,0...13,0) %	(8,0...12,0) %	4,70	4,64	9,60	4,85	2,11	0,83	9,30	2,50	4,36			
п-цимол p-cymene	(0,5...2,5) %	(0,8...2,5) %	(1,0...2,0) %	(1,0...2,2) %	2,66	2,25	2,41	2,25	4,02	0,01	2,42	5,00	1,40			
борнеол borneol	(1,0...5,0) %	(1,5...5,0) %	(1,0...4,5) %	(2,0...4,5) %	3,10	3,15	2,31	1,18	0,42	0,27	2,48	3,25	8,75			
β-мирцен β-myrcene	(1,0...2,0) %	(1,0...2,0) %	(2,5...4,5) %	(1,5...5,0) %	0,43	0,48	1,59	1,50	0,87	0,18	1,47	5,48	1,64			
α-терпинеол α-terpineol	(1,0...2,5) %	(1,0...2,6) %	(1,0...4,0) %	(1,0...3,5) %	1,62	1,71	1,78	0,37	8,96	0,03	1,72	3,26	1,42			
борнилацетат bornyl acetate	(0,1...1,6) %	(0,1...1,5) %	(0,5...2,5) %	(0,5...2,5) %	0,04	0,04	2,09	0,54	н.о. n.d.	н.о. n.d.	2,33	1,13	1,04			
вербенон verbenone	не более 0,4 % not more than 0,4 %	не более 0,4 % not more than 0,4 %	(0,7...2,5) %	(0,7...2,5) %	0,01	0,01	сл. tr.	0,03	сл. tr.	н.о. n.d.	0,01	0,06	н.о. n.d.			

Примечания. н.о. – не обнаружен; сл. – обнаружены следовые количества (не более 0,01 %).

Notes. n.d. – not detected; t.r. – trace amounts detected (not more than 0.01 %).

На этапе рассмотрения химических составов исследуемых масел важно исключить эфирные масла, полученные из других растений (в т. ч. и близкородственных видов). Установленные профили для эфирных масел видов рода шалфей в большей степени позволяют отличать эфирные масла, полученные из близких ботанических видов, а непосредственно вариabельность, в первую очередь географическая, химического состава практически не учитывается. Среди представителей рода шалфей изучены фитохимические отличительные признаки эфирных масел шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.), лавандолистного/испанского¹ (*Salvia lavandulifolia* Vahl) и лекарственного/далматского² (*Salvia officinalis* L.), установлены их регламентируемые хроматографические профили (согласно ISO и Ph. Eur).

Поэтому высокое содержание 1,8-цинеола (25,28 %), камфоры (23,66 %), лимонена (5,06 %) и α -пинена при низком совокупном содержании линалоола (1,57 %) и линалилацетата (1,76 %) позволяет отнести образец № 5 к эфирному маслу шалфея испанского в соответствии с его регламентированным хроматографическим профилем.

Соотношение входящих в состав эфирного масла групп компонентов также является его специфической характеристикой, хотя и менее определяющей, чем его хроматографический профиль. Характеристика образцов эфирного масла шалфея мускатного и розмарина лекарственного в зависимости от доли содержащихся в составе групп соединений представлена на рисунке 3. Соединения сесквитерпенового и дитерпенового ряда содержатся в рассматриваемых маслах в относительно небольшом количестве, поэтому для сравнения была взята их сумма.

В составе исследуемых эфирных масел шалфея мускатного основная доля приходится на монотерпеноидные соединения (до 87,97 %), где в наибольшем количестве содержатся линалилацетат (до 50,68 %) и линалоол (до 23,17 %).

При рассмотрении эфирных масел шалфея мускатного крымского происхождения (образцы № 1–4, 7, 9) очевидны определенные закономерности. Для описанных эфирных масел отмечено достаточно низкое содержание склареола – не более 0,31 % (таблица 2). Содержание склареола находится на нижней границе регламентированного значения в соответст-

вии с хроматографическим профилем (таблица 4), установленным Ph. Eur 11. Вместе с тем содержание линалилацетата в испытуемых эфирных маслах находится в диапазоне от 47,86 до 52,15 %, что соответствует середине интервала допустимой границы для установленного фармакопеей хроматографического профиля. Отмечено высокое содержание линалоола (от 14,89 до 23,17 %). Так, в испытуемых образцах эфирного масла №№ 1, 2, 4, 7 и 9 его содержание превышает верхнюю допустимую границу в хроматографическом профиле. Примечательно, что соотношение содержания линалилацетата и линалоола находится в диапазоне от 2,11 до 2,96. Соотношение содержания линалилацетата и линалоола может быть включено в хроматографический профиль и использовано в качестве одного из отличительных признаков эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения.

При определении ряда закономерностей необходимо учитывать сезонную вариabельность сырья. Образцы эфирного масла № 2 и 3 были произведены из сырья урожая разных лет: образец № 2 произведен из сырья урожая 2021 года, образец № 3 – урожая 2022 года. При достаточно схожем содержании линалилацетата (47,86 и 44,15 %) содержание линалоола изменяется от 21,59 до 14,89 %. Тем не менее наиболее выраженная изменчивость характерна для гермакрена Д, его содержание изменяется от 2,44 до 6,77 %. Таким образом, очевидно, что для установления четких классификационных критериев для эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения необходимо дополнить уже имеющиеся результаты анализа образцов, полученных из сырья разных лет и сезонов заготовки.

Кроме веществ, включенных в нормативный хроматографический профиль, следует выделить изомерные линалилацетату геранилацетат и нерилацетат. Геранилацетат находящийся в крымских образцах в количествах от 3,20 до 4,67 %, нерилацетат – от 1,49 до 2,14 %. А соотношение их содержания остается практически постоянным: от 2,15 до 2,39.

У части исследуемых образцов эфирных масел розмарина лекарственного (№№ 13, 14, 15, 16, 17, 19) соединения монотерпеноидного и монотерпенового ряда представлены в почти равных количествах, тогда как у образцов №№ 11, 12 и 20 основная доля приходится на монотерпеноидные соединения (рисунок 3). Такая вариabельность состава является естественной, например, стандарт ISO и монография Европейской фармакопеи дифференцируют состав на тунисский/марокканский и испанский виды, что отражено в таблице 5.

Несмотря на очевидные несоответствия профилей эфирных масел №№ 15, 16, 19 и 20 существующим нормативным требованиям к хроматографическому

¹ International Organization for Standardisation. ISO 3526:2005 – Oil of sage, Spanish (*Salvia lavandulifolia* Vahl). Available at: <https://www.iso.org/ru/standard/37275.html>. Accessed: 22.05.2024.

² International Organization for Standardisation. ISO 9909:1997 – Oil of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.). Available at: <https://www.iso.org/standard/17791.html>. Accessed: 22.05.2024.

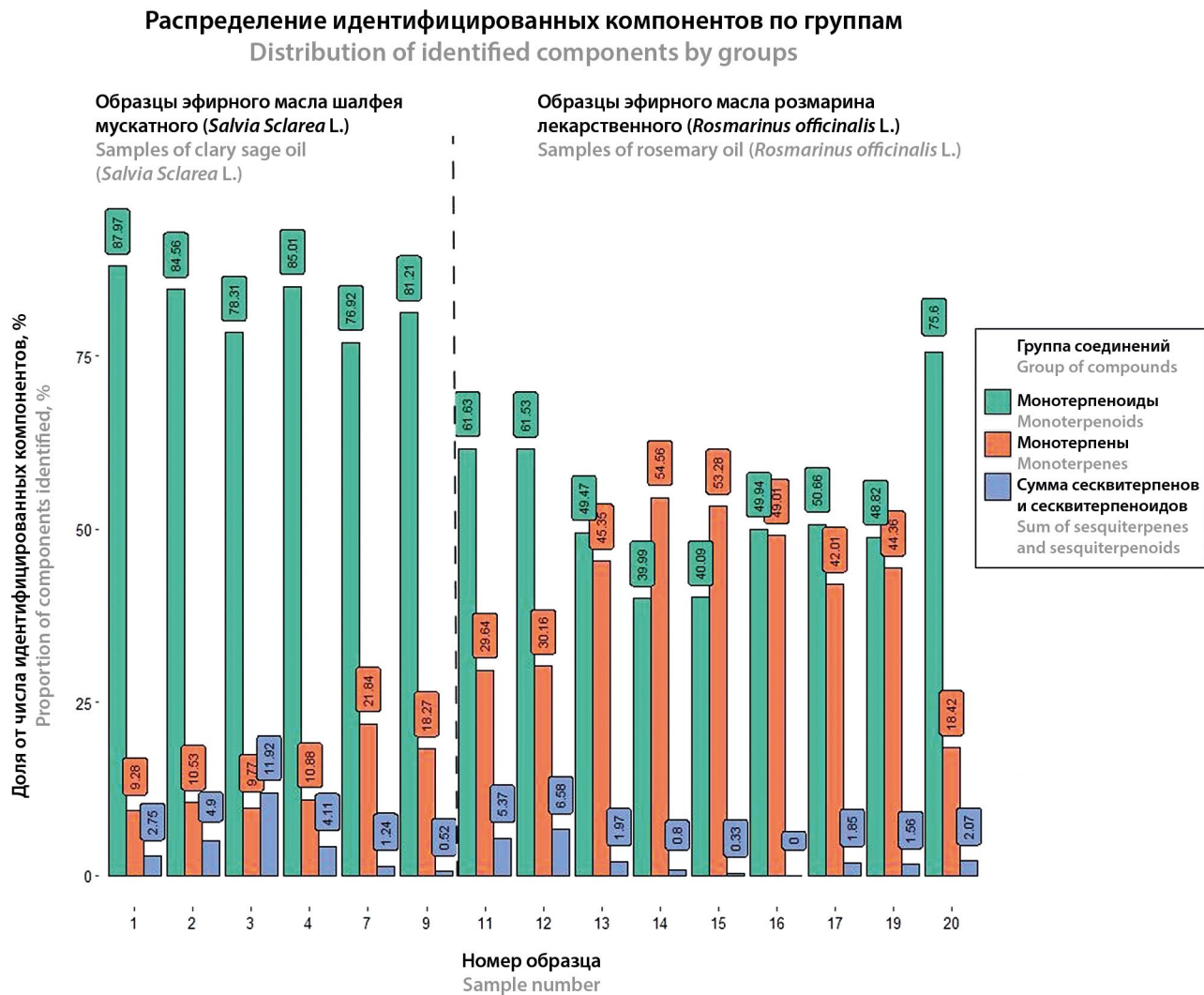


Рисунок 3. Распределение идентифицированных компонентов эфирного масла по группам
Figure 3. Distribution of identified essential oil components by groups

профилю эфирного масла розмарина лекарственного (таблица 5), они представляют непосредственный интерес для профилирования. При накоплении достаточного количества образцов со сходными химическими составами их отличительные особенности необходимо будет учесть при разработке хроматографического профиля.

С учетом естественной вариабельности компонентного состава эфирного масла розмарина лекарственного на данном этапе исследования основной упор был сделан на рассмотрение границ этой вариабельности – большинство образцов имеют профиль марокканского/туниССкого и испанского видов. В нормативный хроматографический профиль эфирного масла розмарина включено 13 и 12 компонентов в соответствии с ISO и Ph. Eur 11, поэтому для выявления закономерностей распределения

компонентного состава следует уделить им наибольшее внимание. Эфирное масло розмарина крымского происхождения (образец № 13) по своему хроматографическому профилю соответствует эфирному маслу розмарина лекарственного испанского вида (таблица 5). В его хроматографическом профиле отмечено незначительное превышение содержания β -пинена (6,52 %), *n*-цимола (2,41 %) и следовые количества вербенонa. Помимо компонентов хроматографического профиля, среди идентифицированных компонентов следует обратить внимание на β -кариофиллен и борнилацетат.

Содержание β -кариофиллена в образце эфирного масла крымского происхождения составляет 1,68 % (таблица 3), что соотноСится с его содержанием в образцах №№ 17 и 19 испанского происхождения (1,61 и 1,48 %), тогда как в образцах марокканского

происхождения его содержание составляет от 5,07 до 6,40 %. Содержание борнилацетата в образце крымского происхождения составляет 1,94 %, тогда как в образцах испанского происхождения – 2,12 и 0,95 %, в марокканских же образцах борнилацетат содержится в незначительном количестве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ эфирных масел шалфея мускатного и розмарина лекарственного различного происхождения. В составе исследуемых эфирных масел было идентифицировано 42 и 33 соединения, в среднем представляющих 93,7 и 96,2 % от всех компонентов пробы соответственно. На основании проведенных работ было составлено распределение компонентного состава исследуемых масел по группам соединений, входящих в их состав. Установлено, что вне зависимости от своего происхождения основу компонентного состава эфирного масла шалфея составляют монотерпеноидные соединения, тогда как для розмарина лекарственного может наблюдаться как преобладание монотерпеноидных соединений в случае тунисского/марокканского вида масла, так и примерно схожее количество монотерпеновых и монотерпеноидных соединений в случае масла испанского вида.

Для эфирного масла шалфея мускатного крымского происхождения выявлен ряд закономерностей, обособляющих его состав: повышенное содержание линалоола при отношении содержания линалилацетата и линалоола от 2,11 до 2,96, достаточно высокая вариабельность содержания гермакрена Д в зависимости от года заготовки урожая, нехарактерно высокое для масел другого происхождения содержание геранилацетата (до 4,67 %) и нерилацетата (до 2,14 %) и практически постоянное отношение их содержания.

Для эфирного масла розмарина лекарственного крымского происхождения сделано предположение о возможности отнесения данного масла к эфирному маслу розмарина испанского типа в соответствии с ISO и Ph. Eur. В данном случае не удалось выделить тот или иной признак, обособляющий хроматографический профиль эфирного масла розмарина лекарственного российского происхождения от регламентированного для масла испанского типа.

Таким образом, обнаруженные закономерности требуют дальнейшего изучения, экспериментальной проверки и расширения выборки в зависимости в первую очередь от различных регионов и сезонов заготовки для определения четких классификационных критериев, обособляющих эфирные масла шалфея мускатного и розмарина лекарственного российского происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bolouri P., Salami R., Kouhi S., Kordi M., Asgari Lajayer B., Hadian J., Astatkie T. Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules*. 2022;27(24):8999. DOI: 10.3390/molecules27248999.
2. Лапко И. В., Аксенова Ю. Б., Кузнецова О. В., Василевский С. В., Аксенов А. В., Таранченков В. Ф., Антохин А. М., Ихалайнен А. А. Эфирные масла: методы определения подлинности и выявления фальсификации. *Аналитика и контроль*. 2019;23(4):444–475. DOI: 10.15826/analitika.2019.23.4.010.
3. Атаева А. К., Атажанова Г. А., Бадеева К., Ивасенко С. А., Марченко А. Б., Лосева И. В. Оценка качества эфирных масел с помощью анализа ГХ-МС. *Медицина и экология*. 2020;1(94):64–76.
4. Дьякова Н. А., Коренская И. М., Сливкин А. И. Сравнительный анализ качественного состава эфирного масла травы полыни горькой синантропной флоры Воронежской области. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):104–112. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-104-112.
5. Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Коренская И. М. Особенности накопления эфирного масла в траве полыни горькой флоры Воронежской области. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(2):140–144. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-140-144.
6. Walia S., Mukhia S., Bhatt V., Kumar R., Kumar R. Variability in chemical composition and antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. essential oil collected from different locations of Himalaya. *Industrial Crops and Products*. 2020;150:112449. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112449.
7. Морозов С. В., Ткачева Н. И., Ткачев А. В. Проблемы комплексного химического профилирования лекарственных растений. *Химия растительного сырья*. 2018;4:5–28. DOI: 10.14258/jcprm.2018044003.
8. Chrysargyris A., Mikallou M., Petropoulos S., Tzortzakis N. Profiling of Essential Oils Components and Polyphenols for Their Antioxidant Activity of Medicinal and Aromatic Plants Grown in Different Environmental Conditions. *Agronomy*. 2020;10(5):727. DOI: 10.3390/agronomy10050727.
9. Bicchi C., Chaintreau A., Joulain D. Identification of flavour and fragrance constituents. *Flavour and Fragrance Journal*. 2018;33(3):201–202. DOI: 10.1002/ffj.3445.
10. Capetti F., Marengo A., Cagliero C., Liberto E., Bicchi C., Rubiolo P., Sgorbini B. Adulteration of Essential Oils: A Multitask Issue for Quality Control. Three Case Studies: *Lavandula angustifolia* Mill., *Citrus limon* (L.) Osbeck and *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel. *Molecules*. 2021;26(18):5610. DOI: 10.3390/molecules26185610.
11. Cebi N., Taylan O., Abusurrah M., Sagdic O. Detection of Orange Essential Oil, Isopropyl Myristate, and Benzyl Alcohol in Lemon Essential Oil by FTIR Spectroscopy Combined with Chemometrics. *Foods*. 2021;10(1):27. DOI: 10.3390/foods10010027.
12. Adams R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream: Alluredbooks; 2017.
13. Sagrero-Nieves L., Bartley J. P., Espinosa G. B., Dominguez X. A., Verde J. S. Essential oil composition of *Aristolochia brevipes* Benth. *Flavour and Fragrance Journal*. 1997;12(6):401–

403. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199711/12)12:6<401::AID-FFJ673>3.0.CO;2-D.
14. Qian M. C., Wang Y. Seasonal variation of volatile composition and odor activity value of 'Marion' (*Rubus* spp. hyb) and 'Thornless Evergreen' (*R. laciniatus* L.) blackberries. *Journal of Food Science*. 2005;70(1):13–20. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09013.x.
15. Başer K. H. C., Özek T., Demirci B., Kürkçüoğlu M., Aytaç Z., Duman H. Composition of the essential oils of *Zosima absinthifolia* (Vent.) Link and *Ferula elaeochytris* Korovin from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*. 2000;15(6): 371–372. DOI: 10.1002/1099-1026(200011/12)15:6<371::AID-FFJ919>3.0.CO;2-Z.
16. Choi H.-S., Sawamura M. Composition of the Essential Oil of *Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka (Hyuganatsu). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(10):4868–4873. DOI: 10.1021/jf000651e.
17. Gauvin A., Lecomte H., Smadja J. Comparative investigations of the essential oils of two scented geranium (*Pelargonium* spp.) cultivars grown on Reunion Island. *Flavour and Fragrance Journal*. 2004;19(5):455–460. DOI: 10.1002/FFJ.1354.
18. Chisholm M. G., Wilson M. A., Gaskey G. M. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour and Fragrance Journal*. 2003;18(2):106–115.
19. Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri, R. Casanova J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*. 2002;17:15–19. DOI: 10.1002/ffj.1022.
20. Tabanca N., Kırimer N., Demirci B., Demirci F., Başer K. H. C. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. phrygia and the enantiomeric distribution of borneol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(9):4300–4303.
21. Kivçak B., Akay S., Demirci B., Başer K. Chemical composition of essential oils from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* from Turkey. *Pharmaceutical Biology*. 2004;42(4–5):360–366. DOI: 10.1080/13880200490519677.
22. Cavalli J.-F., Ranarivelo L., Ratsimbason M., Bernardini A.-F., Casanova J. Constituents of the essential oil of six *Helichrysum* species from Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*. 2001;16(4):253–256. DOI: 10.1002/ffj.994.
23. Lattoo S. K., Dhar R. S., Dhar A. K., Sharma P. R., Agarwal S. G. Dynamics of essential oil biosynthesis in relation to inflorescence and glandular ontogeny in *Salvia sclarea*. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006;21(5):817–821. DOI: 10.1002/ffj.1733.
24. Lopes D., Strobl H., Kolodziejczyk P. 14-Methylpentadecano-15-lactone (Muscolide): A New Macrocyclic Lactone from the Oil of *Angelica archangelica* L. *Chemistry & Biodiversity*. 2005;1(12):1880–1887. DOI: 10.1002/cbdv.200490144.
2. Lapko I. V., Aksenova Yu. B., Kuznetsova O. V., Vasilevskij S. V., Aksenov A. V., Taranchenkov V. F., Antohin A. M., Ihalajnen A. A. Essential oils: the review of the methods for determining the authenticity and detecting adulteration. *Analytics and control*. 2019;23(4):444–475. (In Russ.) DOI: 10.15826/analitika.2019.23.4.010.
3. Ataeva A. K., Atazhanova G. A., Badekova K., Ivasenko S. A., Marchenko A. B., Loseva I. V. Quality assessment of essential oils by gas chromatography-mass spectrometry. *Medicine and ecology*. 2020;1(94):64–76. (In Russ.)
4. Dyakova N. A., Korenskaya I. M., Slivkin A. I. Comparative Analysis of Quality of Essential Oil of Wormwood Herb Synanthropic Flora of Voronezh Region. *Drug development & registration*. 2023;12(2):104–112. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-104-112.
5. Dyakova N. A., Slivkin A. I., Korenskaya I. M. Features of Accumulation of Essential Oil in Bitter Wormwood Herbs of Flora of Voronezh Region of Russia. *Drug development & registration*. 2022;11(2):140–144. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-2-140-144.
6. Walia S., Mukhia S., Bhatt V., Kumar R., Kumar R. Variability in chemical composition and antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. essential oil collected from different locations of Himalaya. *Industrial Crops and Products*. 2020;150:112449. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112449.
7. Morozov S. V., Tkacheva. N. I., Tkachev. A. V. Problems of comprehensive chemical profiling of medicinal plants. *Chemistry of plant raw material*. 2018;4:5–28. (In Russ.) DOI: 10.14258/jcpm.2018044003.
8. Chrysargyris A., Mikallou M., Petropoulos S., Tzortzakis N. Profiling of Essential Oils Components and Polyphenols for Their Antioxidant Activity of Medicinal and Aromatic Plants Grown in Different Environmental Conditions. *Agronomy*. 2020;10(5):727. DOI: 10.3390/agronomy10050727.
9. Bicchi C., Chaintreau A., Joulain D. Identification of flavour and fragrance constituents. *Flavour and Fragrance Journal*. 2018;33(3):201–202. DOI: 10.1002/ffj.3445.
10. Capetti F., Marengo A., Cagliero C., Liberto E., Bicchi C., Rubiolo P., Sgorbini B. Adulteration of Essential Oils: A Multitask Issue for Quality Control. Three Case Studies: *Lavandula angustifolia* Mill., *Citrus limon* (L.) Osbeck and *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel. *Molecules*. 2021;26(18):5610. DOI: 10.3390/molecules26185610.
11. Cebi N., Taylan O., Abusurrah M., Sagdic O. Detection of Orange Essential Oil, Isopropyl Myristate, and Benzyl Alcohol in Lemon Essential Oil by FTIR Spectroscopy Combined with Chemometrics. *Foods*. 2021;10(1):27. DOI: 10.3390/foods10010027.
12. Adams R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream: Alluredbooks; 2017.
13. Sagrero-Nieves L., Bartley J. P., Espinosa G. B., Dominguez X. A., Verde J. S. Essential oil composition of *Aristolochia brevipes* Benth. *Flavour and Fragrance Journal*. 1997;12(6):401–403. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1026(199711/12)12:6<401::AID-FFJ673>3.0.CO;2-D.
14. Qian M. C., Wang Y. Seasonal variation of volatile composition and odor activity value of 'Marion' (*Rubus* spp. hyb) and 'Thornless Evergreen' (*R. laciniatus* L.) blackberries. *Journal of Food Science*. 2005;70(1):13–20. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09013.x.

REFERENCES

1. Bolouri P., Salami R., Kouhi S., Kordi M., Asgari Lajayer B., Hadian J., Astatkie T. Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. *Molecules*. 2022;27(24):8999. DOI: 10.3390/molecules27248999.

15. Başer K. H. C., Özek T., Demirci B., Kürkçüoğlu M., Aytaç Z., Duman H. Composition of the essential oils of *Zosima absinthifolia* (Vent.) Link and *Ferula elaeochytris* Korovin from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*. 2000;15(6): 371–372. DOI: 10.1002/1099-1026(200011/12)15:6<371::AID-FFJ919>3.0.CO;2-Z.
16. Choi H.-S., Sawamura M. Composition of the Essential Oil of *Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka (Hyuganatsu). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(10):4868–4873. DOI: 10.1021/jf000651e.
17. Gauvin A., Lecomte H., Smadja J. Comparative investigations of the essential oils of two scented geranium (*Pelargonium* spp.) cultivars grown on Reunion Island. *Flavour and Fragrance Journal*. 2004;19(5):455–460. 10.1002/FFJ.1354.
18. Chisholm M. G., Wilson M. A., Gaskey G. M. Characterization of aroma volatiles in key lime essential oils (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Flavour and Fragrance Journal*. 2003;18(2):106–115.
19. Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri, R. Casanova J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*. 2002;17:15–19. DOI: 10.1002/ffj.1022.
20. Tabanca N., Kırimer N., Demirci B., Demirci F., Başer K. H. C. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. phrygia and the enantiomeric distribution of borneol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(9):4300–4303.
21. Kivçak B., Akay S., Demirci B., Başer K. Chemical composition of essential oils from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* from Turkey. *Pharmaceutical Biology*. 2004;42(4–5):360–366. DOI: 10.1080/13880200490519677.
22. Cavalli J.-F., Ranarivelo L., Ratsimbason M., Bernardini A.-F., Casanova J. Constituents of the essential oil of six *Helichrysum* species from Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*. 2001;16(4):253–256. DOI: 10.1002/ffj.994.
23. Lattoo S. K., Dhar R. S., Dhar A. K., Sharma P. R., Agarwal S. G. Dynamics of essential oil biosynthesis in relation to inflorescence and glandular ontogeny in *Salvia sclarea*. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006;21(5):817–821. DOI: 10.1002/ffj.1733.
24. Lopes D., Strobl H., Kolodziejczyk P. 14-Methylpentadecano-15-lactone (Muscolide): A New Macrocyclic Lactone from the Oil of *Angelica archangelica* L. *Chemistry & Biodiversity*. 2005;1(12):1880–1887. DOI: 10.1002/cbdv.200490144.



Оценка рисков воздействия тяжелых металлов и мышьяка, поступающих в организм человека с лекарственными растительными препаратами

М. С. Галенко^{1,2✉}, И. В. Гравель²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

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: Галенко Марта Сергеевна. E-mail: galenkoms@expmed.ru

ORCID: М. С. Галенко – <https://orcid.org/0000-0002-9050-5947>;

И. В. Гравель – <https://orcid.org/0000-0002-3735-2291>.

Статья поступила: 16.09.2024

Статья принята в печать: 21.11.2024

Статья опубликована: 22.11.2024

Резюме

Введение. Жидкие лекарственные формы на основе лекарственного растительного сырья удобны в применении и должны удовлетворять требованиям безопасности. В рамках гармонизации фармакопейных требований определения суммарного содержания тяжелых металлов в настойках недостаточно. Необходима оценка рисков для вычисления допустимых концентраций содержания тяжелых металлов в настойках.

Цель. Оценить безопасность использования настоек с точки зрения содержания тяжелых металлов и мышьяка в рамках риск-ориентированной стратегии.

Материалы и методы. Объектами исследования были 20 образцов настоек валерианы и пустырника промышленного производства разных предприятий. Количественное содержание 15 элементов (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Ti, V, Zn) определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Результаты и обсуждение. Концентрации элементов в настойках варьировали в диапазоне 0–1,84 мкг/г. В максимальных количествах найдены марганец и цинк, в минимальных – кадмий, молибден и ванадий. Ртуть не обнаружена во всех образцах. Содержание токсичных элементов в настойках не превышало уровней допустимых концентраций, регламентированных нормативной документацией Российской Федерации. Определены суммарные индексы опасности (HI), рассчитанные на уровнях медианы и 90-го перцентиля содержания элементных токсикантов. В настойках они составили соответственно: валерианы – $0,016 \cdot 10^{-5}$ и $0,027 \cdot 10^{-5}$, пустырника – $0,022 \cdot 10^{-5}$ и $0,028 \cdot 10^{-5}$. Полученные значения были значительно ниже 1,0. Расчет индивидуального канцерогенного риска (CR) элементных канцерогенов (Cd, As, Cr, Pb), поступающих в организм с настойками валерианы и пустырника, показал, что величины CR находились в диапазоне $4,9 \cdot 10^{-9}$ – $6,84 \cdot 10^{-7}$, что не превышало допустимого порогового значения ($1 \cdot 10^{-6}$).

Заключение. Фактическое содержание токсичных элементов (Pb, Cd, As, Hg) в настойках валерианы и пустырника (0–0,006 мкг/г) не превышало уровней допустимых концентраций. Расчеты неканцерогенных рисков при использовании настоек валерианы и пустырника показали, что суммарное воздействие 15 изученных элементов на здоровье человека при потреблении суточной дозы настоек характеризуется как допустимое, проводить периодический мониторинг содержания ненормируемых элементов в образцах лекарственных растительных препаратов не требуется. Установлено, что изученные настойки валерианы и пустырника не являются онкогенными факторами и не требуют мероприятий по снижению риска при их использовании.

Ключевые слова: тяжелые металлы, настойки, валериана, пустырник, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, нормативная документация, риск-ориентированная стратегия

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

Вклад авторов. М. С. Галенко – участие в разработке дизайна исследования, определение содержания элементов методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, интерпретация результатов исследования, сбор, анализ и систематизация данных научной литературы, написание и редактирование статьи, работа с табличными материалами, ответственность за все аспекты работы, связанные с достоверностью данных. И. В. Гравель – разработка дизайна исследования, решение вопросов, связанных с достоверностью данных и целостностью всех частей рукописи, ответственность за все аспекты работы, критический пересмотр содержания рукописи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Для цитирования: Галенко М. С., Гравель И. В. Оценка рисков воздействия тяжелых металлов и мышьяка, поступающих в организм человека с лекарственными растительными препаратами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):180–189. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1934>

Assessment of the risks of impacts of heavy metals and arsenic entering the human body with herbal medicines

Marta S. Galenko^{1,2}✉, Irina V. Gravel²

¹ Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSBI "SCEEMP"). 8/2, Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russia

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:** Marta S. Galenko. **E-mail:** galenkoms@expmed.ru

ORCID: Marta S. Galenko – <https://orcid.org/0000-0002-9050-5947>;
Irina V. Gravel – <https://orcid.org/0000-0002-3735-2291>.

Received: 16.09.2024

Accepted: 21.11.2024

Published: 22.11.2024

Abstract

Introduction. Liquid dosage forms based on medicinal plant raw materials are very convenient to use and must meet safety requirements. In the context of harmonization of pharmacopoeial requirements, determining the total content of heavy metals in tinctures is not enough. Risk assessment is necessary to calculate the permissible concentrations of heavy metals in tinctures.

Aim. To assess the safety of using tinctures in terms of the content of heavy metals and arsenic within the framework of a risk-oriented strategy.

Materials and methods. The objects of the study were 20 samples of valerian and motherwort tinctures manufactured by various enterprises. The quantitative content of 15 elements (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Tl, V, Zn) was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry.

Results and discussion. The concentrations of elements in tinctures varied in the range of 0–1.84 µg/g. Manganese and zinc were found in maximum quantities, while cadmium, molybdenum and vanadium were found in minimum quantities. Mercury was not detected in any of the samples. The content of toxic elements in the tinctures did not exceed the levels of permissible concentrations regulated by the normative documentation of the Russian Federation. Total hazard indices (HI) were calculated at the levels of the median and 90th percentile of the content of elemental toxicants. In the tinctures, they were, respectively: valerian – $0.016 \cdot 10^{-5}$ and $0.027 \cdot 10^{-5}$, motherwort – $0.022 \cdot 10^{-5}$ and $0.028 \cdot 10^{-5}$. The obtained values were significantly lower than 1.0. Calculation of individual carcinogenic risk (CR) of elemental carcinogens (Cd, As, Cr, Pb) entering the body with tinctures of valerian and motherwort showed that the CR values were in the range of $4.9 \cdot 10^{-9}$ – $6.84 \cdot 10^{-7}$, which did not exceed the permissible threshold value ($1 \cdot 10^{-6}$).

Conclusions. The actual content of toxic elements (Pb, Cd, As, Hg) in tinctures of valerian and motherwort was 0–0.006 µg/g, which did not exceed the levels of permissible concentrations. Calculations of non-carcinogenic risks when using tinctures of valerian and motherwort showed that the total impact of 15 studied elements on human health when consuming a daily dose of tinctures is characterized as permissible, periodic monitoring of the content of non-standardized elements in samples of herbal medicines is not required. It was established that the studied tinctures of valerian and motherwort are not oncogenic factors and do not require risk reduction measures.

Keywords: heavy metals, tinctures, valerian, motherwort, inductively coupled plasma mass spectrometry, regulatory documentation, risk-based approach

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

Contribution of the authors. Marta S. Galenko – participation in the development of study design, determination of the content of elements by inductively coupled plasma mass spectrometry, interpretation of study results, collection, analysis and systematization of scientific literature data, writing and editing an article, work with tabular materials, responsibility for all

aspects of work related to the reliability of data. Irina V. Gravel – development of research design, resolving issues related to the reliability of data and the integrity of all parts of the article, responsibility for all aspects of the work, writing the text of the article, critical revision of the content of the article, approval of the final version of the article for publication.

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-01 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 124022300127-0).

For citation: Galenko M. S., Gravel I. V. Assessment of the risks of impacts of heavy metals and arsenic entering the human body with herbal medicines. *Drug development & registration*. 2024;13(4):180–189. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1934>

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные растительные препараты (ЛРП) активно применяются в медицинской практике за счет мягкого физиологического действия с минимальным количеством побочных явлений, широкого ассортимента и доступности для пациентов. Одной из традиционных лекарственных форм для профилактики и лечения заболеваний являются настойки [1–3].

ЛРП для медицинского применения должны соответствовать всем требованиям нормативной документации. Одним из важнейших показателей безопасности является содержание тяжелых металлов (ТМ) и мышьяка. Они обладают токсическими свойствами и при поступлении в организм человека могут вызывать негативные реакции [4].

В настоящее время в настойках нормируется суммарное содержание ТМ и мышьяка полуколичественным методом, который не позволяет оценить содержание отдельных элементов, в том числе токсичных (Pb, Cd, As, Hg), и степень их воздействия на организм человека. В этой связи актуальна разработка методики селективного определения элементов, а также научно обоснованных норм содержания отдельных токсичных элементов [4].

В условиях гармонизации фармакопейных требований разных стран к оценке безопасности лекарственных средств наблюдается тенденция перехода от принципа безвредности к принципу допустимости пренебрежимо малой вероятности возникновения негативных эффектов от действия токсикантов в лекарственных препаратах, включая ЛРП^{1,2}. Этот подход реализован в рамках риск-ориентиро-

ванной стратегии контроля содержания элементных токсикантов в лекарственных средствах (в том числе и ЛРП). В этом случае фактическая концентрация элементной примеси оценивается относительно ее предельно допустимой дозы, поступающей в организм человека в составе лекарственного препарата в течение суток.

В настоящее время разделяют неканцерогенный и канцерогенный риски воздействия токсических веществ. При оценке неканцерогенных эффектов исходят из предположения о наличии порога вредного действия, ниже которого вредные эффекты не развиваются. За референтные (безопасные) дозы (RfD) воздействия принимают такие количества химических веществ, воздействие которых не вызывает каких-либо нежелательных реакций. Неканцерогенный риск оценивают путем расчета коэффициента опасности (HQ), который представляет собой отношение воздействующей дозы химического вещества к его безопасному (референтному) уровню воздействия [5].

Канцерогенный риск определяет вероятность развития новообразований на протяжении всей жизни человека под воздействием потенциального канцерогена [6]. Оценка риска онкогенных эффектов, связанных с химическим загрязнением, проводится как на индивидуальном, так и на популяционном уровнях [7]. Токсиканты определяют как канцерогенные факторы на основании данных Международного агентства по изучению рака (IARC)³ и отечественных нормативных документов [6, 8]. Основным параметром для оценки канцерогенного риска является фактор канцерогенного потенциала (SF), характеризующий степень нарастания канцерогенного риска с увеличением воздействующей дозы на одну единицу. Значения SF установлены отдельно для ингаляционного (SF_i) и перорального (SF_o) поступления хими-

¹ Q3D(R2) Guideline for Elemental Impurities: International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. 2020. Available at: <https://www.federalregister.gov/documents/2022/09/15/2022-19997/q3dr2-guideline-for-elemental-impurities-international-council-for-harmonisation-guidance-for>. Accessed: 21.06.2024.

² WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneva: World Health Organization. 2007. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43510>. Accessed: 21.06.2024.

³ Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans / International agency for research on cancer (IARC). Available at: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans>. Accessed: 21.06.2024.

ческих канцерогенов и приведены в отечественной [6] и зарубежной¹ нормативной документации.

Кроме того, для оценки канцерогенного риска определяют единичный риск (UR), отражающий значение риска для одной единицы концентрации вещества в анализируемом объекте. На основе единичного канцерогенного риска рассчитывают индивидуальный канцерогенный риск (CR), который представляет собой оценку вероятности развития рака при воздействии потенциального канцерогена в течение всей жизни (средняя продолжительность жизни принимается равной 70 годам).

В отечественной нормативной документации приняты следующие градации уровней канцерогенного риска:

- 1) риск допустимый; не вызывающий беспокойства ($CR \leq 1 \cdot 10^{-6}$);
- 2) предельно допустимый риск ($1 \cdot 10^{-6} < CR < 1 \cdot 10^{-4}$);
- 3) опасный риск ($1 \cdot 10^{-4} < CR < 1 \cdot 10^{-3}$);
- 4) чрезвычайно опасный, недопустимый риск ($CR \geq 1 \cdot 10^{-3}$) [5, 6].

В настоящее время проводятся исследования по оценке рисков воздействия элементных токсикантов, которые содержатся в лекарственном растительном сырье [5, 9], однако для ЛРП систематические исследования подобного рода отсутствуют.

Цель работы – оценить безопасность использования настоек с точки зрения содержания тяжелых металлов и мышьяка в рамках риск-ориентированной стратегии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были 20 образцов настоек валерианы и пустырника, приобретенных в аптечной сети (таблица 1).

Пробоподготовку настоек для определения элементного состава проводили по ранее разработанной авторами методике [10].

Количественное содержание 15 элементов определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на приборе Agilent 7900 (Agilent Technologies, Inc., США). Интенсивности сигналов фиксировали по атомным единицам массы (а.е.м.): Ti – 47, V – 51, Cr – 52, Mn – 55, Fe – 56, Co – 59, Ni – 60, Cu – 63, Zn – 66, As – 75, Sr – 88, Cd – 111, Sb – 121, Hg – 202, Pb – 208. Условия анализа приведены в таблице 2 [11].

Измерения проводили для трех параллельных проб каждого образца, показания прибора регистрировали в пяти повторностях. Для расчета концентраций элементов применяли метод калибровочной кривой. Обработку и анализ результатов,

расчет неканцерогенных и канцерогенных рисков осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel 2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настойках валерианы и пустырника, произведенных в условиях фармацевтических производств и реализуемых через аптечную сеть, было определено содержание 15 элементов (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Mo, Cd, Tl, Hg, Pb). Анализ показал, что из них были обнаружены 14 и общее содержание большинства из них в настойке валерианы выше, чем в настойке пустырника (таблицы 3, 4).

Количество элементов в настойках валерианы варьировало в диапазоне 0,0001–1,84 мкг/г. В максимальных количествах обнаруживались марганец и цинк, в минимальных – кадмий, молибден и ванадий. Ртуть не была обнаружена во всех образцах. Содержание токсичных элементов (Pb, Cd, As) находилось в диапазоне 0–0,01 мкг/г, в максимальных количествах обнаруживался мышьяк.

В настойках пустырника концентрации найденных элементов составили 0–0,75 мкг/г. В максимальных количествах содержались цинк и медь, в минимальных – таллий и кадмий. Ртуть во всех образцах не обнаружена. Содержание токсичных элементов (Pb, Cd, As) не превышало 0,006 мкг/г, и лишь в 10 % образцов не найден кадмий, в максимальных количествах обнаружен мышьяк. Содержание токсичных элементов в настойках не превышало уровней допустимых концентраций, регламентированных нормативной документацией [4]. Полученные результаты согласуются с ранее проведенными собственными исследованиями [10, 12] и литературными данными [13–15]. Элементы, найденные в максимальных количествах в настойках, в преобладающих количествах содержатся и в исходном лекарственном растительном сырье [16, 17].

На следующем этапе оценивали неканцерогенный риск путем расчета коэффициента HQ по формуле [6, 7]:

$$HQ = ADD \cdot RfD,$$

используя для расчета параметра ADD адаптированную формулу [7]:

$$ADD = (C \cdot TD) / BW,$$

где ADD – потенциальная усредненная суточная доза потребления элементной примеси, мкг/(г · сут); RfD – референтные (безопасные) дозы элементных токсикантов, мкг/(г · сут); C – концентрация исследуемой элементной примеси в ЛРП, мкг/г; TD – среднесуточная терапевтическая доза ЛРП, г/сут; BW – средний вес потребителя (70 000 г).

¹ Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans / International agency for research on cancer (IARC). Available at: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans>. Accessed: 21.06.2024.

Таблица 1. Образцы настоек валерианы и пустырника, реализуемых через аптечную сеть
Table 1. Samples of tinctures of valerian and motherwort sold through the pharmacy network

Наименование Name	Производитель Manufacturer	Серия Series	Образец Sample
Валерианы настойка Valerian tincture	АО «Кировская фармацевтическая фабрика» JSC "Kirov Pharmaceutical Factory"	090422	в422
	ЗАО «Эколаб» JSC "Ekolab"	070522	в522
	ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» OJSC "Borisov Medical Preparations Plant"	490521	в521
	ОАО «Флора Кавказа» JSC "Flora Kavkaza"	250514	в514
	ООО «БЭГРИФ» LLC "BAGRIF"	120413	в413
	ООО «Гиппократ» LLC "Hippocrates"	020215	в215
	ООО «Камелия НПП» LLC "Kamelia NPP"	020221	в221к
		030322	в322
	ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» LLC "Tula Pharmaceutical Factory"	100420	в420
Пустырника настойка Motherwort tincture	АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика» JSC "Kemerovo Pharmaceutical Factory"	021221	п221
	АО «Кировская фармацевтическая фабрика» JSC "Kirov Pharmaceutical Factory"	110522	п522
	ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» OJSC "Borisov Medical Preparations Plant"	451219	п219
	ООО «Ивановская фармацевтическая фабрика» LLC "Ivanovo Pharmaceutical Factory"	80520	п520и
	ОАО «Флора Кавказа» JSC "Flora Kavkaza"	30308	п308
	ООО «Аптека Фармикон» LLC "Pharmikon Pharmakon"	140411	п411
	ООО «Гиппократ» LLC "Hippocrates"	70520	п520г
	ООО «Камелия НПП» LLC "Kamelia NPP"	040422	п422
	ООО «Тульская фармацевтическая фабрика» LLC "Tula Pharmaceutical Factory"	211221	п221т
	АО «Производственная фармацевтическая компания Обновление» (АО «ПФК Обновление») JSC "Production Pharmaceutical Company Obnovlenye"	5BL6DAD5DH567	ПР

Таблица 2. Параметры прибора при выполнении эксперимента

Table 2. Device parameters during the experiment

Параметр Option	Значение Value
Мощность высокочастотного генератора плазмы Power of high frequency plasma generator	1500 Вт
Поток плазменного газа (аргон) Plasma gas flow (argon)	15 л/мин
Поток газа распылителя (аргон) Nebulizer gas flow (argon)	1,0 л/мин
Скорость подачи пробы Sample flow rate	0,10 об/мин
Количество повторностей Number of repetitions	5
Время интегрирования Integration time	0,1 с

Риски рассчитывали для 6 токсичных элементов (As, Cd, Hg, Pb, Sr, Tl), 3 потенциальных канцерогенов (Cr, Ni, Co), 6 эссенциальных элементов (Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, V). За величину С (концентрации элементной примеси в ЛРП) принимали среднюю концентрацию элемента на уровне медианы ($C_{мед.}$) и 90-го процентиля ($C_{90\%}$). рассчитанные в выборке. Рассчитанные коэффициенты опасности элементных токсикантов

представлены в таблицах 5, 6. Оценку величины HQ проводили как с учетом средней или медианной дозы, так и по верхней границе воздействия (с учетом 90-го процентиля этого распределения).

Для оценки суммарного воздействия элементных токсикантов применяется суммарный индекс опасности (HI), рассчитываемый по формуле [7]:

$$HI = HQ_1 + HQ_2 + \dots + HQ_n,$$

где HQ_1 , HQ_2 , HQ_n – коэффициенты опасности 1, 2... n-го элементного токсиканта.

Расчет значений HQ по отдельным элементам в образцах настоек валерианы и пустырника показал, что наибольший вклад в суммарную величину индекса опасности HI вносят Fe, Mn, Zn. Величины HI для изученных настоек, рассчитанные на уровнях медианы и 90-го процентиля, составили: для валерианы – $0,16 \cdot 10^{-6}$ и $0,27 \cdot 10^{-6}$ соответственно, для пустырника – $0,022 \cdot 10^{-5}$ и $0,028 \cdot 10^{-5}$ соответственно, полученные значения не превышают 1,0. Следовательно, суммарное воздействие As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Tl, V, Zn на здоровье человека при потреблении суточной дозы настоек характеризуется как допустимое, проводить периодический мониторинг содержания ненормируемых элементов в изученных образцах лекарственных растительных препаратов не требуется.

Таблица 3. Содержание тяжелых металлов и мышьяка в настойках валерианы, мкг/г

Table 3. Content of heavy metals and arsenic in tinctures of valerian, µg/g

Элемент Element	Образцы настоек валерианы Samples of valerian tinctures									
	в413 v413	в420 v420	в215 v215	в521 v521	в322 v322	в422 v422	в522 v522	в514 v514	в221к v221k	ВР VR
V	0,0017	0,0054	0,0030	0,0060	0,0054	0,0026	0,0037	0,0030	0,0009	0,0034
Cr	0,0073	0,0097	0,0053	0,0066	0,0053	0,0098	0,0058	0,0100	0,0052	0,0117
Mn	0,9901	1,8421	0,6471	0,6681	0,4976	0,8225	0,6851	1,1700	0,3099	0,8676
Fe	0,2345	0,2229	0,2621	0,3228	0,1045	0,2069	0,1968	0,3799	0,2447	0,1626
Co	0,0268	0,0354	0,0117	0,0188	0,0396	0,0246	0,0642	0,0134	0,0049	0,0261
Ni	0,2424	0,2238	0,0938	0,0819	0,1124	0,1545	0,2333	0,0834	0,1314	0,1869
Cu	0,3187	0,3105	0,2043	0,5013	0,3919	0,2860	0,4101	1,3998	0,7563	0,3340
Zn	1,0449	1,0194	0,3768	0,7830	0,6498	0,4778	0,6707	4,1513	0,9302	0,7197
As	0,0055	0,0099	0,0029	0,0056	0,0469	0,0069	0,0114	0,0032	0,0032	0,0079
Sr	0,0056	0,0321	0,0144	0,0251	0,0341	0,0256	0,0321	0,0286	0,0711	0,0051
Mo	0,0003	0,0057	0,0009	0,0056	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	0,0014
Cd	0,0009	0,0016	0,0004	0,0006	0,0002	0,0010	0,0002	0,0005	0,0001	0,0010
Tl	0,0017	0,0026	0,0010	0,0005	0,0004	0,0017	0,0003	0,0014	< п.о. < d.l.	0,0022
Hg	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.
Pb	0,0014	0,0029	0,0019	0,0013	0,0034	0,0024	0,0007	0,0059	0,0015	0,0040

Примечание. < п.о. – результат ниже предела обнаружения метода (с ошибкой определения в диапазоне 0,65–19 %).
Таблица составлена авторами по собственным данным.

Note. < d.l. – the result is below the detection limit of the method (with a determination error in the range of 0.65–19 %).
The table is prepared by the authors using their own data.

Таблица 4. Содержание тяжелых металлов и мышьяка в настойках пустырника, мкг/г
Table 4. Content of heavy metals and arsenic in tinctures of motherwort, µg/g

Элемент Element	Образцы настоек пустырника Samples of motherwort tinctures									
	п411 m411	п520г m520g	п520и m520i	п221 m221	п308 m308	п422 m422	п522 m522	п221т m221t	п219 m219	ПР PR
V	0,0015	0,0013	0,0053	0,0013	0,0016	0,0006	0,0013	0,0015	0,0011	0,0016
Cr	0,0059	0,0050	0,0054	0,0059	0,0034	0,0035	0,0046	0,0059	0,0060	0,0118
Mn	0,3371	0,3367	0,3230	0,1307	0,1459	0,0999	0,2325	0,4584	0,3369	0,2441
Fe	0,4238	0,0987	0,1568	0,3059	0,2711	0,2241	0,1767	0,3207	0,2879	0,1808
Co	0,0056	0,0027	0,0049	0,0044	0,0031	0,0036	0,0030	0,0109	0,0027	0,0029
Ni	0,0993	0,0167	0,1834	0,1643	0,0337	0,0983	0,1242	0,2576	0,0571	0,1878
Cu	0,2516	0,3304	0,4167	0,3534	0,3488	0,7088	0,3127	0,4948	0,5173	0,3345
Zn	0,5886	0,3226	0,6032	0,4593	0,6068	0,6546	0,5422	0,7466	0,6932	< п.о. < d.l.
As	0,0037	0,0021	0,0042	0,0021	0,0061	0,0057	0,0022	0,0030	0,0023	0,0035
Sr	0,0103	0,0173	0,0331	0,0160	0,0166	0,0575	0,0375	0,0399	0,0557	0,0138
Mo	0,0022	0,0017	0,0037	0,0040	0,0014	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	0,0053
Cd	0,0003	0,0001	0,0001	0,0002	0,0003	0,0002	0,0001	0,0003	0,0001	< п.о. < d.l.
Tl	0,0003	0,0001	0,0002	0,0009	0,0004	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	0,0002	< п.о. < d.l.	0,0001
Hg	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.	< п.о. < d.l.
Pb	0,0020	0,0007	0,0006	0,0018	0,0025	0,0009	< п.о. < d.l.	0,0011	0,0013	0,0003

Примечание. < п.о. – результат ниже предела обнаружения метода (с ошибкой определения в диапазоне 0,65–19 %).
Таблица составлена авторами по собственным данным.

Note. < d.l. – the result is below the detection limit of the method (with a determination error in the range of 0.65–19 %).
The table is prepared by the authors using their own data.

Таблица 5. Коэффициенты опасности элементных токсикантов в настойке пустырника
Table 5. Hazard coefficients of elemental toxicants in motherwort tincture

Элемент Element	RfD, мкг/(г · сут) [5] RfD, µg/(g · day) [5]	C _{мед.} (C _{90%}), мкг/г C _{мед.} (C _{90%}), µg/g	ADD _{мед.} · 10 ⁻⁶ , (ADD _{90%} · 10 ⁻⁶), мкг/(г · сут) ADD _{мед.} · 10 ⁻⁶ , (ADD _{90%} · 10 ⁻⁶), µg/(g · day)	HQ _{мед.} · 10 ⁻⁶ HQ _{мед.} · 10 ⁻⁶	HQ _{90%} · 10 ⁻⁶
V	0,005	0,0014 (0,0020)	0,071 (0,100)	0,0004	0,0005
Cr	1,5	0,0056 (0,0066)	0,287 (0,338)	0,4307	0,5067
Mn	0,14	0,2836 (0,3493)	14,461 (17,813)	2,0246	2,4938
Fe	0,7	0,2476 (0,3310)	12,628 (16,882)	8,8396	11,8176
Co	0,0003	0,0034 (0,0062)	0,172 (0,314)	0,0001	0,0001
Ni	0,02	0,1117 (0,1948)	5,697 (9,935)	0,1139	0,1987
Cu	0,04	0,3511 (0,5364)	17,905 (27,358)	0,7162	1,0943
Zn	0,3	0,5959 (0,6985)	30,389 (35,625)	9,1167	10,6875
As	0,0003	0,0032 (0,6985)	0,165 (0,294)	0,0001	0,0001
Sr	0,6	0,0252 (0,0559)	1,284 (2,849)	0,7703	1,7092
Mo	0,005	0,0016 (0,0041)	0,080 (0,210)	0,0004	0,0011
Cd	0,001	0,0002 (0,0003)	0,008 (0,015)	7,88 · 10 ⁻⁶	15,29 · 10 ⁻⁶
Tl	0,00007	0,0001 (0,0004)	0,007 (0,022)	0,46 · 10 ⁻⁶	1,51 · 10 ⁻⁶
Hg	0,0003	0,0000 (0,0000)	0,000 (0,000)	0,000	0,000
Pb	0,0035	0,0010 (0,0020)	0,050 (0,104)	0,0002	0,0004

Таблица 6. Коэффициенты опасности элементных токсикантов в настойке валерианы

Table 6. Hazard coefficients of elemental toxicants in valerian tincture

Элемент Element	RfD, мкг/(г · сут), [5] RfD, µg/(g · day), [5]	C _{мед.} (C _{90%}), мкг/г C _{med.} (C _{90%}), µg/g	ADD _{мед.} · 10 ⁻⁶ , (ADD _{90%} · 10 ⁻⁶), мкг/(г · сут) ADD _{med.} · 10 ⁻⁶ , (ADD _{90%} · 10 ⁻⁶), µg/(g · day)	HQ _{мед.} · 10 ⁻⁶ HQ _{med.} · 10 ⁻⁶	HQ _{90%} · 10 ⁻⁶
V	0,005	0,0032 (0,0055)	0,0985 (0,1672)	0,0005	0,0008
Cr	1,5	0,0070 (0,0102)	0,2125 (0,3107)	0,3188	0,4660
Mn	0,14	0,7538 (1,2372)	23,0444 (37,8233)	3,2262	5,2953
Fe	0,7	0,2287 (0,3285)	6,9918 (10,0427)	4,8943	7,0299
Co	0,0003	0,0253 (0,0421)	0,7738 (1,2863)	0,0002	0,0004
Ni	0,02	0,1430 (0,2342)	4,3705 (7,1608)	0,0874	0,1432
Cu	0,04	0,3630 (0,8206)	11,0963 (25,0876)	0,4439	1,0035
Zn	0,3	0,7514 (1,3555)	22,9706 (41,4394)	6,8912	12,4318
As	0,0003	0,0063 (0,0149)	0,1913 (0,4561)	0,0001	0,0001
Sr	0,6	0,0271 (0,0378)	0,8277 (1,1558)	0,4966	0,6935
Mo	0,005	0,0001 (0,0056)	0,0039 (0,1702)	20 · 10 ⁻⁶	0,0009
Cd	0,001	0,0006 (0,0011)	0,0176 (0,0336)	17,56 · 10 ⁻⁶	33,57 · 10 ⁻⁶
Tl	0,00007	0,0012 (0,0023)	0,0369 (0,0694)	2,58 · 10 ⁻⁶	4,86 · 10 ⁻⁶
Hg	0,0003	0,0000 (0,0000)	0,0000 (0,0000)	0,000	0,000
Pb	0,0035	0,0022 (0,0042)	0,0660 (0,1274)	0,0002	0,0004

Таблица 7. Индивидуальные канцерогенные риски при пероральном поступлении элементных канцерогенов, содержащихся в настойках

Table 7. Individual carcinogenic risks from oral intake of elemental carcinogens contained in tinctures

Наименование Name	Элемент Element	As	Cd	Cr	Pb
	SF ₀	1,5	0,38	0,42	0,047
Настойка валерианы Valerian tincture	CR ₀	6,84 · 10 ⁻⁷	1,28 · 10 ⁻⁸	1,31 · 10 ⁻⁷	5,99 · 10 ⁻⁹
Настойка пустырника Motherwort tincture	CR ₀	4,42 · 10 ⁻⁷	5,81 · 10 ⁻⁹	1,42 · 10 ⁻⁷	4,9 · 10 ⁻⁹

Канцерогенный риск воздействия элементных токсикантов оценивали по индивидуальному канцерогенному риску (CR). Величину CR₀ рассчитывали по формуле [6]:

$$CR_0 = LADC \cdot UR_0,$$

где LADC – средняя концентрация вещества в исследуемом объекте за весь период усреднения экспозиции, мкг/г (на уровне 90-го перцентиля); UR₀ – единичный канцерогенный риск при пероральном поступлении канцерогенного вещества в организм, (мкг/г)⁻¹.

Единичный канцерогенный риск при пероральном поступлении канцерогенного вещества в организм (UR₀) рассчитывают по формуле [6]:

$$UR_0 = (SF_0 \cdot IR)/BW,$$

где SF₀ – фактор канцерогенного потенциала при пероральном вводе, (мкг/(г · сут))⁻¹; IR – среднесуточное потребление продукта за весь период усреднения экспозиции, г/сут; BW – среднее значение массы тела человека, 70 000 г.

В расчетах приведены элементные канцерогены, для которых в литературных источниках имелись значения факторов канцерогенного потенциала при пероральном введении (таблица 7).

Расчет индивидуального канцерогенного риска элементных канцерогенов, поступающих в организм с настойками валерианы и пустырника, показал, что полученные значения не превышали 1 · 10⁻⁶. Следовательно, изученные настойки безопасны для потребления с точки зрения вероятности развития новообразований и не требуют мероприятий по снижению уровня риска.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определено фактическое содержание элементных токсикантов в настойках валерианы и пустырника. Установлено, что содержание токсичных элементов (Pb, Cd, As, Hg) составляло не более 0,006 мкг/г и не превышало уровней допустимых концентраций, регламентированных нормативной документацией.

Расчеты неканцерогенных рисков при использовании настоек валерианы и пустырника показали, что суммарное воздействие As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Tl, V, Zn на здоровье человека при потреблении суточной дозы настоек характеризуется как допустимое, проводить периодический мониторинг содержания ненормируемых элементов в изученных лекарственных растительных препаратах не требуется. Установлено, что настойки валерианы и пустырника не являются онкогенными факторами и не требуют мероприятий по снижению риска.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко Н. Н., Бондарев А. В., Жиликова Е. Т., Писарев Д. И., Новиков О. О. Фитопрепараты, анализ фармацевтического рынка Российской Федерации. *Научный результат. Медицина и фармация*. 2017;3(4):30–38. DOI: 10.18413/2313-8955-2017-3-4-30-38.
2. Bhardwaj S., Verma R., Gupta J. Challenges and future prospects of herbal medicine. *International Research in Medical and Health Sciences*. 2018;1(1):12–15. DOI: 10.36437/irmhs.2018.1.1.D.
3. Самбукова Т. В., Овчинников Б. В., Ганопольский В. П., Ятманов А. Н., Шабанов П. Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017;15(2):56–63. DOI: 10.17816/RCF15256-63.
4. Галенко М. С., Гравель И. В., Вельц Н. Ю., Аляутдин Р. Н. Нормирование содержания тяжелых металлов и мышьяка как фактор безопасности использования лекарственных растительных препаратов. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2021;9(2):61–68. DOI: 10.30895/2312-7821-2021-9-2-61-68.
5. Овсиенко С. В., Кузьмина Н. Е., Шукин В. М., Хорольская Е. А. Разработка комплексного подхода к оценке содержания элементных загрязнителей в нативных продуктах на основе лекарственного растительного сырья и его применение к семенам тыквы. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(2):149–160. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-149-160.
6. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Руководство Р 2.1.10.1920-04. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004. 143 с.
7. Определение экспозиции и оценка риска воздействия химических загрязнителей пищевых продуктов на население. Методические указания МУ 2.3.7.2519-09. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010. 27 с.
8. Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Изменения в СанПиН 1.2.353-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2015. 7 с.
9. Barbeş L., Bărbulescu A., Dumitriu C. Ş. Human Health Risk Assessment to the Consumption of Medicinal Plants with Melliferous Potential from the Romanian South-Eastern Region. *Toxics*. 2023;11(6):520. DOI: 10.3390/toxics11060520.
10. Галенко М. С., Аляутдин Р. Н., Гравель И. В. Применение атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой для анализа тяжелых ме-

таллов и мышьяка в настойках. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2022;12(2):173–182. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-173-182.

11. Шукин В. М., Жигилей Е. С., Ерина А. А., Швецова Ю. Н., Кузьмина Н. Е., Лутцева А. И. Валидация методики определения ртути, свинца, кадмия и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах на его основе методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(9):57–64. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-9-57-64.
12. Галенко М. С., Гравель И. В. Оценка трансредовых переходов тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах корневищ с корнями валерианы и травы пустырника. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(3):442–452. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-13-3-442-452.
13. Санжарова Н. И., Гешель И. В., Крыленкин Д. В., Гордиенко Е. В. Современное состояние исследований поведения 90SR в системе почва – сельскохозяйственные растения (обзор). *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2019;59(6):643–655. DOI: 10.1134/S0869803119060109.
14. Плетенева Т. В., Потапова Н. И., Скальный А. В., Елисеева Ю. А., Самылина И. А., Сыроешкин А. В. Тяжелые металлы и стандартизация настоек. *Фармация*. 2004;4:9–10.
15. Матвейко Н. П., Брайкова А. М., Бушило К. А., Садовский В. В. Инверсионно-вольтамперометрический контроль содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе. *Вестник Витебского государственного технологического университета*. 2016;1(30):82–89.
16. Дьякова Н. А. Эколого-фармакогностическая оценка качества травы пустырника пятилопастного, произрастающего в различных урбо- и агробиоценозах Воронежской области. *Традиционная медицина*. 2022;4(70):44–48. DOI: 10.54296/18186173_2022_4_44.
17. Arce S., Cerutti S., Olsina C. R., Gomez M. R., Martinez L. D. Determination of Metal Content in Valerian Root Phytopharmaceutical Derivatives by Atomic Spectrometry. *Journal of AOAC International*. 2005;88(1):221–225.

REFERENCES

1. Boyko N. N., Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Pisarev D. I., Novikov O. O. Phytodrugs, analysis of Russian Federation pharmaceutical market. *Research Result. Medicine and Pharmacy*. 2017;3(4):30–38 (In Russ.) DOI: 10.18413/2313-8955-2017-3-4-30-38.
2. Bhardwaj S., Verma R., Gupta J. Challenges and future prospects of herbal medicine. *International Research in Medical and Health Sciences*. 2018;1(1):12–15. DOI: 10.36437/irmhs.2018.1.1.D.
3. Sambukova T. V., Ovchinnikov B. V., Ganapol'sky V. P., Yatmanov A. N., Shabanov P. D. Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2017;15(2):56–63. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF15256-63.
4. Galenko M. S., Gravel I. V., Velts N. Yu., Alyautdin R. N. Limits for the Content of Heavy Metals and Arsenic as a Means of Ensuring Safe Use of Herbal Medicinal Products. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2021;9(2):61–68. (In Russ.) DOI: 10.30895/2312-7821-2021-9-2-61-68.

5. Ovsienko S.V., Kuz'mina N.E., Shchukin V.M., Khorolskaya E.A. Development of a Comprehensive Approach to Assessing the Content of Elemental Contaminants in Native Herbal Medicinal Products, Using Pumpkin Seeds as a Case Study. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(2):149–160. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-149-160.
6. Guidelines for assessing the risk to public health when exposed to chemicals polluting the environment. Manual R 2.1.10.1920-04. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2004. 143 p. (In Russ.)
7. Determination of exposure and risk assessment of the impact of chemical contaminants of food products on the population: Methodological guidelines MU 2.3.7.2519-09. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2010. 27 p. (In Russ.)
8. Carcinogenic factors and basic requirements for the prevention of carcinogenic hazard. Sanitary and epidemiological rules and regulations. Changes to SanPiN 1.2.2353-08. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2015. 7 p. (In Russ.)
9. Barbeș L., Bărbulescu A., Dumitriu C. Ș. Human Health Risk Assessment to the Consumption of Medicinal Plants with Melliferous Potential from the Romanian South-Eastern Region. *Toxics*. 2023;11(6):520. DOI: 10.3390/toxics11060520.
10. Galenko M.S., Alyautdin R.N., Gravel I.V. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry for the analysis of heavy metals and arsenic in tinctures. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2022;12(2):173–182. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-12-2-173-182.
11. Shchukin V.M., Zhigilei E.S., Erina A.A., Shvetsova Yu.N., Kuz'mina N.E., Luttseva A.I. Validation of an ICP-MS method for the determination of mercury, lead, cadmium and arsenic in medicinal plants and related drug preparations. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(9):57–64. (In Russ.) DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-9-57-64.
12. Galenko M.S., Gravel I.V. Assessment of Trans-Environmental Transitions of Heavy Metals and Arsenic in Herbal Drugs and Herbal Medicinal Products of Valerian Rhizomes with Roots and Motherwort Herb. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(3):442–452. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2023-13-3-442-452.
13. Sanzharova N.I., Geshel I.V., Krylenkin D.V., Gordienko E.V. Current state of studies on 90SR behavior in the soil – agricultural plants system (overview). *Radiation Biology. Radioecology*. 2019;59(6):643–655. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0869803119060109.
14. Pleteneva T.V., Potapova N.I., Skalny A.V., Eliseeva Yu.A., Samylina I.A., Syroeshkin A.V. Heavy metals and tincture standardization. *Pharmacy*. 2004;(4):9–10. (In Russ.)
15. Matveiko N.P., Braikova A.M., Bushilo K.A., Sadovsky V.V. Stripping voltammetric monitoring of the content of heavy small metals in medical plant raw material and preparations on its basis. *Bulletin of Vitebsk State Technological University*. 2016;1(30):82–89. (In Russ.)
16. Dyakova N.A. Ecological-pharmacognostic assessment of herb quality of five-lobed wasteberry herb growing in various urb- and agrobiocenoses of Voronezh region. *Traditional Medicine*. 2022;4(70):44–48. (In Russ.) DOI: 10.54296/18186173_2022_4_44.
17. Arce S., Cerutti S., Olsina C.R., Gomez M.R., Martinez L.D. Determination of Metal Content in Valerian Root Phyto-pharmaceutical Derivatives by Atomic Spectrometry. *Journal of AOAC International*. 2005;88(1):221–225.



Валидация биоаналитической методики определения и оценка фармакокинетики нового лекарственного средства на основе полисахарида аира болотного в эксперименте на лабораторных животных

С. В. Кривошеков¹✉, Е. А. Яновская², Р. В. Гурто², О. С. Брюшнина², Д. А. Исаков¹,
А. В. Зыкова¹, Ю. Г. Зюзькова², А. М. Гурьев¹, В. В. Удут², М. В. Белоусов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России). 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е. Д. Гольдберга. 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3

✉ Контактное лицо: Кривошеков Сергей Владимирович. E-mail: ksv_tsu@mail.ru

ORCID: С. В. Кривошеков – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;

Е. А. Яновская – <https://orcid.org/0000-0002-4635-8046>;

Р. В. Гурто – <https://orcid.org/0000-0002-4635-8046>;

О. С. Брюшнина – <https://orcid.org/0000-0002-7479-0733>;

Д. А. Исаков – <https://orcid.org/0009-0005-9919-7353>;

А. В. Зыкова – <https://orcid.org/0009-0008-9365-800X>;

Ю. Г. Зюзькова – <https://orcid.org/0000-0002-1400-8914>;

А. М. Гурьев – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>;

В. В. Удут – <https://orcid.org/0000-0002-3829-7132>;

М. В. Белоусов – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Статья поступила: 03.04.2024

Статья принята в печать: 11.09.2024

Статья опубликована: 13.09.2024

Резюме

Введение. $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан – водорастворимый гетерополисахарид, выделенный из корневищ аира болотного (*Acorus calamus* L.) и обладающий противоопухолевым, антиметастатическим, иммуномодулирующим и гепатопротекторным действием, защитным действием на угнетенное в ходе цитостатического лечения кроветворение.

Цель. Валидация биоаналитической методики определения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. и изучение фармакокинетических параметров нового лекарственного средства на его основе после однократного введения 120 мг/кг крысам и 24, 30, 42 мг/кг кроликам.

Материалы и методы. В исследовании использованы в качестве основных животных 8 крыс-самцов (средняя масса – 300 г). В качестве второго вида животных использовали 6 кроликов-самцов (средняя масса тела – 2,5 кг). Эксперимент по оценке доз проведен на 24 кроликах (масса тела – 2,3–2,5 кг). Количественное определение $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. в плазме крови животных проводили методом ВЭЖХ-МС/МС, аналитическая форма – галактуроновая кислота. Методика пробоподготовки биообразцов включала стадию ферментативного гидролиза $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. раствором пектиназы до образования галактуроновой кислоты.

Результаты и обсуждения. Изучена фармакокинетика нового лекарственного средства $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. после однократного введения доз 120 мг/кг крысам и 24, 30, 42 мг/кг кроликам. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме кролика составило $1,0 \pm 0,21$ ч, время полувыведения – $0,7 \pm 0,15$ ч. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме крысы составило 1,16 ч, время полувыведения $T_{1/2}$ – 0,80 ч. После однократного внутривенного введения кроликам 24, 30 и 42 мг/кг максимальная концентрация в системном кровотоке достигается через 5 мин после введения и составляет в среднем

© Кривошеков С. В., Яновская Е. А., Гурто Р. В., Брюшнина О. С., Исаков Д. А., Зыкова А. В., Зюзькова Ю. Г., Гурьев А. М.,
Удут В. В., Белоусов М. В., 2024

© Krivoshchekov S. V., Yanovskaya E. A., Gurto R. V., Bryushinina O. S., Isakov D. A., Zyкова A. V., Zyuz'kova Yu. G., Guryev A. M.,
Udut V. V., Belousov M. V., 2024

133,95 ± 27,04, 145,86 ± 40,90 и 226,13 ± 41,27 мкг/мл соответственно, период полураспределения варьировался от 0,22 до 0,26 ч, период полувыведения – от 3,52 до 3,96 ч.

Заключение. Проведена оценка фармакокинетических параметров α(1,2)-L-рамно-α(1,4)-D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. на животных, основанная на использовании методики количественного определения галактуроновой кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС.

Ключевые слова: полисахарид, α(1,2)-L-рамно-α(1,4)-D-галактопиранозилуранан, галактуроновая кислота, аир болотный, *Acorus calamus* L., фармакокинетика, ВЭЖХ-МС/МС

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

Вклад авторов. Е. А. Яновская, Р. В. Гурто, Ю. Г. Зюзькова и О. С. Брюшнина проводили введение лекарственной формы и забор крови у кроликов. Е. А. Яновская и С. В. Кривошеков проводили количественное определение α(1,2)-L-рамно-α(1,4)-D-галактопиранозилуранана в плазме методом ВЭЖХ-МС/МС. С. В. Кривошеков, М. В. Белоусов, А. М. Гурьев и В. В. Удут разработали дизайн эксперимента провели окончательную корректировку статьи. Е. А. Яновская, С. В. Кривошеков, Д. А. Исаков и А. В. Зыкова провели литературный поиск по научному направлению и написание текста статьи. Е. А. Яновская и С. В. Кривошеков провели расчеты и статистическую обработку результатов эксперимента.

Финансирование. Работа выполнена в рамках прикладного научного исследования 720000Ф.99.1.БН62АБ30000 в рамках государственного задания № 056-00116-23-01.

Для цитирования: Кривошеков С. В., Яновская Е. А., Гурто Р. В., Брюшнина О. С., Исаков Д. А., Зыкова А. В., Зюзькова Ю. Г., Гурьев А. М., Удут В. В., Белоусов М. В. Валидация биоаналитической методики определения и оценка фармакокинетики нового лекарственного средства на основе полисахарида аира болотного в эксперименте на лабораторных животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):190–201. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1795>

Pharmacokinetics of a new drug based on polysaccharide from *acorus calamus* in an experiment on laboratory animals

Sergei V. Krivoshchekov¹✉, Elena A. Yanovskaya², Roman V. Gurto², Olga S. Bryushinina², Denis A. Isakov¹, Anastasia V. Zyкова¹, Yulia G. Zyuz'kova², Artem M. Guryev¹, Vladimir V. Udut², Mikhail V. Belousov¹

¹ Siberian State Medical University, SSMU. 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

² Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine. 3, Prospekt Lenina, Tomsk, 634028, Russia

✉ **Corresponding author:** Sergei V. Krivoshchekov. **E-mail:** ksv_tsu@mail.ru

ORCID: Sergei V. Krivoshchekov – <https://orcid.org/0000-0001-5505-7141>;

Elena A. Yanovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4635-8046>;

Roman V. Gurto – <https://orcid.org/0000-0002-4635-8046>;

Olga S. Bryushinina – <https://orcid.org/0000-0002-7479-0733>;

Denis A. Isakov – <https://orcid.org/0009-0005-9919-7353>;

Anastasia V. Zyкова – <https://orcid.org/0009-0008-9365-800X>;

Yulia G. Zyuz'kova – <https://orcid.org/0000-0002-1400-8914>;

Artem M. Guryev – <https://orcid.org/0000-0002-1120-4979>;

Vladimir V. Udut – <https://orcid.org/0000-0002-3829-7132>;

Mikhail V. Belousov – <https://orcid.org/0000-0002-2153-7945>.

Received: 03.04.2024

Accepted: 11.09.2024

Published: 13.09.2024

Abstract

Introduction. α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane is a water-soluble heteropolysaccharide isolated from the rhizomes of calamus marsh (*Acorus calamus* L.) and has antitumor, antimetastatic, immunomodulatory and hepatoprotective effects, protective effect on hematopoiesis suppressed during cytostatic treatment.

Aim. Validation of the bioanalytical method for the determination of α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. and the study of the pharmacokinetic parameters of a new drug based on it after a single administration of 120 mg/kg to rats and 24, 30, 42 mg/kg to rabbits.

Materials and methods. In the study, 8 male rats (average weight – 300 g) were used as the main animals. 6 male rabbits (average body weight – 2.5 kg) were used as an additional animal species. The dose assessment experiment was carried out on 24 rabbits (body weight – 2.3–2.5 kg). The quantitative determination of α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. in the blood plasma of animals was carried out by HPLC-MS/MS, the analytical form was galacturonic acid. The method of sample preparation of biological samples included the stage of enzymatic hydrolysis of α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. with a solution of pectinase for the formation of galacturonic acid.

Results and discussions. The pharmacokinetics of the new drug $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. was studied after a single dose of 120 mg/kg to rats and 24, 30, 42 mg/kg to rabbits. The average residence time of the drug in the rabbit's body was 1.0 ± 0.21 hours, the half-life was 0.7 ± 0.15 hours. The average residence time of the drug in the rat body was 1.16 hours, the half-life $T_{1/2}$ was 0.80 hours. After a single intravenous administration to rabbits of 24, 30 and 42 mg/kg, the maximum concentration in the systemic bloodstream is reached 5 minutes after administration and averages 133.95 ± 27.04 , 145.86 ± 40.90 and 226.13 ± 41.27 $\mu\text{g/ml}$, respectively, the half-life ranged from 0.22 to 0.26 h, the half-life from 3.52 to 3.96 hours.

Conclusion. The pharmacokinetic parameters of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. were evaluated in animals based on the use of the method of quantitative determination of galacturonic acid by HPLC-MS/MS.

Keywords: polysaccharide, $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane, galacturonic acid, *Acorus calamus* L., pharmacokinetics, HPLC-MS/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. Elena A. Yanovskaya, Roman V. Gurto, Yulia G. Zyuz'kova and Olga S. Bryushinina the dosage form was administered and blood was collected from rabbits. Elena A. Yanovskaya and Sergei V. Krivoshchekov performed quantitative determination of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronan in plasma by HPLC-MS/MS. Sergei V. Krivoshchekov, Mikhail V. Belousov, Artem M. Guryev and Vladimir V. Udut developed the experimental design and carried out the final revision of the article. Elena A. Yanovskaya, Sergei V. Krivoshchekov, Denis A. Isakov and Anastasia V. Zykova conducted a literature search in the scientific field and wrote the text of the article. Elena A. Yanovskaya and Sergei V. Krivoshchekov carried out calculations and statistical processing of the experimental results.

Funding. The work was carried out within the framework of applied scientific research 720000F.99.1.BN62AB30000 within the framework of state assignment No. 056-00116-23-01.

For citation: Krivoshchekov S. V., Yanovskaya E. A., Gurto R. V., Bryushinina O. S., Isakov D. A., Zykova A. V., Zyuz'kova Yu. G., Guryev A. M., Udut V. V., Belousov M. V. Pharmacokinetics of a new drug based on polysaccharide from *acorus calamus* in an experiment on laboratory animals. *Drug development & registration*. 2024;13(4):190–201. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1795>

ВВЕДЕНИЕ

$\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан является водорастворимым полисахаридом, выделенным из корневищ аира болотного (*Acorus calamus* L.). Ранее проведенные доклинические исследования по оценке эффективности показали, что $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан *Acorus calamus* L. обладает антиметастатическим, иммуномодулирующим и гепатопротекторным действием, оказывает защитное действие на угнетенное в ходе цитостатического лечения кроветворение, стимулирует регенеративные процессы в тонком кишечнике в условиях экспериментального опухолевого роста [1–4].

На всех этапах разработки нового лекарственного средства необходимо уделять особое внимание исследованию безопасности [5–7]: так, на первом этапе доклинических исследований оценивают токсичность, в том числе и генотоксичность [8–10]. После установления отсутствия выраженных токсических

эффектов, которые бы затруднили использование препарата в клинической практике, должна быть проведена оценка фармакокинетики лекарственного средства, которая включает изучение процессов абсорбции, распределения и элиминации из организма и требует разработки и валидации биоаналитической методики [11–12].

В связи с тем, что молекулярная масса действующего вещества превышает аналитический диапазон детектируемых масс подавляющего большинства масс-анализаторов, которые чаще всего применяются для определения фармакокинетических параметров веществ [13–14], не обладающих хромофорными и флуорофорными группами, оценку концентрации препарата в биологических объектах предложено проводить по галактуроновой кислоте.

Главная цепь макромолекулы лекарственного средства на основе $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. (полисахаридный кор) состоит из α -1,4-связанных остатков D-галактопиранозилураноновой кислоты, между которыми

располагаются остатки α -L-рамнопиранозы, включенные в основную цепь галактуронана α -1,2-связями и образующие линейную область рамногалактуронана; разветвленная часть представлена небольшим количеством нейтральных сахаров (глюкоза, галактоза, арабиноза) [15]. В предлагаемом алгоритме количественного определения действующего вещества в биологических пробах по градуировочным растворам α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. после ферментативного гидролиза пектиназой (Pectinase from *Aspergillus niger*, CAS 9032-75-1, Sigma-Aldrich, Дания) образуется галактуроновая кислота, для которой известны параметры распада молекулярного иона в режиме ионизации электрораспылением [16] и которая выступает аналитической формой лекарственного средства.

Целью настоящей работы являлось валидирование биоаналитической методики определения α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. и изучение фармакокинетических параметров нового лекарственного средства на его основе после однократного введения 120 мг/кг крысам и 24, 30, 42 мг/кг кроликам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты поставлены на половозрелых конвенциональных аутбредных крысах (возраст – 3 месяца, масса тела крыс – 290–320 г) стока CD разводки отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга (г. Томск) и лабораторных кроликах (возраст – 2 месяца, масса тела – 2,3–2,5 кг), полученных из ЛПХ (личное подсобное хозяйство) «Барин», Томская область, Кривошеинский район, село Петровка (гражданско-правовой договор № 231 от 17 мая 2013 года; ветеринарное свидетельство 270 № 0028697 от 20 мая 2013).

Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), и правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. № 464н).

Лекарственное средство на основе α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. вводили крысам и кроликам внутривенно в виде раствора 10 мг/мл. Во время инъекций и забора крови животные были иммобилизованы, в дальнейшем животные находились в индивидуальных клетках со свободным доступом к пище и воде. Для оценки основных фармакокинетических параметров лекарственное средство вводили однократно в дозах 120 мг/кг крысам и 30 мг/кг кроликам. Для оценки линейности вводили кроликам однократно в дозах 24, 30 и 42 мг/кг.

В качестве основного биологического материала использовали плазму крови. Пробы крови у крыс после однократного болюсного внутривенного вве-

дения отбирали до введения лекарственного средства и через 5, 10, 30, 45 мин и 1, 2, 4, 5 и 8 ч после введения. Животных, находящихся под эфирным наркозом, декапитировали, образцы крови собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отобранная плазма помещалась в чистые пробирки и хранилась при температуре –20 °С до проведения аналитического этапа работы.

Забор крови у кроликов осуществляли через ушную вену до введения исследуемого препарата и через 5, 10, 30, 45 мин и 1, 2, 4, 5 и 8 ч после введения. Образцы крови объемом 600–700 мкл помещали в гепаринизированные пробирки вместимостью 2 мл, центрифугировали со скоростью 5000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость перемещали в чистые пробирки и замораживали при –20 °С до выполнения хромато-масс-спектрометрического анализа.

α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронан *Acorus calamus* L. является водорастворимым гетерополисахаридом, а методика его количественного определения в биологических объектах основана на прямолинейной зависимости от определенного содержания галактуроновой кислоты, являющейся продуктом его ферментативного гидролиза [17–18]. Количественное определение α (1,2)-L-рамно- α (1,4)-D-галактопиранозилуронана в плазме крови проводили с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС, обладающего высокой чувствительностью и избирательностью [19–21]. Исследование проведено с использованием жидкостного хроматографа Dionex UltiMate™ 3000 и тройного квадрупольного масс-спектрометра API 2000 компании AB Sciex. Состав аналитической ВЭЖХ-МС-системы: насос для подачи подвижной фазы Dionex DGP-3600 SD; автоинжектор Dionex ACC-3000 со встроенным термостатом колонок; колонка аналитическая Dionex Acclaim OA, 4 × 250 мм, 5 мкм, с предколоночным картриджем; спектрофотометрический детектор Dionex VWD-3400RS; тройной квадрупольный масс-спектрометр API 2000 с электрораспылителем источником ионизации и программным обеспечением Analyst 1.5.2. Хроматографический анализ проводили в изократическом режиме, параметры хроматографического анализа:

- метод анализа – LC/MS/MS;
- колонка Dionex Acclaim OA, 4 × 250 мм, 5 мкм;
- температура в колонке – 29 °С;
- подвижная фаза – ACN: 0,1%-я HCOOH (88:12, v/v);
- скорость потока – 0,6 мл/мин;
- объем инъекции аналита – 20 мкл;
- время анализа – 6 мин.

Электрораспылительный источник ионизации работал в отрицательном режиме, с напряжением на капилляре –4,5 кВ. Температура нагрева осушающего газа – 400 °С. Подача газа-распылителя (азот) – 60 psi, осушающего газа (азот) – 70 psi, подача газа завесы (азот) – 40 psi. Потенциал декласте-

ризации -16 В, фокусирующий потенциал -270 , энергия соударения -26 эВ, окно MRM-детектирования 40 с. Для количественного определения использовали MRM-переход $193/59$ m/z. Пример хроматограммы стандартного раствора галактуроновой кислоты приведен на рисунке 1.

Ферментативный гидролиз осуществлялся с использованием раствора пектиназы с активностью $3,8$ ЕД/мл в формиатном буфере (pH $4,0$) (Pectinase from *Aspergillus niger*, CAS $9032-75-1$, Sigma-Aldrich).

Приготовление формиатно-аммиачного буфера: $1,1214$ г формиата аммония растворяли в 50 мл воды и добавляли $0,377$ мл 98% HCOOH (муравьиной кислоты). Измеряли pH раствора потенциометрически. При необходимости доводили pH до $4,0$ добавлением муравьиной кислоты или раствора аммиака.

Пробоподготовка осуществлялась следующим образом: аликвоту плазмы объемом 250 мкл помещали в чистые круглодонные пробирки объемом 2 мл, добавляли 250 мкл формиатно-аммиачного буфера (pH $4,0$) и 10 мкл раствора пектиназы $3,8$ ЕД/мл. Затем инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч для достижения полноты конверсии. После инкубирования образцы доставали из термостата и помещали в каждую пробирку 500 мкл ацетонитрила. Перемешивали на орбитальном шейкере (Biosan, Латвия) в течение 2 мин при 2500 об/мин, затем центрифугировали при $10\,000$ g и отбирали супернатант. Подготовленные таким образом образцы использовались для хроматографического анализа в объеме 20 мкл.

Расчет фармакокинетических параметров осуществляли модельным способом [22–23]. Параметры гибридных микроконстант β и α , предэкспоненциальные множители (A , B) для уравнения, описывающего изменение концентрации вещества в центральной камере, определяли графически путем линейного регрессионного анализа терминального участка (β -фаза) и участка распределения (α -фаза) кривой в полулогарифмических координатах.

Рассчитывали следующие фармакокинетические параметры: C_0 – максимальное экспериментальное значение концентрации лекарственного средства в плазме крови после однократного введения лекарственного средства; AUC_{0-t} – площадь под экспериментальной кривой концентрации лекарственного средства в плазме крови за исследуемый период; Cl – общий клиренс; V_d – объем распределения лекарственного средства; MRT – среднее время удерживания лекарственного средства в организме; k_{el} – константа элиминации. Для вычисления C_t и k_{el} конечный (моноэкспоненциальный) участок фармакокинетической кривой описывали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

Константу элиминации (k_{el}), константы, характеризующие распределение вещества по периферическим органам и тканям (k_{12} , k_{21}), период полувыведения ($T_{1/2\beta}$), период полураспределения ($T_{1/2\alpha}$), объем распределения в центральной камере (V_1), стационарный объем (V_{ss}) вычисляли согласно стандартным соотношениям применительно к двухкамерной модели.

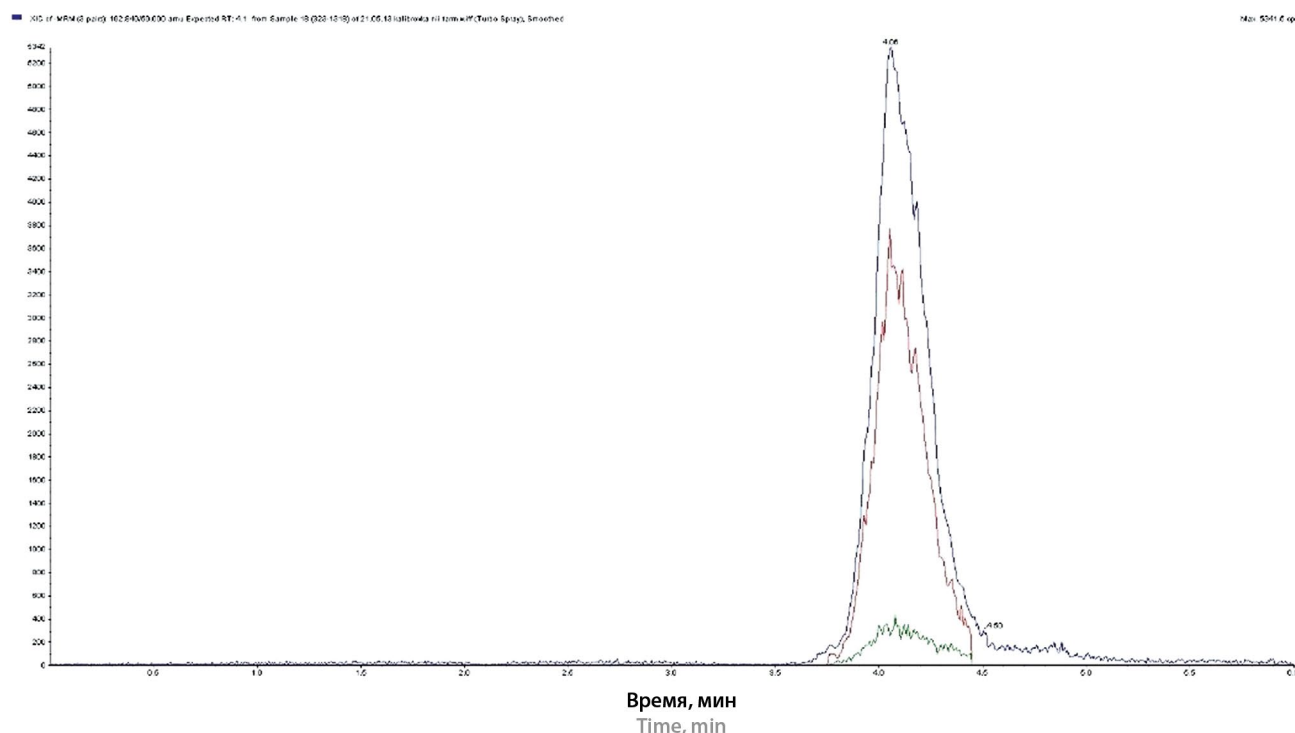


Рисунок 1. Хроматограмма галактуроновой кислоты

Figure 1. Chromatogram of galacturonic acid

Внемодельные параметры, такие как среднее время удерживания (MRT), площадь под фармакокинетической кривой зависимости «концентрация – время» в интервале от 0 до t (AUC_{0-t}), площадь под кривой зависимости «концентрация – время» в интервале от 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), площадь под кривой в координатах $C(t) \times t - t$ ($AUMC_{0-\infty}$), рассчитывали по следующим формулам:

$$AUC_{0-t} = \sum_{i=0}^n (C_i + C_{i+1}) \times (t_{i+1} - t_i) / 2, \quad (1)$$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_n / \beta, \quad (2)$$

$$AUMC_{0-\infty} = AUMC_{0-t} + C_n \times t_n / \beta + C_n / (\beta)^2, \quad (3)$$

$$MRT = AUMC_{0-\infty} / AUC_{0-\infty}, \quad (4)$$

где C_n – последняя измеренная концентрация.

Клиренс вычисляли по формуле:

$$Cl = \frac{D}{AUC_{0-\infty}}. \quad (5)$$

Значение максимальной концентрации (C_0) определяли исходя из полученных экспериментальных данных. Отклонение расчетных значений концентраций от экспериментальных рассчитывали по формуле:

$$C_0 = 100 - (C_{\text{эксп.}} \cdot 100 / C_{\text{теор.}}). \quad (6)$$

Статистическую обработку полученных в эксперименте данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica версии 10.0.1011.6 и Microsoft Excel (версия Excel 2013 для Windows). Использовали методы вариационной статистики [24]. Рассчитывали среднее арифметическое значение

(M), стандартное отклонение (σ), значение вероятности (p). При оценке линейности сравнивали значения с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса, поскольку фармакокинетические параметры, такие как C_{max} и AUC , не подчиняются нормальному закону распределения. Оценку параметров проводили при доверительной вероятности 95 % ($p = 0,95$) [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представлены основные результаты проведенной валидационной оценки используемой методики количественного определения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана после ферментативного гидролиза в эксперименте на половозрелых конвенциональных аутбредных крысах стока CD разведения отдела экспериментальных биологических моделей ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН (таблица 1).

Методика характеризуется линейностью в диапазоне концентраций от 0,09 до 800 мкг/мл, обладает достаточной чувствительностью, позволяет анализировать содержание $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана по аналитической форме – галактуроновой кислоте.

Определение концентрации лекарственного средства в плазме крови крыс после однократного введения в дозе 120 мг/кг начинали производить через 5 мин после инъекции. Расчет фармакокинетических параметров лекарственного средства в плазме крови крыс (на основе средних значений концентраций препарата в плазме крови животных) после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг представлен в таблице 2. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме крысы составило 1,16 ч, время полувыведения $T_{1/2} = 0,80$ ч.

Таблица 1. Характеристики валидационной оценки биоаналитической методики количественного определения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L.

Table 1. Characteristics of the validation assessment of the bioanalytical technique for the quantitative determination of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L.

Биологическая матрица The biological matrix	Уровень 1 Level 1		Уровень 2 Level 2		Уровень 3 Level 3		Степень извлечения, % Degree of extraction, %	ПКО, мкг/мл Detection and quantitation limit, µg/ml	Точность, % Accuracy, %
	σ_r	σ_R	σ_r	σ_R	σ_r	σ_R			
Плазма крови Blood plasma	9,71	6,5	2,84	5,8	1,77	5,57	58,8	0,088	98,15

Примечание. σ_r – значение относительного стандартного отклонения среднего результата внутрисерийного эксперимента; σ_R – значение относительного стандартного отклонения среднего результата межсерийного эксперимента; ПКО – нижний предел количественного определения. Уровень 1 – 1 мкг/мл; уровень 2 – 250 мкг/мл; уровень 3 – 800 мкг/мл.

Note. σ_r – the value of the relative standard deviation of the average result of the intra-batch experiment; σ_R – the value of the relative standard deviation of the average result of the inter-run experiment; The LOQ is the lower limit of quantitation. Level 1 – 1 µg/ml; level 2 – 250 µg/ml; level 3 – 800 µg/ml.

Таблица 2. Концентрация α(1,2)-L-рамно-α(1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. в плазме крови крыс после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 120 мкг/мл

Table 2. Concentration of α(1,2)-L-rhamno-α(1,4)-D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. in rat blood plasma after a single intravenous bolus injection, at a dose of 120 µg/ml

№	Время, ч Time, h							
	0,083	0,167	0,5	0,75	1	2	4	8
1	44,93	44,66	13,00	13,41	10,29	7,44	5,73	3,24
2	53,22	29,04	16,00	13,41	10,55	8,86	6,58	5,31
3	54,49	37,67	15,50	11,61	8,45	9,19	6,09	5,28
4	52,36	38,65	15,54	13,87	11,56	9,71	6,89	5,35
5	48,35	35,24	13,25	12,11	10,03	8,27	5,44	4,69
6	50,86	34,39	13,87	13,78	11,28	9,99	6,64	4,52
7	41,76	31,76	15,14	12,00	9,19	8,19	6,79	6,05
8	47,97	38,62	13,80	12,98	12,22	9,71	6,51	4,36
M	49,24	36,25	14,51	12,90	10,45	8,92	6,33	4,85
σ	4,35	4,79	1,16	0,87	1,25	0,90	0,53	0,85
CV%	9,69	10,73	8,92	6,51	12,09	12,07	9,17	26,22

Установлено, что максимальная скорость снижения концентрации и основное распределение определяемого вещества в организме наблюдались в первый час после введения.

Усредненный фармакокинетический профиль лекарственного средства в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг представлен на рисунке 2.

Фазу выведения препарата из организма наблюдали в последующие часы измерения концентрации: за 7 ч наблюдения концентрация препарата в плазме крови крыс снизилась в 2,2 раза и составила в ко-

нечной точке $4,85 \pm 0,85$ мкг/мл. Расчет фармакокинетических параметров лекарственного средства в плазме крови крыс (на основе средних значений концентраций препарата в плазме крови животных) после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг представлен в таблице 3.

Фармакокинетические кривые α(1,2)-L-рамно-α(1,4)-D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. в плазме крови кроликов описываются с помощью двухкамерной модели, рассчитанные значения концентраций в центральной камере и отклонение их от экспериментальных значений приведены в таблице 4.

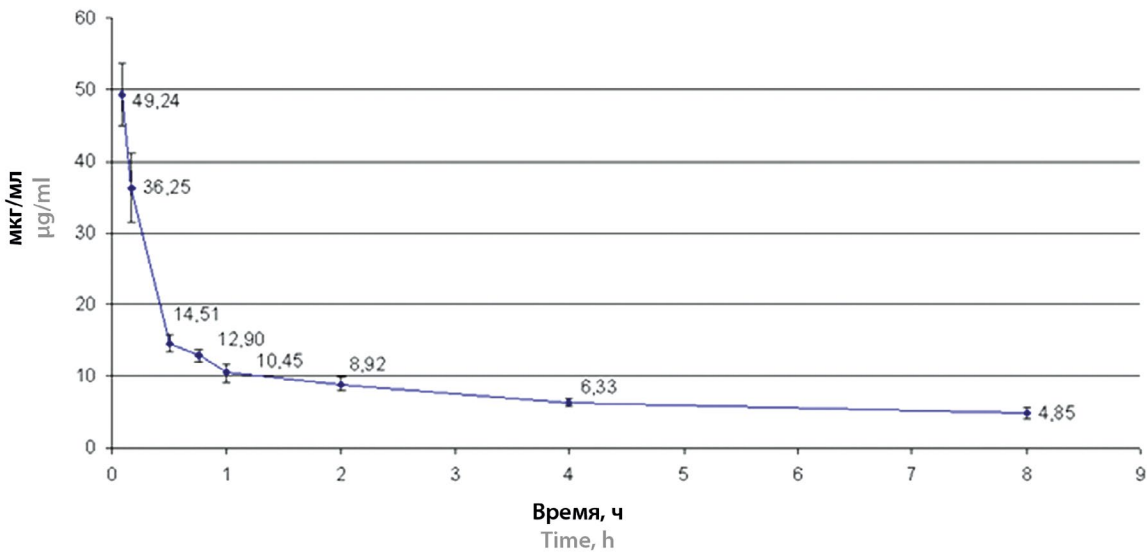


Рисунок 2. Усредненный фармакокинетический профиль лекарственного средства в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг

Figure 2. The average pharmacokinetic profile of the drug in rat blood plasma after a single intravenous injection at a dose of 120 mg/kg

Таблица 3. Фармакокинетические характеристики $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. в плазме крови крыс после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 120 мг/кг

Table 3. Pharmacokinetic characteristics of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. in rat blood plasma after a single bolus intravenous injection at a dose of 120 mg/kg

C_0 , мкг/мл C_0 , µg/ml	AUC_{0-4} , мкг·г/мл AUC_{0-4} , µg·g/ml	V_d , л/кг V_d , l/kg	CL , л/(кг·ч) CL , l/(kg·h)	MRT, ч MRT, h	k_{el} , ч ⁻¹ k_{el} , h ⁻¹	$T_{1/2}$
60,78	70,23	1974,37	1708,57	1,16	0,87	0,80

Усредненные фармакокинетические профили $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. в плазме крови кроликов после однократного введения в дозах 24, 30 и 42 мг/кг приведены на рисунке 3.

Результаты расчета фармакокинетических параметров при введении препарата кроликам в дозах 24, 30 и 42 мг/кг представлены в таблице 5.

Наибольшие концентрации после однократного внутривенного введения 3 исследуемых доз наблюдались через 5 мин после введения и в среднем составили $133,95 \pm 27,04$, $145,86 \pm 40,90$ и $226,13 \pm 41,27$ мкг/мл для доз 24, 30 и 42 мг/кг соответственно. Регрессионный анализ кривой зависимости «концентрация – время» показал, что элиминация вещества из организма кроликов имеет двухфазный характер. В первой фазе (α -фаза) за счет быстрого распределения в периферические ткани наблюдалось резкое снижение концентрации исследуемого препарата. Период полураспределения в среднем составил $14 \div 15$ мин

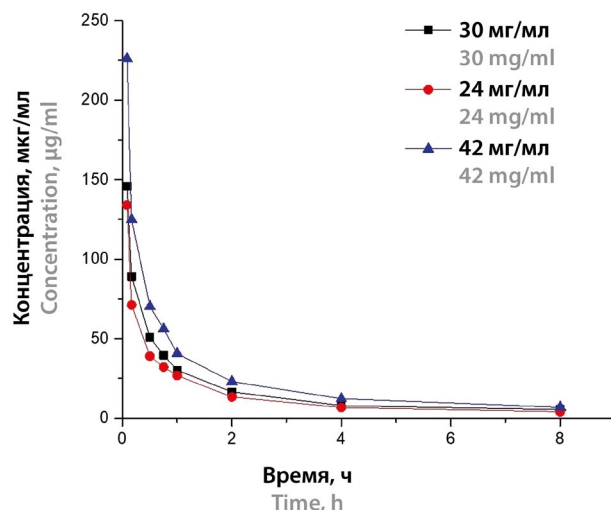


Рисунок 3. Усредненные фармакокинетические кривые $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. в плазме крови кроликов после однократного введения в дозах 24, 30 и 42 мг/кг

Figure 3. Average pharmacokinetic curves of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. in the blood plasma of rabbits after a single dose of 24, 30 and 42 mg/kg

и незначительно зависел от введенной дозы. Коэффициент детерминации в диапазоне от 0,08 до 0,75 ч составил не менее 0,9. Вторая фаза (β -фаза) характеризует элиминацию вещества из организма. Коэффициент детерминации терминального участка кривой в диапазоне от 1 до 8 ч варьировался от 0,87 до 0,94 в зависимости от дозы. Значения периода полувыве-

Таблица 4. Результаты расчетных значений концентраций $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. с помощью двухкамерной модели

Table 4. Results of calculated concentration values $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranosyluronane *Acorus calamus* L. using a two-chamber model

Время, ч Time, h	Однократное введение Single injection					
	Доза 24 мг/кг The dose is 24 mg/kg		Доза 30 мг/кг The dose is 30 mg/kg		Доза 42 мг/кг The dose is 42 mg/kg	
	$C_{расч.}$ $C_{calc.}$	Отклонение Deviation	$C_{расч.}$ $C_{calc.}$	Отклонение Deviation	$C_{расч.} \pm \sigma$ $C_{calc.} \pm \sigma$	Отклонение Deviation
	мкг/мл µg/ml	%	мкг/мл µg/ml	%	мкг/мл µg/ml	%
0,083	110	21,62	123,42	15,87	188,76	19,24
0,167	90,42	20,11	102,96	13,66	151,58	17,08
0,5	45,32	12,44	54,34	6,26	73,26	2,694
0,75	30,14	9,18	36,96	8,94	49,28	5,38
1	22,22	13,19	27,28	11,10	37,29	7,17
2	12,43	7,48	15,18	9,54	22,66	2,48
4	8,03	16,61	10,01	19,60	14,85	16,84
8	3,74	8,93	4,84	11,47	6,93	0,512

Таблица 5. Результаты фармакокинетических параметров после однократного и многократного введения (n = 6; M ± σ)

Table 5. Results of pharmacokinetic parameters after single and multiple injection (n = 6; M ± σ)

Параметр Parameter	Единица измерения Unit	Доза 24 мг/кг The dose is 24 mg/kg	Доза 30 мг/кг The dose is 30 mg/kg	Доза 42 мг/кг The dose is 42 mg/kg
α	1/ч 1/h	3,19 ± 0,55	2,75 ± 0,66	3,08 ± 0,88
β	1/ч 1/h	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,03
A	мкг/мл μg/ml	120,78 ± 24,53	128,15 ± 39,82	205,59 ± 49,5
B	мкг/мл μg/ml	17,49 ± 4,07	20,35 ± 1,1	32,45 ± 5,06
t _{1/2β}	ч h	3,96 ± 1,21	3,85 ± 0,22	3,74 ± 0,66
t _{1/2α}	ч h	0,22 ± 0,04	0,26 ± 0,05	0,24 ± 0,05
T _{max}	ч h	0,99 ± 0,11	1,10 ± 0,11	0,99 ± 0,11
k ₂₁	1/ч 1/h	0,55 ± 0,11	0,55 ± 0,22	0,55 ± 0,11
k ₁₂	1/ч 1/h	1,76 ± 0,44	1,43 ± 0,44	1,65 ± 0,66
k _{el}	1/ч 1/h	1,10 ± 0,11	0,88 ± 0,11	0,99 ± 0,22
V ₁	мл/кг ml/kg	177,98 ± 28,38	218,57 ± 65,12	183,15 ± 33,66
V _{ss}	мл/кг ml/kg	753,83 ± 200,31	757,68 ± 175,45	692,12 ± 69,85
V _{area}	мл/кг ml/kg	1049,29 ± 264,44	1073,71 ± 118,8	1030,15 ± 167,97
V _{extrap}	мл/кг ml/kg	1462,23 ± 410,08	1476,97 ± 77,22	1328,03 ± 210,32
CI	мл/(кг · ч) ml/(kg · h)	186,67 ± 9,46	192,06 ± 22,44	193,27 ± 5,83
AUC _{0-∞}	мкг·ч/мл μg · h/ml	128,92 ± 6,93	158,29 ± 18,48	217,47 ± 6,49
AUMC _{0-∞}	мкг · ч ² /мл μg · h ² /ml	562,10 ± 197,23	686,07 ± 90,09	873,84 ± 105,71
MRT	ч h	4,29 ± 1,21	4,40 ± 0,55	3,96 ± 0,44

дения изменялись в интервале от 3,74 до 3,96 ч. Предел обнаружения не был достигнут через 8 ч после введения, концентрация в последней временной точке в среднем изменялась от 4,11 ± 0,46 до 6,87 ± 0,32 мкг/мл соответственно. Значения для AUC_{0-∞} составили 128,92 ± 6,93, 158,29 ± 18,48 и 217,47 ± 6,49 мкг · ч/мл по мере увеличения дозы. Среднее время удерживания вещества в организме кроликов составило в среднем 4,2 ч, статистически значимых (H = 1,82, p = 0,40) различий между дозами для данного параметра не обнаружено. Стационарный объем распределения составил для доз 24, 30 и 42 мг/кг 753,83 ± 200,31, 757,68 ± 175,45 и 692,12 ± 69,85 мл/кг соответственно. Полученные значения стационарно-

го объема распределения в 4 раза превышают значение объема распределения в центральной камере и в 1,3 раза превышают значение общего объема воды в организме кроликов (583,3 мл/кг), что свидетельствует об экстенсивном связывании с белками тканей в периферической камере.

Сравнительный анализ фармакокинетических параметров трех исследуемых доз показал инвариантность параметров относительно дозы и отсутствие статистически значимых (H = 0,98, p = 0,62) различий в значениях AUC_{0-∞}, нормированных относительно дозы, следовательно, можно сделать вывод о линейном характере фармакокинетики в диапазоне исследуемых доз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена фармакокинетика нового лекарственного средства $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан *Acorus calamus* L. после однократного введения доз 120 мг/кг крысам и 24, 30, 42 мг/кг кроликам. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме кролика составило $1,0 \pm 0,21$ ч, время полувыведения $T_{1/2} - 0,7 \pm 0,15$ ч. Среднее время пребывания лекарственного средства в организме крысы составило 1,16 ч, время полувыведения $T_{1/2} - 0,80$ ч.

Результаты изучения фармакокинетике после однократного введения в дозах 24, 30 и 42 мг/кг показали, что кинетика элиминации имеет двухфазный характер, среднее время удерживания вещества в организме кроликов составило 4,2 ч, период полувыведения – 3,85 ч. Значение стационарного объема распределения свидетельствует о связывании его с белками тканей в периферической камере.

ЛИТЕРАТУРА

- Гурьев А. М., Белоусов М. В., Юсубов М. С., Ахмеджанов Р. Р., Зуева Е. П., Лопатина К. А. Исследование острой токсичности комплекса водорастворимых полисахаридов корневищ аира болотного (*Acorus calamus* L.). *Бюллетень сибирской медицины*. 2010;9(1):36–39. DOI: 10.20538/1682-0363-2010-1-36-39.
- Лопатина К. А., Разина Т. Г., Зуева Е. П., Крылова С. Г., Гурьев А. М., Амосова Е. Н., Рыбалкина О. Ю., Сафонова Е. А., Ефимова Л. А., Белоусов М. В. Доклиническое исследование лекарственной формы $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана из корневищ аира болотного *Acorus calamus* L. в онкологическом эксперименте. *Сибирский онкологический журнал*. 2015;1:59–63.
- Лопатина К. А., Гурьев А. М., Разина Т. Г., Амосова Е. Н., Крылова С. Г., Шилова Н. В., Зуева Е. П. Действие водорастворимых полисахаридов корневищ аира болотного на функциональную активность клеток лимфоузлов в условиях цитостатической терапии перививаемой опухоли. *Сибирский онкологический журнал*. 2006;3(19):59–63.
- Сафонова Е. А., Гурьев А. М., Разина Т. Г., Зуева Е. П., Ефимова Л. А., Лопатина К. А. Повышение эффективности химиотерапии с помощью фармакологически активных фракций, выделенных из полисахаридного комплекса аира болотного (*Acorus calamus* L.). *Российский биотерапевтический журнал*. 2012;11(4):55–58.
- Mugale M. N., Dev K., More B. S., Mishra V. S., Washimkar K. R., Singh K., Maurya R., Kumar Rath S., Chattopadhyay D., Chattopadhyay N. A Comprehensive Review on Preclinical Safety and Toxicity of Medicinal Plants. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*. 2024;4(1):100129. DOI: 10.1016/j.ccmp.2024.100129.
- Namdari R., Jones K., Chuang S. S., Van Cruchten S., Dincker Z., Downes N., Mikkelsen L. F., Harding J., Jäckel S., Jacobsen B., Kinyamu-Akunda J., Lortie A., Mhedhbi S., Mohr S., Schmitt M. W., Prior H. Species selection for nonclinical safety assessment of drug candidates: Examples of current industry practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105029. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105029.
- Гурьев А. М., Белоусов М. В., Ахмеджанов Р. Р., Юсубов М. С., Чурин А. А., Карпова Г. В. Исследование влияния длительного введения водорастворимых полисахаридов аира болотного (*Acorus calamus* L.) на функциональные показатели лабораторных животных. *Бюллетень сибирской медицины*. 2010;9(6):18–23. DOI: 10.20538/1682-0363-2010-6-18-23.
- Nesterkina M., Bilokon S., Aliksieieva T., Kravchenko I., Hirsch A. K. H. Genotoxic and mutational potential of monocyclic terpenoids (carvacrol, carvone and thymol) in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Reports*. 2023;10:327–333. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.02.009.
- De Oliveira Dos Santos A. M., Duarte A. E., Costa A. R., da Silva A. A., Rohde C., Silva D. G., de Amorim É. M., da Cruz Santos M. H., Pereira M. G., Deprá M., de Santana S. L., da Silva Valente V. L., Teixeira C. S. Canavalia ensiformis lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;222(B):2823–2832. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061.
- Неупокоева О. В., Лопатина К. А., Воронова О. Л., Сафонова Е. А., Зуева Е. П., Чурин А. А. Изучение мутагенных свойств $\alpha(1,2)$ -1-рамно- $\alpha(1,4)$ -d-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015;(2):22–23.
- Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2013. 944 с.
- Мирошниченко И. И., Кравцова О. Ю. Организация фармакокинетических исследований. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2021;3:12–19. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19.
- Wu W., Li K., Zhao C., Ran X., Zhang Y., Zhang T. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of luteolin, resveratrol and their metabolites in rat plasma and its application to pharmacokinetic interaction studies. *Journal of Chromatography B*. 2022;1191:123118. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123118.
- Zhang R., Li P., Zhou J., Guo P., Liu Y., Shi S. A novel, simple and reliable method for the determination of hydronidone and its metabolites M3 and M4 in human plasma and urine by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in health Chinese subjects. *Analytical Biochemistry*. 2022;655:114842. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114842.
- Ligacheva A. A., Danilets M. G., Trofimova E. S. T., Shershtoboev E. Yu., Zhdanov V. V., Guriev A. M., Belousov M. V., Yusubov M. S., Korzh A. P., Krivoshechekov S. V., Dygai A. M. Effects of Water-Soluble Polysaccharides with Different Chemical Structure, Isolated from *Acorus calamus* L. and *Trifolium pratense* L., on Nitric Oxide Production: A Screening Study. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;160(3):330–335. DOI: 10.1007/s10517-016-3163-2.
- Bartella L., Bouza M., Rocío-Bautista P., Di Donna L., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. Direct wine profiling by mass spectrometry (MS): A comparison of different ambient MS approaches. *Microchemical Journal*. 2022;179:107479. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107479.
- Moreira M., Guido L., Cruz J., Barros A. Determination of galacturonic acid content in pectin from fruit juices by liquid chromatographydiode array detection-electrospray

- ionization tandem mass spectrometry. *Open Chemistry*. 2010;8(6):1236–1243. DOI: 10.2478/s11532-010-0101-4.
18. Fan B., Wei G., Gan X., Li T., Qu Z., Xu S., Liu C., Qian C. Study on the varied content of Polygonatum cyrtone-ma polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics. *Microchemical Journal*. 2020;159:105352. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105352.
19. Гугля Е. Б. Применение жидкостной хромато-масс-спектрометрии в доклинических исследованиях лекарственных веществ. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2014;1:65–71.
20. Fan B., Li T., Song X., Wu C., Qian C. A rapid, accurate and sensitive method for determination of monosaccharides in different varieties of *Osmanthus fragrans* Lour by pre-column derivatization with HPLC-MS/MS. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;125:221–231. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.033.
21. Fan B., Wei G., Gan X., Li T., Qu Z., Xu S., Liu C., Qian C. Study on the varied content of Polygonatum cyrtone-ma polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics. *Microchemical Journal*. 2020;159:105352. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105352.
22. Ковалёв Г. И., Золотарёв Ю. А., Дадаян А. К., Шрам С. И., Абдуллина А. А., Васильева Е. В., Колыванов Г. Б., Жердев В. П. Изучение фармакокинетики [³H]-циклопролил-глицина в крови крыс. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2018;3:48–56. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10024.
23. Мирошниченко И. И. Основы фармакокинетики. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2002. 192 с.
24. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2010;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007.
25. Лакин Г. Ф. Биометрия. 4-е издание. М.: Высшая школа; 1990. 352 с.
- des complex *Acorus calamus* L. *Russian Journal of Biotherapy*. 2012;11(4):55–58. (In Russ.)
5. Mugale M. N., Dev K., More B. S., Mishra V. S., Washimkar K. R., Singh K., Maurya R., Kumar Rath S., Chattopadhyay D., Chattopadhyay N. A Comprehensive Review on Preclinical Safety and Toxicity of Medicinal Plants. *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*. 2024;4(1):100129. DOI: 10.1016/j.ccmp.2024.100129.
6. Namdari R., Jones K., Chuang S. S., Van Cruchten S., Dincer Z., Downes N., Mikkelsen L. F., Harding J., Jäckel S., Jacobsen B., Kinyamu-Akunda J., Lortie A., Mhedhbi S., Mohr S., Schmitt M. W., Prior H. Species selection for nonclinical safety assessment of drug candidates: Examples of current industry practice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105029. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105029.
7. Guriev A. M., Belousov M. V., Akhmedzhanov R. R., Yusubov M. S., Churin A. A., Karpova G. V. An investigation of the introduction of water-soluble polysaccharides calamus root (*Acorus calamus* L.) effect on the experimental animals functions. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2010;9(6):18–23. (In Russ.) DOI: 10.20538/1682-0363-2010-6-18-23.
8. Nesterkina M., Bilokon S., Aliksieieva T., Kravchenko I., Hirsch A. K. H. Genotoxic and mutational potential of monocyclic terpenoids (carvacrol, carvone and thymol) in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Reports*. 2023;10:327–333. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.02.009.
9. De Oliveira Dos Santos A. M., Duarte A. E., Costa A. R., da Silva A. A., Rohde C., Silva D. G., de Amorim É. M., da Cruz Santos M. H., Pereira M. G., Deprá M., de Santana S. L., da Silva Valente V. L., Teixeira C. S. Canavalia ensiformis lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;222(B):2823–2832. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061.
10. Neupokoeva O. V., Lopatina K. A., Voronova O. L., Safonova E. A., Zueva E. P., Churin A. A. Mutagenic characteristics research $\alpha(1,2)$ -1-ramno- $\alpha(1,4)$ -d-galactopiranosiluronan *Acorus calamus* L. *Pacific Medical Journal*. 2015;(2):22–23. (In Russ.)
11. Mironov A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Moscow: Grif i K; 2013. 944 p. (In Russ.)
12. Miroshnichenko I. I., Kravtsova O. Yu. Organizing of pharmacokinetic investigations. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2021;(3):12–19. (In Russ.) DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19.
13. Wu W., Li K., Zhao C., Ran X., Zhang Y., Zhang T. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of luteolin, resveratrol and their metabolites in rat plasma and its application to pharmacokinetic interaction studies. *Journal of Chromatography B*. 2022;1191:123118. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123118.
14. Zhang R., Li P., Zhou J., Guo P., Liu Y., Shi S. A novel, simple and reliable method for the determination of hydronidone and its metabolites M3 and M4 in human plasma and urine by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in health Chinese subjects. *Analytical Biochemistry*. 2022;655:114842. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114842.

15. Ligacheva A. A., Danilets M. G., Trofimova E. S. T., Shershtoboev E. Yu., Zhdanov V. V., Guriev A. M., Belousov M. V., Yusubov M. S., Korzh A. P., Krivoshchekov S. V., Dygai A. M. Effects of Water-Soluble Polysaccharides with Different Chemical Structure, Isolated from *Acorus calamus* L. and *Trifolium pratense* L., on Nitric Oxide Production: A Screening Study. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;160(3):330–335. DOI: 10.1007/s10517-016-3163-2.
16. Bartella L., Bouza M., Rocío-Bautista P., Di Donna L., García-Reyes J. F., Molina-Díaz A. Direct wine profiling by mass spectrometry (MS): A comparison of different ambient MS approaches. *Microchemical Journal*. 2022;179:107479. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107479.
17. Moreira M., Guido L., Cruz J., Barros A. Determination of galacturonic acid content in pectin from fruit juices by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Open Chemistry*. 2010;8(6):1236–1243. DOI: 10.2478/s11532-010-0101-4.
18. Fan B., Wei G., Gan X., Li T., Qu Z., Xu S., Liu C., Qian C. Study on the varied content of Polygonatum cyrtone-ma polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics. *Microchemical Journal*. 2020;159:105352. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105352.
19. Guglya E. B. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry application in drug discovery and preclinical study. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2014;1:65–71. (In Russ.)
20. Fan B., Li T., Song X., Wu C., Qian C. A rapid, accurate and sensitive method for determination of monosaccharides in different varieties of *Osmanthus fragrans* Lour by pre-column derivatization with HPLC-MS/MS. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;125:221–231. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.033.
21. Fan B., Wei G., Gan X., Li T., Qu Z., Xu S., Liu C., Qian C. Study on the varied content of Polygonatum cyrtone-ma polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics. *Microchemical Journal*. 2020;159:105352. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105352.
22. Kovalev G. I., Zolotarev Yu. A., Dadayan A. K., Shram S. I., Abdullina A. A., Vasileva E. V., Kolyvanov G. B., Zherdev V. P. The Study of [³H]-Cyclopropylglycine Pharmacokinetics in Rat Blood. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2018;(3):48–56. (In Russ.) DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10024.
23. Miroshnichenko I. I. Fundamentals of pharmacokinetics. Moscow: GEOTAR-Media; 2002. 192 p. (In Russ.)
24. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2010;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007.
25. Lakin G. F. Biometrics. 4th edition. Moscow: Vysshaya shkola. 1990. 352 p. (In Russ.)



The effect of the keto diet on lipid profile with type two diabetic patients

Fadwa Ghassan✉, Ateka Mohammed, Zainab Kazim

Clinical pharmacy department. Pharmacy college. Catholic University of Erbil. Erbil, Iraq

✉ **Corresponding author:** Fadwa Ghassan. **E-mail:** fadwa.ghassan@cue.edu.krd

ORCID: Fadwa Ghassan – <https://orcid.org/0000-0002-6770-4964>;
Ateka Mohammed – <https://orcid.org/0009-0006-9347-2729>;
Zainab Kazim – <https://orcid.org/0009-0003-0810-084X>

Received: 09.05.2024

Accepted: 29.10.2024

Published: 01.11.2024

Abstract

Introduction. In the developed world, among the main causes of disease and death is type 2 diabetes. It is a significant public health issue with rising prevalence, with more than 380 million patients estimated to be affected by 2025.

Aim. To evaluate the effect of ketogenic diets on glycemic control in patients with type II DM in Kirkuk and Mosul provinces.

Materials and methods. Patients with T2DM in both Mosul and Kirkuk cities were enrolled in this study to evaluate the effect of keto diet on HbA1c level and Lipid profile variations between 1/9/2022 to 1/4/2023.

Results and discussion. This study shows that the distributions of patients according to age and gender there was about 43.3 % female and 56.7 % male and the age variations, female with age above 56 years old was 30 % while male 60.7 %. A significant p value was shown in HbA1C variations before and after keto diet (0.0001), also in lipid profile of a significant p value before and after keto diet (0.001) regarding total Glyceride a significant p value highly was (0.002). Due to the large particle size of LDL-C, it has been hypothesized that this elevation in LDL-C would not likely cause cardiovascular problems. For individuals with type 2 diabetes, the low-calorie-ketogenic VLCK diet (<50 g of carbohydrates per day) is a safe, well-tolerated, and recognized medical nutritional therapy option when used in conjunction with an interventional weight loss program that offers support for lifestyle and behavioral modification over a 4-month period.

Conclusion. Diabetic and ketogenic diet there is a good clear relationship regarding the HbA1c and lipid profile. Further studies are required for larger numbers of patients and longer duration follow up.

Keywords: T2DM, VLCK, HbA1c, LDL-C

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. Fadwa Ghassan – study conception and design. Ateka Mohammed, Zainab Kazim – data collection. Fadwa Ghassan, Ateka Mohammed, Zainab Kazim – analysis and interpretation of results. Fadwa Ghassan – draft manuscript preparation. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

For citation: Ghassan F., Mohammed A., Kazim Z. The effect of the keto diet on lipid profile with type two diabetic patients. *Drug development & registration*. 2024;13(4):202–211. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1820>

Влияние кетогенной диеты на липидный профиль у пациентов с сахарным диабетом второго типа

Фадва Гассан✉, Атека Мохаммед, Зейнаб Казим

¹ Эрбильский Католический университет. Фармацевтический колледж. Отделение клинической фармации. Ирак, г. Эрбиль

✉ **Контактное лицо:** Фадва Гассан. **E-mail:** fadwa.ghassan@cue.edu.krd

ORCID: Fadwa Ghassan – <https://orcid.org/0000-0002-6770-4964>;
Атека Мохаммед – <https://orcid.org/0009-0006-9347-2729>;
Зейнаб Казим – <https://orcid.org/0009-0003-0810-084X>.

Статья поступила: 09.05.2024

Статья принята в печать: 29.10.2024

Статья опубликована: 01.11.2024

© Ghassan F., Mohammed A., Kazim Z., 2024

© Гассан Ф., Мохаммед А., Казим З., 2024

Резюме

Введение. Сахарный диабет 2 типа (СД2) входит в число наиболее распространенных заболеваний и основных причин смертности среди населения развитых стран. Это серьезная проблема общественного здравоохранения, и значимость ее растет: согласно оценкам, к 2025 году количество пациентов, страдающих этим заболеванием, превысит 380 миллионов.

Цель. Оценка влияния кетогенных диет на гликемический контроль пациентов с СД 2 типа в провинциях Киркук и Мосул.

Материалы и методы. С 01.09.2022 г. по 01.04.2023 г. в городах Мосул и Киркук проводилось исследование с целью оценки влияния кетогенной диеты (кетодиеты) на изменение уровня HbA1c и липидного профиля у пациентов с СД2.

Результаты и обсуждение. Исследование выявило следующее распределение пациентов по полу и возрасту: пациенты женского пола составили 46,3 %, мужского – 56,7 % от общего количества пациентов, при этом доля пациентов в возрасте старше 56 лет составила 30 % среди женщин и 60,7 % среди мужчин. *P*-значение в оценке изменений уровня HbA1c до и после применения кетодиеты оказалось существенным (0.0001), так же как и в оценке изменений липидного профиля до и после проведения кетодиеты (0.001); в отношении общего уровня глицеридов *p*-значение также было существенным и достигало величины 0.002. Принимая во внимание большие размеры частиц ЛПНП, нами была выдвинута гипотеза о том, что возникновение кардиоваскулярных проблем вследствие повышения уровня ХС ЛПНП маловероятно. Для людей с диабетом второго типа кетогенная диета с очень низким содержанием углеводов (VLCKD) (менее 50 г в день) является безопасным, легко переносимым и широко признанным видом диетотерапии, помогающим изменить образ жизни и поведенческие привычки в течение четырех месяцев при применении в сочетании с интервенционной программой по снижению веса.

Заключение. Прослеживается хорошо заметная связь между кетогенной диетой и такими показателями больных сахарным диабетом, как уровень HbA1c и липидный профиль. Предполагается проведение дальнейших исследований с увеличением числа пациентов и продолжительности наблюдения.

Ключевые слова: СД2, VLCKD, HbA1c, ХС ЛПНП

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

Вклад авторов. Фадва Гассан – концепция и дизайн исследования. Атека Мохаммед, Зайнаб Казим – сбор данных. Фадва Гассан, Атека Мохаммед, Зайнаб Казим – анализ и интерпретация результатов. Фадва Гассан – подготовка черновика рукописи. Все авторы рассмотрели результаты и одобрили окончательную версию рукописи.

Для цитирования: Гассан Ф., Мохаммед А., Казим З. Влияние кетогенной диеты на липидный профиль у пациентов с сахарным диабетом второго типа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):202–211. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1820>

INTRODUCTION

In the developed world, type 2 diabetes mellitus is one of the main causes of diseases and death. By 2025, it is predicted that over 380 million people would have contracted the serious public health concern, which is becoming increasingly common [1]. Diabetes is a complicated chronic illness that causes hyperglycemia due to insufficient glucoregulatory control [2].

Individuals with type 2 diabetes are more likely to develop heart disease, diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy, as well as have a shorter life expectancy than people without the condition [3]. The increasing worldwide impact of diabetes on individuals, families, and nations is evident from the data and statistics. IDF stands for the International Diabetes Federation. Based on data from Diabetes Atlas (2021), 10.5 % of adults aged 20 to 79 have diabetes, with nearly half of them being uninformed that they have the illness. The IDF predicts that 783 million adults, or 1 in 8 of them,

would have diabetes by 2045 – a 46 % rise from current estimates.

The ultimate objective of managing type 2 diabetes is keeping a patient's blood sugar within the target range, which is a glycated haemoglobin (HbA1c) of less than 7 % (53 mmol/mol)¹, as advised by clinical guidelines, or even to assist in reaching drug-free remission [4, 5]. By doing this, the risk of micro- and macrovascular complications related to diabetes is reduced [6].

After the DiRECT trial's publication [7, 8]. Low-carbohydrate or low-energy diets were the methods employed in these programs. Other food options must be provided, though, since not everyone wants to adhere to such a schedule.

A hypocaloric diet and increased physical activity, along with behavioral modifications, are the cornerstones of intensive lifestyle management for individuals

¹Type 2 diabetes in adults: management Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng28>. Accessed: 09.05.2024.

duals with type 2 diabetes (T2D). The ultimate goal is to reduce body weight by at least 15 kg, as this is associated with improved glucoregulatory control [9]. A growing number of people are using very low carb diets, or ketogenic diets, to improve their glucose control and reach remission. These diets can be used as an adjuvant or alternative therapy option to other dietary approaches and anti-diabetic medications [10].

As a result, substantial research is underway to find drugs and complementary treatments to lessen the disease's harmful impact on individuals [11]. The ketogenic diet is one of the therapy strategies being researched. A diet that is high in fat and low in carbohydrates is referred to be "ketogenic"¹. Popular ketogenic publications typically recommend consuming 70–80 % fat from total calories, 5–10 % carbs, and 10–20 % protein. Compared to other low-carb, high-protein diets, the protein intake on the ketogenic diet is kept reasonable since consuming too much protein can prevent ketosis. A ketogenic diet needs to contain adequate protein to retain lean body mass, including muscle, while still inducing ketosis since the amino acids in protein can be converted to glucose [12].

The basis of the ketogenic diet for weight loss is the theory that, by limiting the body of glucose – which is primarily produced by eating carbohydrates – an alternative fuel termed ketones – derived from stored fat – is produced. Hence, the word "keto"-genic. The brain requires the highest amount of glucose in a steady supply – roughly 120 grams per day – because it is unable to store it. When fasting or consuming minimal carbohydrates, the body first releases stored glucose from the liver and then momentarily breaks down muscle [13].

The body will begin using fat as its primary fuel if this continues for three to four days and depletes its supply of stored glucose. Blood levels of an insulin-like hormone will also fall during this time. The liver may use fat to make ketone bodies, which it can use when glucose is not available [14]. Ketone bodies accumulate in the blood and cause ketosis. In healthful individuals, mild ketosis occurs spontaneously after periods of fasting (e.g., sleeping through the night) and intense physical activity. The ketogenic diet's proponents claim that while the brain will use ketones as fuel, healthy people usually create enough insulin to avoid too much ketones from accumulating. Blood ketone levels shouldn't rise to dangerous levels (referred to as "ketoacidosis") if the diet is properly maintained [15].

Multiple factors, such as body fat percentage and resting metabolic rate, influence the duration of ketosis and the quantity of ketone bodies that accumulate in the blood.

In the short term, the ketogenic diet has been demonstrated to result in positive metabolic alterations. In addition to the reduction of body weight, obesity-related health markers have improved, including insulin resistance, hypertension, elevated cholesterol, and triglycerides² [15]. Diabetes type 2 is becoming more and more common, and low-carb diets like the ketogenic diet are becoming more and more popular [15, 16].

Excessive restriction in carbohydrates can cause a variety of symptoms, including brain fog, constipation, migraines, low mood, hunger, and exhaustion. These symptoms might persist for several days or weeks. Long-term ketogenic diets side effects have been related to an increased risk of kidney stones and osteoporosis, as well as greater uric acid levels in the bloodstream (a risk factor for gout). It is crucial to include a daily intake of meats, fish, vegetables, fruits, nuts, and seeds in addition to high-fat foods to prevent potential nutrient deficiencies. This will help you get enough fiber, B vitamins, and minerals (iron, magnesium, zinc) [1].

This diet has been used in the past to treat children with refractory seizures. These days, a wide range of illnesses are being researched, including obesity, diabetes, Alzheimer's, Parkinson's, and cancer [3].

Prior to the discovery of insulin, ketogenic diets were a cornerstone of diabetic treatment for both type 1 and type 2 diabetes, with a long history of success in treating a variety of metabolic disorders, including drug-resistant epilepsy [17, 18]. But as a potential treatment option, they have only lately been added to the American Diabetes Association Guidelines for the first time [19]. Even so, there is still a great deal of debate over their application in clinical settings and their suitability for diabetics.

The American Diabetes Association (ADA) and Diabetes UK recently released general guidelines for managing diabetes in people with type 2 diabetes (T2D), with the primary goal being weight loss. This was necessary because there were no evidence-based dietary guidelines for managing diabetes. Interestingly, while weight loss in these cohorts improves glycaemic management, this advice was equally applicable to the 10 % of T2D individuals who are thought to be at a healthy weight (BMI 18.5–24.9 kg/m²) in people with T1D and gestational diabetes [20]. A agreement regarding the optimal dietary distribution for individuals with diabetes has not yet been reached [19], which has caused uncertainty among healthcare professionals when it comes to "prescribing" a certain dietary type or pattern as a therapeutic method for diabetes [21].

In 2021, the Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) examined the available research on low-carb diets for individuals with type 2 diabetes [22]. A lower

¹ Diet Review: Ketogenic Diet for Weight Loss. Available at: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-weight/diet-reviews/ketogenic-diet>. Accessed: 09.05.2024.

² Diet Review: Ketogenic Diet for Weight Loss. Available at: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-weight/diet-reviews/ketogenic-diet>. Accessed: 09.05.2024.

carbohydrate diet clearly has positive short-term metabolic effects, but due to a lack of comprehensive long-term data, SACN reported inconsistent and inconclusive results for long-term therapeutic benefits. As a result, SACN concluded that a low-carb diet is neither superior nor inferior to other dietary patterns.

Rapid and effective weight loss is the most significant predictor of T2D remission, and this helps explain some of the therapeutic advantages of ketogenic diets, even though the exact physiological mechanisms are unknown [23]. The lowered metabolic adaptations that follow weight loss are proposed by proponents as the possible metabolic benefit of ketogenic diets in causing more significant and long-lasting weight loss than other traditional diets [24]. Conversely, studies on ketogenic diets have shown that they increase anorexigenic hormones such glucagon-like peptide 1 [25, 26], leptin [27], and cholecystokinin [28], and suppress the hormone that causes hunger, ghrelin [29]. As a result, participants experience increased satiety [25] and decreased appetite [29]. Some speculate that the anorexigenic properties of ketone bodies themselves may also be the cause of the greater efficacy. Supporting data indicates that exogenous ketone ester drink consumption, together with elevated blood ketone levels, led to larger decreases in hunger and ghrelin than did drinking of a dextrose drink [30]. Despite frequently better short-term results, there is now no convincing evidence that weight loss with this diet approach is superior over the long run¹.

Patients with diabetes benefit greatly from the ketogenic diet, which results in reduced body weight, better fasting glucose and insulin, lower cholesterol, and the elimination or reduction of diabetic drugs. Reduced consumption of carbohydrates is assumed to be the cause of this, as it lowers blood glucose and shifts energy metabolism from glucose to ketone bodies. Insulin resistance decreases as a result of this drop in blood glucose [11].

Numerous studies have demonstrated the ability of the ketogenic diet to aid in weight loss. Although both diets led to significant fat loss, patients on the ketogenic diet showed larger increases in high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and lower serum triglyceride levels than those on the low-fat diet.

This result highlights the need for additional research into the benefits of the ketogenic diet and demonstrates that it can be used as a treatment for diabetes and obesity². The impact of carbohydrate restriction on type 2 diabetes was reexamined in four studies that were published between 2003 and 2005. A low-carb diet was

found to improve hemoglobin HbA1C more than a low-fat, calorie-restricted diet during a one-year period in the first experiment, which included 54 diabetic patients out of 132 total participants [31, 12]. A 5-week crossover feeding study comparing diets was conducted with eight individuals who had type 2 diabetes as part of the second experiment. More improvement in glycohemoglobin levels was observed in persons following a low-carb diet than in those following an equicaloric low-fat diet [13].

Ten type 2 diabetes patients were included in an inpatient feeding regimen for the third study. In just 14 days, the percentage of hemoglobin A1c decreased from 7.3 percent to 6.8 % [14].

Ten type 2 diabetes patients were included in an inpatient feeding regimen for the third study. In just 14 days, the percentage of hemoglobin A1c decreased from 7.3 percent to 6.8 %. In the third research, ten patients with type 2 diabetes were placed on an inpatient feeding regimen. The hemoglobin A1c level dropped from 7.3 to 6.8 % in just 14 days [14].

Subsequently, Feinman and associates provided coherent data endorsing the low-carb diet as the primary treatment strategy for type II diabetes and as the most potent supplement to medication in type I diabetes [15]. In order to better understand the connection between type II diabetes and kidney disease (KD), Farés and his team employed systems biology techniques in 2010. They specifically developed and analyzed cell networks that represent the metabolic state. They found a strong connection between the major ketosis pathway and the insulin resistance pathway, which may account for the benefits shown in previous clinical trials³. Low-carbohydrate diets, which are the first line of treatment for type II diabetes in obese individuals, are a current source of worry when it comes to low-calorie-ketogenic (VLCK) diets [32].

The increasing popularity of the ketogenic diet has sparked questions regarding how it should be used in weight-loss regimens. Additionally, consuming a low-fat diet was found to raise levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and decrease levels of triglycerides and blood glucose [33].

There is less consistency in the effects of carbohydrate restriction and ketosis induction on total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) [34].

Only a small number of research, meanwhile, have examined their effect on cardiovascular risk factors [35, 36].

According to this study, the ketogenic diet causes a considerable decrease in serum triglycerides in persons with a normal lipid profile, a slight increase in total and LDL cholesterol, and a moderate increase in HDL

¹ Low-carb diets position statement for professionals. Available at: <https://www.diabetes.org.uk/professionals/position-statements-reports/food-nutrition-lifestyle/low-carb-diets-forpeople-with-diabetes>. Accessed: 09.05.2024.

² Diet Review: Ketogenic Diet for Weight Loss. Available at: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-weight/diet-reviews/ketogenic-diet/>. Accessed: 09.05.2024.

³ Diet Review: Ketogenic Diet for Weight Loss. Available at: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-weight/diet-reviews/ketogenic-diet/>. Accessed: 09.05.2024.

cholesterol. For every kilogram lost, triglycerides decrease by 0.015 mmol/L and HDL cholesterol increases by 0.009, per another study [37].

High fasting triglyceride levels have been linked to an increased risk of cardiovascular disease [38].

Conversely, a wealth of research indicates that a diet heavy in carbohydrates increases insulin resistance, decreases HDL cholesterol, and increases triglycerides [39, 40].

Triglyceride and HDL level changes were reversed when carbohydrates were substituted for saturated fat [41–43].

High blood cholesterol levels can lead to difficulties, thus people often try to cut down unsaturated fat and cholesterol from their diets. In this instance, it is reasonable to assume that the best course of action is to let the cells use extra fat for energy, as this lowers obesity. Eating a diet high in fat and limiting carbohydrates, which are typically used to meet the body's energy needs, can condition the cells for this type of metabolism. When compared to other diet regimens, numerous studies have decisively shown how beneficial the ketogenic diet is in helping obese patients lose weight [44, 45].

Aim of study: to evaluate the effect of ketogenic diets on glycemic control in patients with type II DM in Kirkuk and Mosul provinces.

METHODOLOGY

This research about a group of patients with DM T2 in two cities Kirkuk and Mosul. The patients include in research are More than 18 Patients have DM T2 Men and women between 1/9/2022 to 1/4/2023.

• The exclusion criteria:

1. Children.
2. Pregnant.
3. Patients with DM Type 1 and other complication.
4. Cancer patients.

RESULTS

This study shows that the distributions of patients according to age and gender there was about 43.3 % female and 56.7 % male and the age variations, female with age above 56 years old was 30 % while male 60.7 %, as shown in table 1.

Table 1. Distribution the sample according to gender and age

Gender	Age classes			Total
	25–40	41–55	56>	
Female	6.7 %	6.7 %	30.0 %	43.3 %
Male	3.3 %	16.7 %	36.7 %	56.7 %
Total	10.0 %	23.3 %	66.7 %	100.0 %

The distributions of patients according to gender and Keto durations, female percentage according to duration of keto was 90 % in 5–8 days, while male distribution according to duration classes was highest in

5–8 days (23.3) % and female only (20) %, the same percentage was shown when the duration above 8 for male very sustain percentage for female. Table 2 shows the effect of keto diet on HP1C, Lipid profile, and total glycerides variations in males.

Table 2. Effect of Keto diet on different markers in female (mean + SD)

	Mean	SD	t value	Sig.
HbA 1c before	6.19	1.18	2.98**	0.011
HbA 1c after	5.68	1.04		
Lipid before	205.59	35.57	2.79*	0.016
Lipid after	170.53	46.05		
TG before	181.88	85.62	1.69 ^{NS}	0.116
TG after	131.20	63.44		

A significant *p* value was shown in HP1C variations before and after keto diet (0.0001), also in lipid profile of a significant *p* value before and after keto diet (0.001) regarding total glyceride a significant *p* value highly was (0.002). A significant *p* value was shown in HP1C and lipid profile only after keto diet as shown in figure 1, A and B.

Table 3 showing the relationship between the gender and the biological markers as we can see there was no significant *p* value in both genders regarding HP1C and lipid profile and total glyceride.

Table 3. Comparing the traits decreasing % in both gender

	Gender	Mean, %	SD	t value	Sig.
HbA 1c	Male	12.75	9.17	1.20 ^{NS}	0.24
	Female	8.52	9.37		
Lipid	Male	11.17	12.65	0.69 ^{NS}	0.50
	Female	15.56	21.14		
TG	Male	20.41	36.73	0.47 ^{NS}	0.64
	Female	10.68	72.12		

Table 3 shows the improvement in HP1C and lipid profile and total glyceride according to age, also no significant *p* value was shown.

Table 4 shows the improvement in biological markers according to keto diet durations also no significant *p* value was shown.

Table 4. Improvement in the traits decreasing % in according to age

Age (year)	HbA 1c		Lipid		TG	
	Mean, %	SD	Mean, %	SD	Mean, %	SD
25–40	9.41	8.25	23.63	3.47	42.86	29.10
41–55	15.91	6.59	14.58	16.63	29.20	20.14
56>	8.24	10.06	11.94	17.18	5.40	60.69
Duncan test	NS		NS		NS	

Note. NS – refer to non-significant difference between groups.

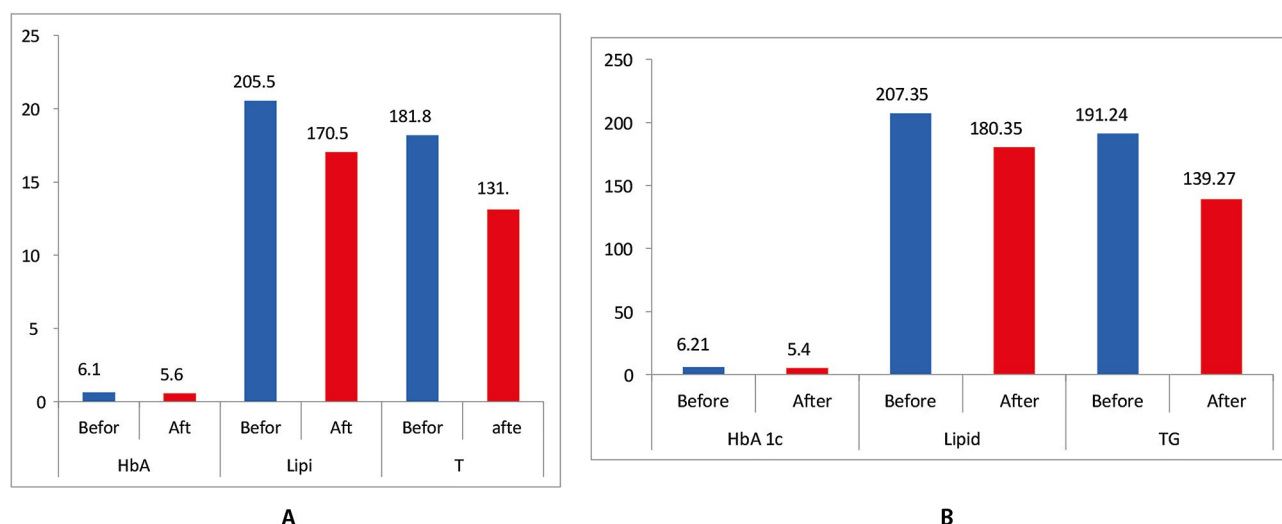


Figure 1. The relationship between HbA1c, Lipid Profile and Total Cholesterol before and after Keto diet

DISCUSSION

When comparing a ketogenic diet to the traditional "Plate Method", which is widely advised for the management of type 2 diabetes in those who are overweight, Saslow et al.'s small cohort ($n = 23$) randomised controlled trial from 2017 [46] offered supporting evidence. Those on a ketogenic diet experienced better weight loss and considerably reduced HbA1c levels after 32 weeks (less than 6.5 mmol/l for 55 % of participants). After completing a 12-month low-carb diet, 86 % of people with T2DM were able to cut back on or stop using insulin entirely, according to another study [47]. Long-term research on health outcomes comparing regular and ketogenic diets, however, is desperately needed. According to a recent systematic review and meta-analysis [48], individuals with type 2 diabetes benefit from low-carb and ketogenic diets when it comes to glucose control when compared to other diets. On the other hand, research indicates that ketogenic diets are far more effective in reducing HbA1c (-1.45 %) than low-carb diets (-0.27 %). The evaluation does not, however, consistently support the idea that ketogenic diets are better at reducing body weight than other diets; a pooled analysis found no significant difference in BMI reduction between ketogenic and control diets.

Studies show that 50 % of diabetics have high blood pressure, thus it's critical to draw attention to the ketogenic diet's additional benefits, which include lower blood pressure. But after a year, blood pressure did not alter, which could be related to the weight reduction plateau that occurs between 12 weeks and a year [49].

Significant improvements were observed in metabolic parameters, mental and physical functioning, and pain management in individuals with type 2 diabetes and obesity who were randomly assigned to either a conventional or an energy-restricted ketogenic diet for a duration of 12 weeks. The study indicated these be-

nefits [50, 51]. Because diabetes can have detrimental consequences on a patient's physical, social, and psychological well-being, which can all result in decreased self-care and consequent glycaemic control, health-related quality of life is highly important in managing diabetes [52].

In order to enhance glycemic control in a group of recently diagnosed type 2 diabetes participants, the goal of this manuscript is to report on the effectiveness of a short-term low-carbohydrate (LC) diet. The most significant finding was that in just ninety days, a low-carbohydrate ketogenic diet, with approximately 5 % of calories coming from carbohydrates, produced a significant drop in HbA1c from 8.9 %, which is the threshold associated with diabetes, to 5.6 %, the conventional level. In addition, other cardio-metabolic parameters such as blood pressure, triglycerides (TG), body weight, and BMI showed noteworthy changes as a consequence of the intervention. HDL ratio [53].

Our findings demonstrate that the low-calorie-ketogenic VLCK diet (<50 g of carbohydrates per day) is a safe, well-tolerated, and recognized medical nutritional therapy option for T2DM subjects when combined with lifestyle and behavioral modification support during a 4-month interventional weight loss program [53].

The main goal of the current study was to find out if a 3-week LCHF diet with >75 % fat would impair a healthy, young, normal-weight woman's lipid profile and reduce her ability to tolerate glucose. The study's second goal was to find out if an exercise session may mitigate any potential harm that an LCHF diet might do to one's ability to tolerate glucose [54].

After comparing the LC diet to an ER diet high in carbohydrates, we discovered that it was both acceptable and successful for short-term weight loss in Chinese women who were overweight or obese during the 12-week trial. Additionally, the HDL-cholesterol, to-

tal:HDL-cholesterol ratio, and TAG:HDL-cholesterol ratio showed more positive effects of the LC diet. There was similar adherence to both diets. It is the only feeding research that we are aware of that aims to ascertain how well Asian populations adhere to a low-carb diet and how it affects their ability to lose weight [55].

After just three weeks, KD lowers HbA1c, and the benefit appears to last for at least a year. This is connected to a decrease in drugs that lower blood sugar. A long-term diet appears to sustain the weight loss that was shown in a short amount of time. Sufficient assistance (psychosocial counseling, boosting good affect, and encouraging mindful eating) is required to produce a desired outcome and ensure compliance [56, 57].

Based on earlier studies, it is widely recognized that a ketogenic diet improves lipid profiles and lowers cardiovascular risk factors including hypertension. However, recent studies have also revealed elevated levels of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) as a result of this diet. Because of the enormous size of the LDL-C particles, it has been hypothesized that this elevation in LDL-C would not likely worsen cardiovascular problems. In this case report, we describe a patient who was on a ketogenic diet who experienced a sudden spike in LDL-C, which was quickly corrected [58, 59].

People who are overweight or obese, who make up the majority of persons with type 2 diabetes, have participated in numerous studies examining the use of ketogenic diets for the management of diabetes [28]. Research on their impact, however, is scarce in the 10–15 % of T2D patients with healthy BMIs (20–24.9 kg/m²) who may not necessarily benefit from weight loss interventions. Due to the fact that the ketogenic diet is usually a caloric deficit diet in comparison to the typical "western diet", this raises the fundamental question of whether ketogenic diets offer additional benefits beyond weight loss (and independent of other macronutrient changes) or whether greater weight loss is the attributing factor for glucoregulatory improvement. This question is raised frequently in the scientific literature [23].

It is debatable whether the ketogenic diet should be advised because people with diabetes are already substantially more likely to develop cardiovascular disease and because the long-term effects of increasing consumption of saturated fat in the diet are still mainly understood [60, 61]. The impact of dietary saturated fat on LDL cholesterol (LDLc) and its consequent negative impact as a cardiovascular disease risk factor are well-established by Mendelian randomization studies [62], notwithstanding the paucity of data focused on ketogenic diets. Additionally, prospective studies utilizing carbohydrate intake quartiles showed that the highest risk of cardiovascular disease (RR 1.13), cancer (RR 1.08) and total mortality (RR 1.22) was associated with people with the lowest carbohydrate intake [63]. Recommending that care be used when starting such diets. Nevertheless, contradictory research indicates that ketogenic diets can improve the ratio of HDL to trigly-

cerides in the blood. Interestingly, in individuals with obesity (BMI > 35 kg/m²), a 24-week ketogenic diet significantly decreased total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides while concurrently raising HDL cholesterol. These reductions occurred along with decreases in body weight and glycaemic levels [16].

Recommendations

To ensure optimal safety and proper management of any pharmacotherapies, it is imperative that patients with T2D who are taking medication first seek medical counsel for a personalized assessment prior to instituting any severe carbohydrate restricted diet. Nonetheless, it appears that carbohydrate restriction is safe for people using metformin, the most often recommended medicine [64].

CONCLUSION

Short-term metabolic benefits and weight loss are evident with ketogenic diets, and an increasing number of authoritative dietary guidelines are endorsing and highlighting these benefits. Likewise, our traditional recommendations lack long-term support because they are exceedingly expensive to sponsor and conduct. Long-term evaluation of the health effects of both traditional and ketogenic diets is clearly needed, although it is currently lacking. Notwithstanding, the sustenance of noteworthy weight reduction continues to be the primary catalyst for enhanced diabetic control, and medical practitioners need to recommend a nutritious eating regimen that personal adherence to is highest. It will be difficult to conduct clinical ketogenic diet implementation for the management of diabetes at the public health level due to the limiting issue of the lack of a clear definition of a ketogenic diet.

The following parameters were determined at the conclusion of this study:

1. An impressive decrease in HbA1c was observed in just 90 days, from a diabetic level (8.9 %) to the normal (5.6 %) on a low-carbohydrate ketogenic diet, wherein carbohydrates made up approximately 5 % of calories.
2. A substantial improvements across several cardio-metabolic parameters, including body weight, BMI, blood pressure, and the triglyceride (TG):HDL ratio.
3. Comparing the LC diet to an ER diet high in carbohydrates, Chinese women who were overweight or obese found it to be both acceptable and successful in helping them lose weight temporarily. Additionally, the HDL-cholesterol, total:HDL-cholesterol ratio, and TAG:HDL-cholesterol ratio showed more positive effects of the LC diet.

REFERENCES

1. Tahrani A. A., Piya M. K., Kennedy A., Barnett A. H. Glycaemic control in type 2 diabetes: targets and new therapies. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010;125(2):328–361. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.11.001.

2. Sapra A., Bhandari P. Diabetes mellitus. *Treasure Island: StatPearls*. 2022.
3. Roglic G. WHO Global report on diabetes: a summary. *International Journal of Noncommunicable Diseases*. 2016;1(1):3–8. DOI: 10.4103/2468-8827.184853.
4. Davies M. J., Aroda V. R., Collins B. S., Gabbay R. A., Green J., Maruthur N. M., Rosas S. E., Del Prato S., Mathieu C., Mingrone G., Rossing P., Tankova T., Tsapas A., Buse J. B. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) *Diabetes Care*. 2022;45(11):2753–2786. DOI: 10.2337/dci22-0034.
5. Riddle M. C., Cefalu W. T., Evans P. H., Gerstein H. C., Nauck M. A., Oh W. K., Rothberg A. E., le Roux C. W., Rubino F., Schauer P., Taylor R., Twenefour D. Consensus report: definition and interpretation of remission in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2021;44(10):2438–2444. DOI: 10.2337/dci21-0034.
6. Boye K. S., Thieu V. T., Lage M. J., Miller H., Paczkowski R. The association between sustained HbA1c control and long-term complications among individuals with type 2 diabetes: a retrospective study. *Advances in Therapy*. 2022;39:2208–2221. DOI: 10.1007/s12325-022-02106-4.
7. Taheri S., Zaghoul H., Chagoury O., Elhadad S., Ahmed S. H., El Khatib N., Amona R. A., El Nahas K., Suleiman N., Alnaama A., Al-Hamaq A., Charlson M., Wells M. T., Al-Abdulla S., Abou-Samra A. B. Effect of intensive lifestyle intervention on bodyweight and glycaemia in early type 2 diabetes (DIADeM-I): an open-label, parallel-group, randomised controlled trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2020;8(6):477–489. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30117-0.
8. Lean M. E. J., Leslie W. S., Barnes A. C., Brosnahan N., Thom G., McCombie L., Peters C., Zhyzhneuskaya S., Al-Mrabeh A., Hollingsworth K. G., Rodrigues A. M., Rehackova L., Adamson A. J., Sniehotta F. F., Mathers J. C., Ross H. M., McIlvenna Y., Welsh P., Kean S., Ford I., McConnellachie A., Messow C.-M., Sattar N., Taylor R. Durability of a primary care-led weight-management intervention for remission of type 2 diabetes: 2-year results of the DIRECT open-label, cluster-randomised trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2019;7:344–355. DOI: 10.1016/S2213-8587(19)30068-3.
9. Zhang Y., Pan X.-F., Chen J., Xia L., Cao A., Zhang Y., Wang J., Li H., Yang K., Guo K., He M., Pan A. Combined lifestyle factors and risk of incident type 2 diabetes and prognosis among individuals with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetologia*. 2020;63:21–33. DOI: 10.1007/s00125-019-04985-9.
10. Guess N. D. Could dietary modification independent of energy balance influence the underlying pathophysiology of type 2 diabetes? Implications for type 2 diabetes remission. *Diabetes Therapy*. 2022;13:603–617. DOI: 10.1007/s13300-022-01220-4.
11. Nyenwe E. A., Jerkins T. W., Umpierrez G. E., Kitabchi A. E. Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2011;60(1):1–23. DOI: 10.1016/j.metabol.2010.09.010.
12. Paoli A., Rubini A., Volek J. S., Grimaldi K. A. Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2013;67(8):789–796. DOI: 10.1038/ejcn.2013.116.
13. Paoli A. Ketogenic diet for obesity: friend or foe? *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014;11(2):2092–2107. DOI: 10.3390/ijerph110202092.
14. Schwingshackl L., Hoffmann G. Comparison of effects of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2013;113(12):1640–1661. DOI: 10.1016/j.jand.2013.07.010.
15. Gibson A. A., Seimon R. V., Lee C. M. Y., Ayre J., Franklin J., Markovic T. P., Caterson I. D., Sainsbury A. Do ketogenic diets really suppress appetite? A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. 2015;16(1):64–76. DOI: 10.1111/obr.12230.
16. Dashti H. M., Mathew T. C., Hussein T., Asfar S. K., Behbahani A., Khoursheed M. A., Al-Sayer H. M., Bo-Abbas Y. Y., Al-Zaid N. S. Long-term effects of a ketogenic diet in obese patients. *Experimental & Clinical Cardiology*. 2004;9(3):200–205.
17. Kossoff E. H., Zupec-Kania B. A., Rho J. M. Ketogenic diets: an update for child neurologists. *Journal of Child Neurology*. 2009;24:979–988. DOI: 10.1177/0883073809337162.
18. D'Andrea-Meira I., Romão T. T., Pires do Prado H. J., Kruger L. T., Paiva Pires M. E., da Conceição P. O. Ketogenic diet and epilepsy: what we know so far. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13:5. DOI: 10.3389/fnins.2019.00005.
19. Evert A. B., Dennison M., Gardner C. D., Garvey W. T., Lau K. H. K., MacLeod J., Mitri J., Pereira R. F., Rawlings K., Robinson S., Saslow L., Uelmen S., Urbanski P. B., Yancy W. S. Nutrition therapy for adults with diabetes or prediabetes: a consensus report. *Diabetes Care*. 2019;42(5):731–754. DOI: 10.2337/dci19-0014.
20. Taylor R., Holman R. R. Normal weight individuals who develop type 2 diabetes: the personal fat threshold. *Clinical Science*. 2015;128(7):405–410. DOI: 10.1042/CS20140553.
21. Kirkpatrick C. F., Bolick J. P., Kris-Etherton P. M., Sikand G., Aspry K. E., Soffer D. E., Willard K.-E., Maki K. C. Review of current evidence and clinical recommendations on the effects of low-carbohydrate and very-low-carbohydrate (including ketogenic) diets for the management of body weight and other cardiometabolic risk factors: a scientific statement from the National Lipid Association Nutrition and Lifestyle Task Force. *Journal of Clinical Lipidology*. 2019;13(5):689–711.e1. DOI: 10.1016/j.jacl.2019.08.003.
22. Singh M., Hung E. S., Cullum A., Allen R. E., Aggett P. J., Dyson P., Forouhi N. G., Greenwood D. C., Pryke R., Taylor R., Twenefour D., Waxman R., Young I. S. Lower carbohydrate diets for adults with type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*. 2022;39(3):e14674. DOI: 10.1111/dme.14674.
23. Brown A., McArdle P., Taplin J., Unwin D., Unwin J., Deakin T., Wheatley S., Murdoch C., Malhotra A., Mellor D. Dietary strategies for remission of type 2 diabetes: a narrative review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2022;35(1):165–178. DOI: 10.1111/jhn.12938.
24. Roekenes J., Martins C. Ketogenic diets and appetite regulation. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2021;24(4):359–363. DOI: 10.1097/MCO.0000000000000760.
25. Westerterp-Plantenga M. S., Lemmens S. G., Westerterp K. R. Dietary protein – its role in satiety, energetics, weight loss and health. *British Journal of Nutrition*. 2012;108(S2):S105–S112. DOI: 10.1017/S0007114512002589.
26. Nymo S., Coutinho S. R., Jørgensen J., Rehfeld J. F., Truby H., Kulseng B., Martins C. Timeline of changes in appetite during weight loss with a ketogenic diet. *International Journal of Obesity*. 2017;41:1224–1231. DOI: 10.1038/ijo.2017.96.
27. Lambrechts D. A. J. E., Brandt-Wouters E., Verschuure P., Vles H. S. H., Majoie M. J. M. A prospective study on changes in blood levels of cholecystokinin-8 and lep-

- tin in patients with refractory epilepsy treated with the ketogenic diet. *Epilepsy Research*. 2016;127:87–92. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2016.08.014.
28. Chearskul S., Delbridge E., Shulkes A., Proietto J., Kriketos A. Effect of weight loss and ketosis on postprandial cholecystokinin and free fatty acid concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008;87(5):1238–1246. DOI: 10.1093/ajcn/87.5.1238.
29. Marchiò M., Roli L., Lucchi C., Costa A.M., Borghi M., lughetti L., Trenti T., Guerra A., Biagini G. Ghrelin plasma levels after 1 year of ketogenic diet in children with refractory epilepsy. *Frontiers in Nutrition*. 2019;6:112. DOI: 10.3389/fnut.2019.00112.
30. Stubbs B.J., Cox P.J., Evans R.D., Cyranka M., Clarke K., de Wet H. A ketone ester drink lowers human ghrelin and appetite. *Obesity*. 2018;26(2):269–273. DOI: 10.1002/oby.22051.
31. Accurso A., Bernstein R.K., Dahlqvist A., Draznin B., Feinman R.D., Fine E.J., Gleed A., Jacobs D.B., Larson G., Lustig R.H., Manninen A.H., McFarlane S.I., Morrison K., Nielsen J.V., Ravnskov U., Roth K.S., Silvestre R., Sowers J.R., Sundberg R., Volek J.S., Westman E.C., Wood R.J., Wortman J., Vernon M.C. Dietary carbohydrate restriction in type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: time for a critical appraisal. *Nutrition & Metabolism*. 2008;5:9. DOI: 10.1186/1743-7075-5-9.
32. Westman E.C., Tondt J., Maguire E., Yancy W.S.Jr. Implementing a low-carbohydrate, ketogenic diet to manage type 2 diabetes mellitus. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*. 2018;13(5):263–272. DOI: 10.1080/17446651.2018.1523713.
33. Gershuni V.M., Yan S.L., Medici V. Nutritional ketosis for weight management and reversal of metabolic syndrome. *Current Nutrition Reports*. 2018;7(3):97–106. DOI: 10.1007/s13668-018-0235-0.
34. Sacks F.M., Bray G.A., Carey V.J., Smith S.R., Ryan D.H., Anton S.D., McManus K., Champagne C.M., Bishop L.M., Laranjo N., Leboff M.S., Rood J.C., de Jonge L., Greenway F.L., Loria C.M., Obarzanek E., Williamson D.A. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(9):859–873. DOI: 10.1056/NEJMoa0804748.
35. Samaha F.F., Iqbal N., Seshadri P., Chicano K.L., Daily D.A., McGrory J., Williams T., Williams M., Gracely E.J., Stern L. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *New England Journal of Medicine*. 2003;348:2074–2081. DOI: 10.1056/NEJMoa022637.
36. Stern L., Iqbal N., Seshadri P., Chicano K.L., Daily D.A., McGrory J., Williams M., Gracely E.J., Samaha F.F. The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. 2004;140(10):778–785. DOI: 10.7326/0003-4819-140-10-200405180-00007.
37. Gannon M.C., Nuttall F.Q. Effect of a high-protein, low-carbohydrate diet on blood glucose control in people with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(9):2375–2382. DOI: 10.2337/diabetes.53.9.2375.
38. Boden G., Sargrad K., Homko C., Mozzoli M., Stein T.P. Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. *Annals of Internal Medicine*. 2005;142(6):403–411. DOI: 10.7326/0003-4819-142-6-200503150-00006.
39. Feinman R.D., Pogozelski W.K., Astrup A., Bernstein R.K., Fine E.J., Westman E.C., Accurso A., Frassetto L., Gower B.A., McFarlane S.I., Nielsen J.V., Krarup T., Saslow L., Roth K.S., Vernon M.C., Volek J.S., Wilshire G.B., Dahlqvist A., Sundberg R., Childers A., Morrison K., Manninen A.H., Dashti H.M., Wood R.J., Wortman J., Worm N. Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management: critical review and evidence base. *Nutrition*. 2015;31(1):1–13. DOI: 10.1016/j.nut.2014.06.011.
40. Farrés J., Pujol A., Coma M., Ruiz J.L., Naval J., Mas J.M., Molins A., Fondevila J., Aloy P. Revealing the molecular relationship between type 2 diabetes and the metabolic changes induced by a very-low-carbohydrate low-fat ketogenic diet. *Nutrition & Metabolism*. 2010;7:88. DOI: 10.1186/1743-7075-7-88.
41. Goday A., Bellido D., Sajoux I., Crujeiras A.B., Burgueira B., García-Luna P.P., Oleaga A., Moreno B., Casanueva F.F. Short-term safety, tolerability and efficacy of a very low-calorie-ketogenic diet interventional weight loss program versus hypocaloric diet in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrition & Diabetes*. 2016;6(9):e230. DOI: 10.1038/nutd.2016.36.
42. Sharman M.J., Kraemer W.J., Love D.M., Avery N.G., Gómez A.L., Scheett T.P., Volek J.S. A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men. *The Journal of Nutrition*. 2002;132:1879–1885. DOI: 10.1093/jn/132.7.1879.
43. Volek J.S., Sharman M.J., Gómez A.L., Scheett T.P., Kraemer W.J. An isoenergetic very low carbohydrate diet improves serum HDL cholesterol and triacylglycerol concentrations, the total cholesterol to HDL cholesterol ratio and postprandial lipemic responses compared with a low fat diet in normal weight, normolipidemic women. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(9):2756–2761. DOI: 10.1093/jn/133.9.2756.
44. Volek J.S., Gómez A.L., Kraemer W.J. Fasting lipoprotein and postprandial triacylglycerol responses to a low-carbohydrate diet supplemented with n-3 fatty acids. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000;19(3):383–391. DOI: 10.1080/07315724.2000.10718935.
45. Larosa J.C., Fry A.G., Muesing R., Rosing D.R. Effects of high-protein, low-carbohydrate dieting on plasma lipoproteins and body weight. *Journal of the American Dietetic Association*. 1980;77(3):264–270.
46. Saslow L.R., Mason A.E., Kim S., Goldman V., Ploutz-Snyder R., Bayandorian H., Daubenmier J., Hecht F.M., Moskowitz J.T. An online intervention comparing a very low-carbohydrate ketogenic diet and lifestyle recommendations versus a plate method diet in overweight individuals with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Journal of Medical Internet Research*. 2017;19(2):e36. DOI: 10.2196/jmir.5806.
47. Wolver S., Fadel K., Fieger E., Aburish Z., O'Rourke B., Chandler T.M., Shimotani D., Clingempeel N., Jain S., Jain A., Puri P. Clinical use of a real-world low carbohydrate diet resulting in reduction of insulin dose, hemoglobin A1c, and weight. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8:690855. DOI: 10.3389/fnut.2021.690855.
48. Zaki H.A., Iftikhar H., Bashir K., Gad H., Fahmy A.S., Elmoheen A. A comparative study evaluating the effectiveness between ketogenic and low-carbohydrate diets on glycemic and weight control in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Cureus*. 2022;14(5):e25528. DOI: 10.7759/cureus.25528.
49. Cicero A.F.G., Benelli M., Brancaleoni M., Dainelli G., Merlini D., Negri R. Middle and long-term impact of a very low-carbohydrate ketogenic diet on cardiometabolic factors: a multi-center, cross-sectional, clinical study. *High*

- Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*. 2015;22:389–394. DOI: 10.1007/s40292-015-0096-1.
50. Field R., Pourkazemi F., Rooney K. Effects of a low-carbohydrate ketogenic diet on reported pain, blood biomarkers and quality of life in patients with chronic pain: a pilot randomized clinical trial. *Pain Medicine*. 2022;23(2):326–338. DOI: 10.1093/pm/pnab278.
51. Durrer C., McKelvey S., Singer J., Batterham A. M., Johnson J. D., Gudmundson K., Wortman J., Little J. P. A randomized controlled trial of pharmacist-led therapeutic carbohydrate and energy restriction in type 2 diabetes. *Nature Communications*. 2021;12:5367. DOI: 10.1038/s41467-021-25667-4.
52. Jain V., Shivkumar S., Gupta O. Health-related quality of life (Hr-Qol) in patients with type 2 diabetes mellitus. *North American Journal of Medical Sciences*. 2014;6(2):96–101. DOI: 10.4103/1947-2714.127752.
53. Dattilo A. M., Kris-Etherton P. M. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1992;56(2):320–328. DOI: 10.1093/ajcn/56.2.320.
54. Austin M. A., Hokanson J. E., Edwards K. L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Cardiology*. 1998;81(4A):7B–12B. DOI: 10.1016/s0002-9149(98)00031-9.
55. Taubes G. Nutrition. The soft science of dietary fat. *Science*. 2001;291(5513):2536–2345. DOI: 10.1126/science.291.5513.2536.
56. Zammit V. A., Waterman I. J., McKay G., Topping D. Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion and the etiology of insulin resistance. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(8):2074–2077. DOI: 10.1093/jn/131.8.2074.
57. Reaven G. M. Diet and syndrome X. *Current Atherosclerosis Reports*. 2000;2(6):503–507. DOI: 10.1007/s11883-000-0050-z.
58. Krauss R. M. Atherogenic lipoprotein phenotype and diet-gene interactions. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(2):340S–343S. DOI: 10.1093/jn/131.2.340S.
59. Yancy W. S. Jr., Olsen M. K., Guyton J. R., Bakst R. P., Westman E. C. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*. 2004;140(10):769–777. DOI: 10.7326/0003-4819-140-10-200405180-00006.
60. Brouns F. Overweight and diabetes prevention: is a low-carbohydrate-high-fat diet recommendable? *European Journal of Nutrition*. 2018;57:1301–1312. DOI: 10.1007/s00394-018-1636-y.
61. Wong K., Raffray M., Roy-Fleming A., Blunden S., Brazeau A.-S. Ketogenic diet as a normal way of eating in adults with type 1 and type 2 diabetes: a qualitative study. *Canadian Journal of Diabetes*. 2021;45(2):137–143.E131. DOI: 10.1016/j.jcjd.2020.06.016.
62. Lee S. H., Lee J.-Y., Kim G. H., Jung K. J., Lee S., Kim H. C., Jee S. H. Two-sample mendelian randomization study of lipid levels and ischemic heart disease. *Korean Circulation Journal*. 2020;50(10):940–948. DOI: 10.4070/kcj.2020.0131.
63. Mazidi M., Katsiki N., Mikhailidis D. P., Sattar N., Banach M. Lower carbohydrate diets and all-cause and cause-specific mortality: a population-based cohort study and pooling of prospective studies. *European Heart Journal*. 2019;40(34):2870–2879. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz174.
64. Murdoch C., Unwin D., Cavan D., Cucuzzella M., Patel M. Adapting diabetes medication for low carbohydrate management of type 2 diabetes: a practical guide. *British Journal of General Practice*. 2019;69(684):360–361. DOI: 10.3399/bjgp19X704525.



Кросс-валидация методик количественного определения феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различной экстракции

А. И. Платова¹, И. И. Кузьмин¹, Д. В. Иващенко², И. И. Мирошниченко¹✉

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья» (ФГБНУ НЦПЗ). 115522, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 125993, Россия, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

✉ Контактное лицо: Мирошниченко Игорь Иванович. E-mail: igormir41@gmail.com

ORCID: А. И. Платова – <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>;

И. И. Кузьмин – <https://orcid.org/0000-0002-9326-4683>;

Д. В. Иващенко – <https://orcid.org/0000-0002-2295-7167>;

И. И. Мирошниченко – <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>.

Статья поступила: 06.10.2023

Статья принята в печать: 11.10.2024

Статья опубликована: 11.10.2024

Резюме

Введение. При проведении терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) часто возникает ситуация, когда концентрацию лекарственного средства измеряют разными методами или в разных лабораториях. Для объединения и анализа данных, полученных с помощью разных методов, необходимо выполнять перекрестную валидацию (кросс-валидацию). Применяемым для этого статистическим подходам уделяется недостаточное внимание.

Цель. Выполнить кросс-валидацию разных методик количественного определения феназепама (ФЕН) и 3-гидроксифеназепама (3-ОН-ФЕН) с помощью анализа Бленда – Альтмана.

Материалы и методы. Концентрации ФЕН и 3-ОН-ФЕН в плазме крови пациентов ($n = 100$) с синдромом отмены алкоголя были измерены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). В каждом образце содержание обоих аналитов измеряли двукратно с помощью двух разных методик: твердофазной экстракции (SPE, от *англ.* «solid phase extraction») и жидкостной экстракции с поддержкой (SLE, от *англ.* «supported liquid extraction»). Обе методики до начала эксперимента прошли полную валидацию. Кросс-валидация проводилась по завершении эксперимента с использованием данных от испытуемых образцов. Для оценки правильности (accuracy) и прецизионности (precision) использовали анализ Бленда – Альтмана. Для выявления систематической ошибки между методиками также применяли регрессионный анализ Деминга.

Результаты и обсуждение. Для обоих аналитов были получены регрессионные зависимости между концентрациями, измеренными разными методами пробоподготовки. 95%-й доверительный интервал (ДИ) коэффициентов обоих уравнений включал единицу, а 95%-й ДИ свободного члена включал ноль. 95%-й ДИ геометрического среднего индивидуальных отношений SLE/SPE находился в пределах допустимого диапазона (0,87; 1,15). Данные результаты подтверждают отсутствие влияния количественной методики на измерение концентрации обоих аналитов. 66,7%-й ДИ относительной погрешности между двумя измерениями находился в допустимых пределах (–0,2; 0,2), не превышая 20%-й диапазон от их среднего значения. Это подтверждает приемлемую прецизионность между методиками. Вычисленные доверительные интервалы отражены на диаграммах аналитического смещения по Бленду – Альтману.

Заключение. Применяемые в работе статистические подходы подтвердили сопоставимость результатов разных методик пробоподготовки. Описанный в работе статистический алгоритм с применением диаграмм аналитического смещения по Бленду – Альтману, помимо кросс-валидации, может успешно применяться для оценки правильности и прецизионности при валидации и оценке приемлемости аналитического цикла, а также при повторном анализе испытуемых образцов.

Ключевые слова: феназепам, 3-оксифеназепам, хроматография, масс-спектрометрия, кросс-валидация, метод Бленда – Альтмана, регрессия Деминга, правильность, прецизионность

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

Вклад авторов. А. И. Платова – разработка плана и проведение статистического анализа, интерпретация полученных результатов, составление статьи. И. И. Мирошниченко – постановка задачи. И. И. Кузьмин – измерение концентрации искомых веществ. Д. В. Иващенко – терапевтический лекарственный мониторинг.

Для цитирования: Платова А. И., Кузьмин И. И., Иващенко Д. В., Мирошниченко И. И. Кросс-валидация методик количественного определения феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различной экстракции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):212–222. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1924>

Cross-validation of methods for the quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at various extractions

Angelina I. Platova¹, Ivan I. Kuzmin¹, Dmitriy V. Ivaschenko², Igor I. Miroshnichenko¹✉

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution "Mental Health Research Center". 34, Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russia

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. 2/1, Barrikadnaya str., Moscow, 125993, Russia

✉ **Corresponding author:** Igor I. Miroshnichenko. **E-mail:** igormir41@gmail.com

ORCID: Angelina I. Platova – <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>;

Ivan I. Kuzmin – <https://orcid.org/0000-0002-9326-4683>;

Dmitriy V. Ivaschenko – <https://orcid.org/0000-0002-2295-7167>;

Igor I. Miroshnichenko – <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>.

Received: 06.10.2023

Accepted: 11.10.2024

Published: 11.10.2024

Abstract

Introduction. In conducting of therapeutic drug monitoring (TDM), often such situation arises where the drug concentration has measured by different methods or in different laboratories. To combine and analyze the data obtained with different methods, it is necessary to perform cross-validation procedure. Insufficient attention is paid to the statistical approaches used for this purpose.

Aim. Performing cross-validation of different analytical methods for the quantitative determination of phenazepam (PHEN) and 3-hydroxyphenazepam (3-OH-PHEN) using the Bland – Altman analysis.

Materials and methods. PHEN and 3-OH-PHEN concentrations in the blood plasma of patients ($n = 100$) with alcohol withdrawal syndrome were measured using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The quantification of both analytes in each sample was measure twice by two different methods: solid phase extraction (SPE) and supported liquid extraction (SLE). Both methods have been fully validated before the experiment began. Cross-validation was performed at the end of the experiment using data from study samples. The Bland – Altman analysis was used to evaluate accuracy and precision. Deming regression was also used to identify a systematic error between measurement results.

Results and discussion. The regression equations have been obtained between concentrations both analytes measured by different sample preparation methods. 95 % confidence intervals (CI) of the regression coefficients of both equations included one, and 95 % CI of the intercepts included zero. 95 % CI of the geometric mean of the individual SLE/SPE ratios was within the acceptable range (0.87; 1.15). These results confirm the absence of the influence of quantitative methods on the measurement of both analytes concentration. 66.7 % CI of the percent difference between two measurements was within acceptable limits (–0.2; 0.2), not exceeding 20 % of the range of their mean value. This confirms the acceptable precision between the methods. The estimated CIs were displayed in the Bland – Altman plots.

Conclusion. The statistical approaches used in the work have confirmed the reproducibility of the results of different sample preparation methods. In addition to cross-validation, the statistical algorithm from this paper using Bland – Altman analysis can be successfully employed to assess accuracy and precision during bioanalytical method validation and evaluation of the acceptance of analytical runs, as well as to determine the level of reproducibility of incurred samples.

Keywords: phenazepam, 3-oxyphenazepam, chromatography, mass spectrometry, cross validation, Bland Altman analysis, Deming regression, accuracy, precision

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. Angelina I. Platova developed a plan and carried out statistical analysis, interpreted the obtained results, participated in the preparation of the article. Igor I. Miroshnichenko has set the purpose. Ivan I. Kuzmin has measured the concentration of the desired substances. Dmitriy V. Ivaschenko has conducted TDM.

For citation: Platova A. I., Kuzmin I. I., Ivaschenko D. V., Miroshnichenko I. I. Cross-validation of methods for the quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at various extractions. *Drug development & registration*. 2024;13(4):212–222. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1924>

ВВЕДЕНИЕ

Валидация биоаналитических методик может быть полной, частичной или перекрестной (кросс-валидация) [1]. Полную валидацию проводят при разработке новой методики [2]. Частичная валидация необходима при переносе методики в другую лабораторию, замене оборудования, изменении аналитического диапазона, изменении типа биообразца или биологического вида, замене антикоагулянта, изменении пробоподготовки, условий хранения и так далее. Причем объем частичной валидации может ограничиваться лишь оценкой прецизионности и правильности внутри цикла или быть представлен проведением полной валидации¹. Так или иначе, вышеперечисленные изменения условий количественного определения могут приводить к возникновению сложной взаимосвязи между методиками, которая усугубляется при трансфере методики в другую лабораторию. Отсюда очевидна важность управления жизненным циклом любой методики, обеспечивающего четкое документирование взаимосвязи между ее различными модификациями [3].

Кросс-валидация требуется при необходимости объединения и/или сопоставления данных в следующих случаях: данные собраны с использованием различных, полностью валидированных методов в рамках одного или разных исследований; данные получены в разных лабораториях с использованием одного биоаналитического метода² [4]. Наиболее часто такая необходимость возникает при проведении ТЛМ. Суть кросс-валидации заключается в установлении эквивалентности методов, а точнее, воспроизводимости результатов выполненных с их помощью измерений. При этом применяемым для выполнения кросс-валидации статистическим подходам уделяется недостаточное внимание.

Современные международные и отечественные методические рекомендации по выполнению валидации подразумевают следующее. Кросс-валидация по возможности должна проводиться до анализа испытуемых образцов путем измерения одного и того же набора образцов контроля качества (QC) на низком, среднем и высоком уровнях аналитического диапазона по крайней мере в трех экземплярах. При этом полученные с помощью разных методик средние значения правильности не должны различаться более чем на $\pm 15\%$.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 06.10.2023.

² ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

Что касается исследуемых образцов, они должны охватывать диапазон концентраций, измеренных обеими методиками или в обеих лабораториях ($n \geq 30$). Причем погрешность между этими измерениями должна укладываться в диапазон 20 % от их среднего значения не менее чем для 67 % повторов³ [4]. Иными словами, сравнение правильности методик рекомендовано проводить с использованием образцов QC, сравнение прецизионности результатов измерений – с использованием исследуемых образцов. Тем не менее, очевидно, что для кросс-валидации необходимо сравнивать обе эти основные валидационные характеристики. Однако возможность провести кросс-валидацию до начала эксперимента зачастую может отсутствовать, особенно в ТЛМ, например при смене оборудования или расходников для экстракции. В этом случае кросс-валидацию можно выполнить уже в ходе эксперимента путем повторного анализа испытуемых образцов. Для этого важно располагать статистическим алгоритмом для сравнения и правильности, и прецизионности методик с целью получения исчерпывающей оценки сопоставимости выполненных с их помощью измерений.

Для иллюстрации процедуры кросс-валидации с использованием исследуемых образцов был выбран проект ТЛМ феназепама. Феназепам (бромдигидрохлорфенилбензодиазепин, ФЕН) – препарат для лечения психических расстройств, алкогольной зависимости и наркомании, судорожных приступов и других неврологических заболеваний [5, 6]. К сожалению, препарат не столь безобиден и зачастую употребляется не по назначению [7]. В организме человека ФЕН подвергается интенсивной биотрансформации с образованием активного метаболита 3-гидроксифеназепама (3-ОН-ФЕН) [8–10]. Фармакологический эффект ФЕН определяется в конечном итоге суммарным содержанием родительского вещества и 3-ОН-ФЕН, то есть так называемой активной фракцией (АМ, от *англ.* «active moiety») ФЕН. Разработанные и валидированные методики количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН были подробно описаны в нашей предыдущей публикации [11]. Эти методики отличались методом пробоподготовки: в одном случае применяли твердофазную экстракцию (SPE), в другом – жидкостную экстракцию с поддержкой (SLE). Для оценки сопоставимости результатов повторных измерений ФЕН и 3-ОН-ФЕН, выполненных с помощью разных методик, были использованы все полученные от пациентов образцы.

Для сравнения результатов измерений, полученных с помощью разных методик, использовали принципы и правила, общепринятые как для оценки соот-

³ ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

ветствия между методами и кросс-валидации, так и для оценки результатов повторного анализа образцов в рамках одной методики [3, 12–17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аналитическая часть

Методика определения подробно изложена в нашей публикации [11]. Вкратце, для измерений концентрации использовали жидкостной хроматограф UltiMate 3000 (Dionex, США), совмещенный с квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantiva (Thermo Fisher Scientific, США). Разделение образцов проводили на колонке Hypersil GOLD™ (3,5 мкм, внутренний диаметр 50 × 2,1 мм, Thermo Fisher Scientific, США). Для экстракции использовали патроны AccuBond SPE ODS-C18 (Agilent Technologies, США) и HyperSep™ SLE (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ хроматограмм выполняли в программном обеспечении Thermo Xcalibur.

Терапевтический лекарственный мониторинг

Образцы были получены у 100 пациентов мужского пола в возрасте $41,5 \pm 8,5$ года, страдающих синдромом отмены алкоголя. Исследование было открытым (без ослепления) и проводилось по проспективному наблюдательному дизайну. Пациенты находились на стационарном лечении в МНПЦ наркологии и получали ФЕН в таблетированной форме в дозе $6,2 \pm 2,1$ мг/сут.

Плазму готовили следующим образом: 5 мл венозной крови помещали в вакутейнеры с ЭДТА с дальнейшим центрифугированием при 2500 g на 15 мин при температуре 4 °C и дальнейшем хранении при температуре –80 °C до проведения анализа в биоаналитической лаборатории.

Статистический анализ

Наличие различия в результатах измерений, выполненных разными методами, определяли с помощью Т-критерия Уилкоксона (для парных выборок).

Характер и величину систематической ошибки между измерениями, выполненными разными методами, оценивали с использованием ортогональной регрессии Деминга [18]. Этот метод регрессионного анализа учитывает случайный характер ошибки измерений для обоих методов и рекомендован современным руководством по валидации Европейского медицинского агентства¹.

Оценку правильности и прецизионности между измерениями, выполненными разными методами, проводили с помощью анализа Бленда – Альтма-

на. Для этого в качестве референтной была выбрана методика с SPE.

Статистический и графический анализ выполнялся в среде R с использованием пакетов: readxl, tidyverse, dplyr, ggplot2, stargazer, ggpubr, deming.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ТЛМ показали значительный разброс уровня АМ ФЕН, что подчеркивает важность проведения лекарственного и терапевтического мониторинга при назначении этого препарата (рисунок 1).

Описательные статистики и тесты сравнения парных выборок недостаточно информативны для решения вопроса о степени сопоставимости концентраций, измеренных с помощью разных методик. Так, тестирование различий между парными выборками с помощью критерия Уилкоксона, позволяя обнаруживать систематический сдвиг между измерениями, выполненными двумя разными методами, все же не дает ответа на вопрос о степени их соответствия, определяемой разбросом индивидуальных отличий в каждом отдельном случае (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение результатов измерений концентрации ФЕН и 3-ОН-ФЕН (нг/мл), измеренной разными методиками

Table 1. Comparison of PHEN and 3-OH-PHEN concentrations (ng/ml) measured by using different methods

Статистические параметры Statistical parameters	3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN		ФЕН PHEN	
	SLE	SPE	SLE	SPE
N	100	100	100	100
Среднее Average	57,3	58,2	216,1	216
SD Standard deviation	42,6	45,1	144,7	146,7
Минимум Minimum	6,7	6,9	2	1,8
25-й процентиль 25th percentile	33,7	33,3	112,8	109,8
Медиана Median	46,1	47,9	199,5	187,1
75-й процентиль 75th percentile	68,7	69	274,2	292,2
Максимум Maximum	289,4	330	901	862
Р-величина (критерий Уилкоксона) P-value (Wilcoxon test)	0,118		0,41	

Для оценки сопоставимости количественных методов обычно применяют регрессионный анализ по Пассингу – Баблоку (непараметрический анализ) или ортогональную регрессию Деминга. В нашей работе

¹ ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

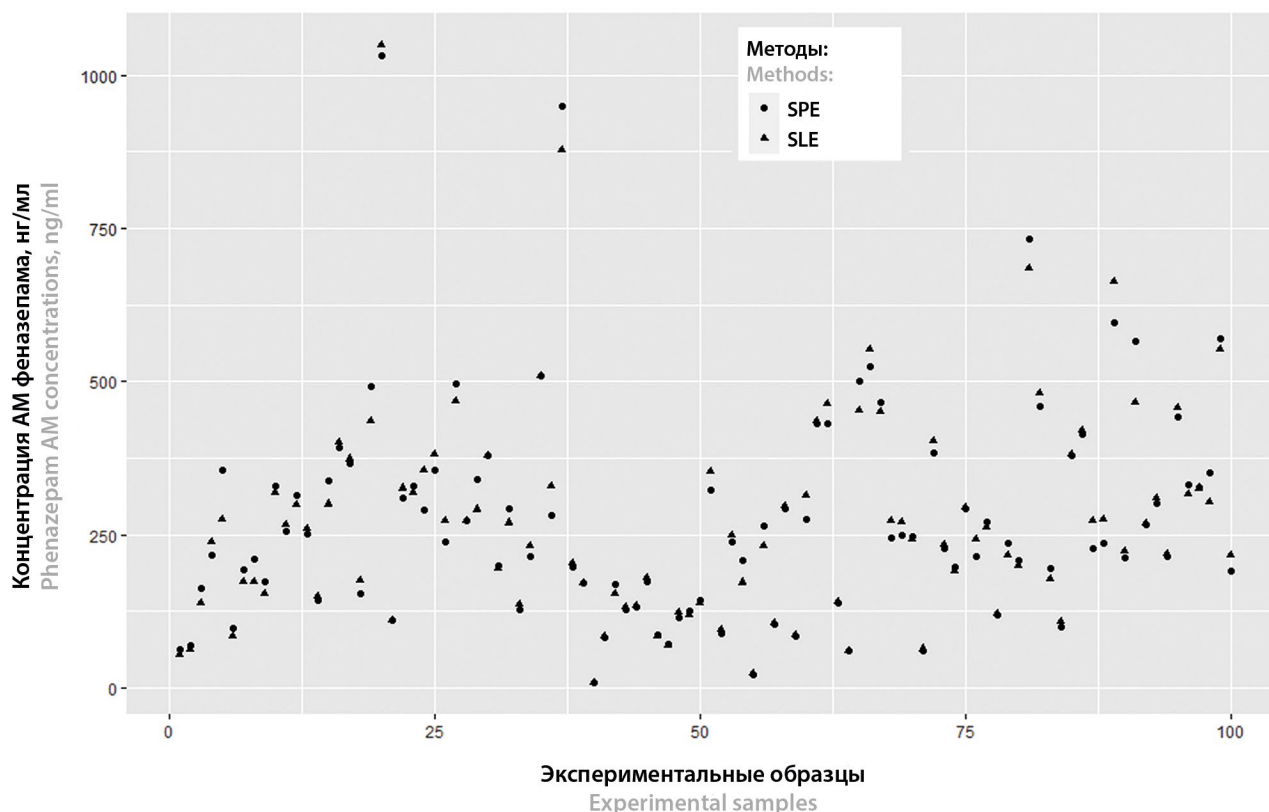


Рисунок 1. Диаграмма рассеяния уровня активной фракции феназепама (ФЕН и 3-ОН-ФЕН), измеренного при различных методах экстракции

Figure 1. Scatter plot of the phenazepam active moiety (PHEN+3OH-PHEN) levels measured by different extraction methods

выбор был сделан в пользу анализа Деминга, учитывающего случайный характер ошибки измерения для обоих методов.

95%-й ДИ свободного члена регрессии Деминга для обоих аналитов включал 0,00, а коэффициент регрессии (наклон прямой) – 1,00, что подтверждает отсутствие систематической ошибки между методами (рисунок 2).

Коэффициент детерминации (r^2) как показатель качества регрессионной модели отражает долю общей вариации зависимой переменной, объясненную независимой переменной, но не отражает степень согласия между ними (см. раздел «Материалы и методы»). Поэтому для целей кросс-валидации этот показатель не имеет смысла.

Для оценки возможности применения метода Бленда – Альтмана сначала тестировали гипотезу о нормальности распределения разности log-преобразованных значений концентрации, измеренной методами SPE и SLE, а также относительной погрешности результатов измерений. Линии на гистограммах распределения показывают нормальное распределение. Нормальность распределения указанных вели-

чин для ФЕН и 3-ОН-ФЕН была подтверждена с помощью теста Шапиро – Уилка (полученные р-величины были больше 0,05) (рисунок 3).

Результаты сравнения правильности и прецизионности методик количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН представлены в виде графиков Бленда – Альтмана (рисунок 4). На всей протяженности измеряемого диапазона 95%-й ДИ линии регрессии отношения результатов измерений от их геометрического среднего включает 1,00 (рисунок 5 А и В), а 95%-й ДИ линии регрессии относительной погрешности результатов измерений от их среднего включает 0,00 (рисунок 5 С и D), что означает отсутствие связи величин отношения результатов измерений и их относительной погрешности с уровнем концентрации. С учетом логнормального распределения величины отношения результатов измерений диаграмма Бленда – Альтмана представляет собой не разность результатов измерений против их средних арифметических, а отношение результатов измерений против их средних геометрических (рисунок 4 А и В).

95%-й ДИ геометрического среднего отношения результатов измерений SLE/SPE показаны на диаграм-

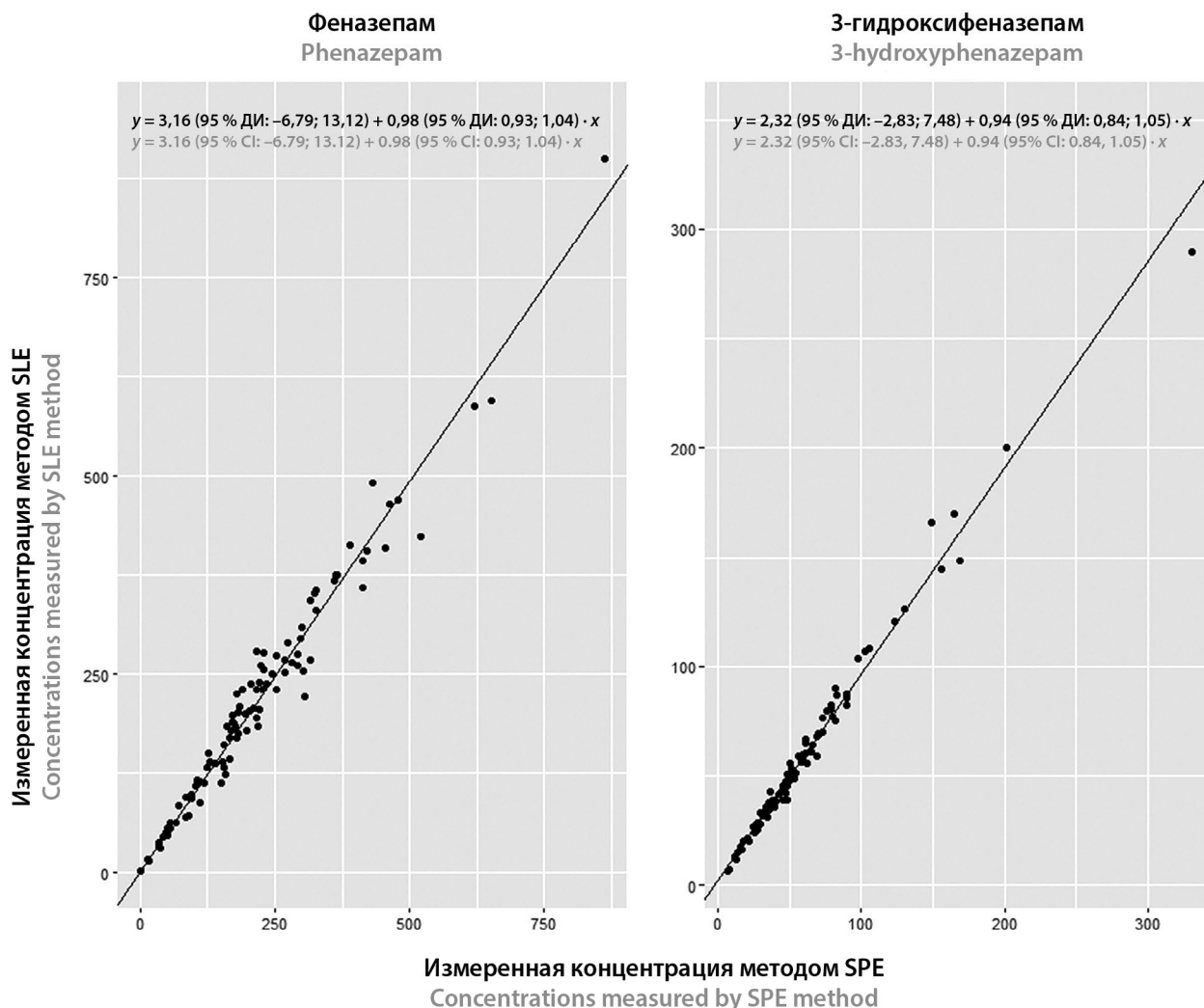


Рисунок 2. Регрессионные зависимости по Демингу между концентрациями, измеренными с помощью SLE и SPE
Figure 2. Deming regressions of measured by SLE and SPE concentrations

мах А и В пунктирной линией, сплошными линиями выделены геометрическое среднее и приемлемые для него границы.

Интервалы согласия показаны на диаграммах С и D точечными линиями, сплошные линии отражают

границы согласия и среднее относительной погрешности измерений. Заливка отображает 95%-й ДИ линии регрессии.

Рассчитанные диапазоны правильности и прецизионности лежат в допустимых границах, что позво-

Таблица 2. Кросс-валидация разных методик количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН

Table 2. Cross-validation of different methods of PHEN and 3-OH-PHEN quantitative determination

Аналит Analyt	ФЕН PHEN	3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN	Допустимый диапазон Acceptable range
Правильность: геометрическое среднее (95%-й ДИ) отношения SLE/SPE, % Accuracy: geometric mean of SLE/SPE ratio (95 % CI), %	100,48 (98,23; 102,78)	98,98 (97,67; 100,31)	(87;115)
Прецизионность: интервал согласия Precision: limits of agreement	0,005 (-0,11; 0,12)	-0,01 (-0,08; 0,06)	(-0,20; 0,20)

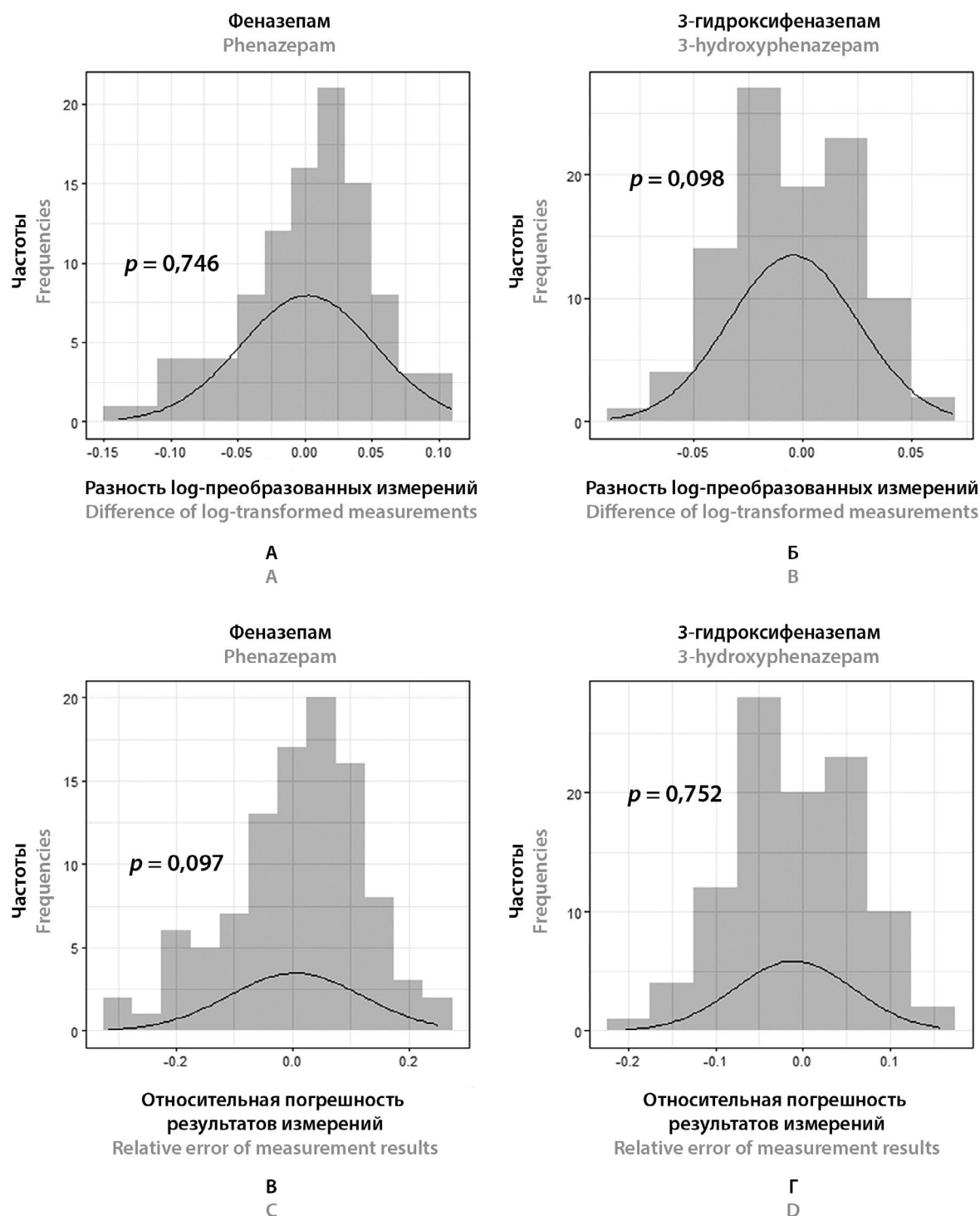


Рисунок 3. Гистограммы частотного распределения разности log-преобразованных значений концентрации ФЕН и 3-ОН-ФЕН (А и В), а также относительной погрешности результатов измерений

Figure 3. Histograms of frequency distribution of differences between log-transformed PHEN and 3-OH-PHEN concentrations (A and B), as well as of the relative error of the measurement results

ляет рассматривать сравниваемые методики как взаимозаменяемые (таблица 2).

Практическая значимость кросс-валидации заключается в том, что она подтверждает получение сопоставимых значений концентрации в одном и

том же образце при разных аналитических подходах [18]. Кросс-валидация проводилась в ряде работ: для результатов, полученных с использованием ВЭЖХ-МС/МС на разных приборах, при сравнении методов масс-спектрометрии и иммуноферментного

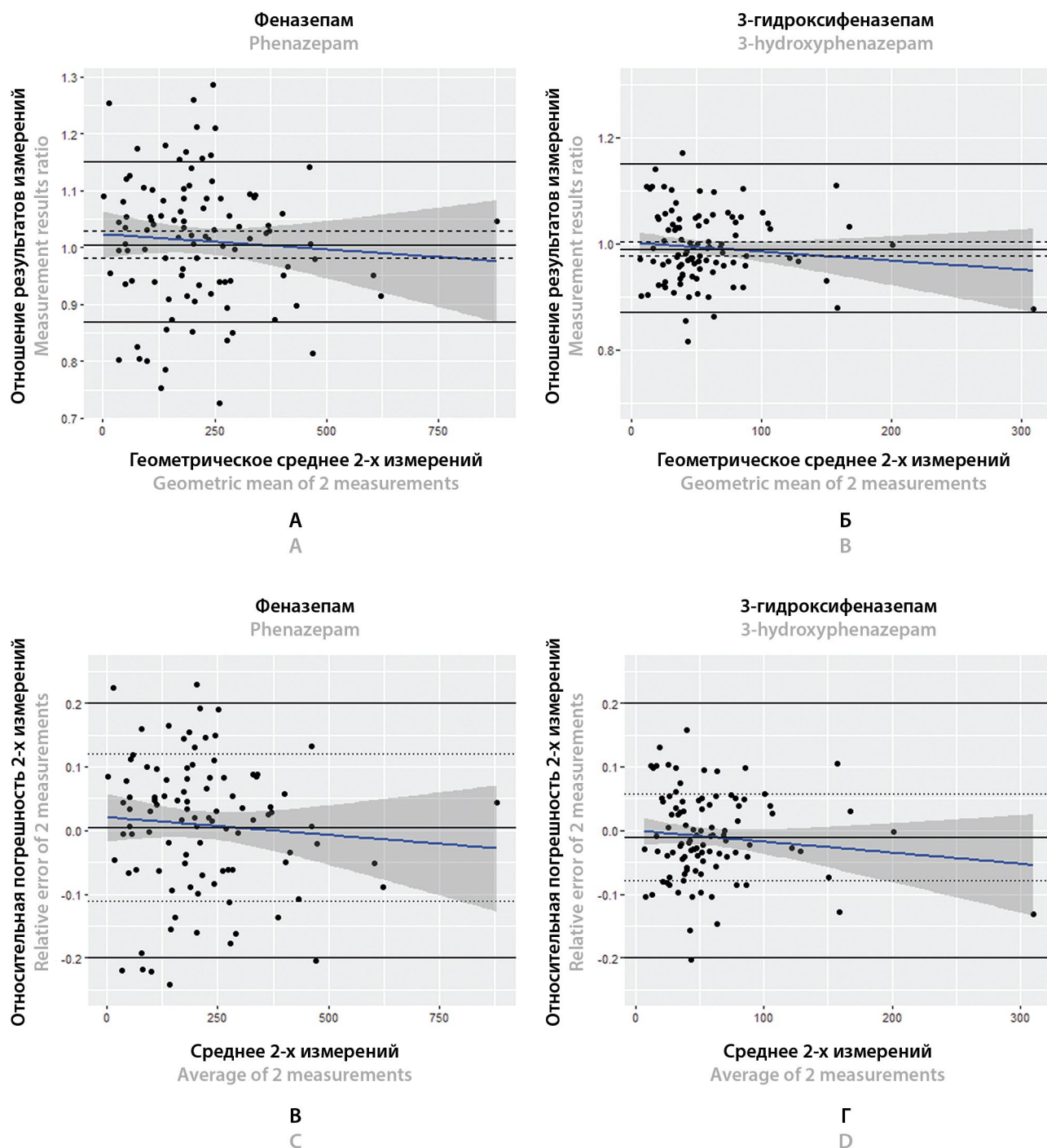


Рисунок 4. Диаграммы аналитического смещения Бленда – Альтмана

Figure 4. Bland – Altman plots of analytical displacement

анализа, а также сравнении двух методов пробоподготовки (микрокапилляры и метод сухих пятен) [19–21]. Потребность в межлабораторной валидации также может возникать при получении сомнительного качества первичных результатов [22].

Стоит отметить, что допустимый диапазон и методы оценки правильности и прецизионности при процедуре кросс-валидации идентичны требованиям,

предъявляемым к повторному анализу образцов (incurred samples), а также критериям приемлемости аналитического цикла¹ [19].

¹ ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

Обычно для анализа Бленда – Альтмана предусматривается не менее 30 образцов, чтобы выборки не были малыми. В нашем эксперименте в анализ на соответствие результатов измерений с помощью различных методик вошли все испытуемые образцы эксперимента (100 образцов), то есть была получена репрезентативная выборка.

Неприемлемость корреляционного анализа. Правильность. Оценка систематической ошибки между методиками. Полученные с помощью различных методик средние значения правильности для образцов QC не должны различаться более чем на $\pm 15\%$ ¹. Если правильность определять как величину процентной меры $A \cdot 100\%/x$, то, исходя из условия выше,

получаем, что средняя величина $\frac{A \cdot 100\%/x}{B \cdot 100\%/x} = A/B$

должна находиться в интервале (0,87; 1,15), где x – истинное значение концентрации; A – величина концентрации, измеренная методом А; B – величина концентрации, измеренная методом В. Границы интервала несимметричны, так как основаны на равенствах: $1/0,87 = 1,15$ и, наоборот, $1/1,15 = 0,87$. Для того чтобы показать приемлемую правильность при кросс-валидации, сначала находят среднее отношение результатов двух измерений, вычисляют его 95%-й ДИ и подтверждают, что этот ДИ находится в пределах от 0,87 до 1,15. Очевидно, если данные требования применимы при повторном измерении образцов QC, они также могут применяться и для испытуемых образцов.

Принято считать, что остаточные концентрации лекарств в крови подчиняются логнормальному распределению. Поэтому величину различия между измеренными концентрациями (A/B) подвергали log-преобразованию (по основанию 10^2): $\log(A/B) = \log A - \log B$, удостоверившись, что эта величина подчиняется нормальному распределению (тест Шапиро – Уилка), и вычисляли ее среднее ($\bar{d}$) и стандартное отклонение (SD).

Далее вычисляли геометрическое среднее для каждого образца $\text{Mean}_{\text{geom.}} = \sqrt{A \cdot B}$.

После обратной операции – потенцирования – вычисляли среднее геометрическое для величины

A/B , $10^{\bar{d}}$, и его 95%-й ДИ, $10^{\bar{d} \pm t_{\alpha/2, n-1} \cdot SD/\sqrt{n}}$, где n – размер выборки (в нашем случае $n = 100$); $t_{\alpha/2, n-1}$ – критическое значение t -статистики (распределения Стьюдента) с уровнем значимости α ($1 - 0,95 = 0,05$) и числом степеней свободы $n - 1$.

Такая процедура оценки различия результатов измерений двух методов отражает метод Бленда – Альтмана, а ее результат представляется в виде одноименной диаграммы рассеяния, по оси X которой откладывается среднее геометрическое каждого повторных измерений, а по Y – их отношение [12, 13, 16, 23].

Прецизионность. Границы согласия. Погрешность между двумя значениями испытуемых образцов должна укладываться в диапазон 20 % от их среднего значения не менее чем для 67 % повторностей³. Это требование согласуется с правилом «4-6-20» [15], означающим, что отклонения для 4 из 6 образцов (2/3) при повторном измерении должны лежать в пределах 20 % различий. Известно, что при нормальном распределении случайной величины 66,6 % (т.е. 2/3) ее значений будет находиться в диапазоне (среднее $\pm t_{\alpha/2, n-1} \cdot SD$). Так как для вероятности 66 % критическое значение $t_{\alpha/2, n-1} = 0,9542 \approx 1$, этот диапазон будет следующим: среднее $\pm 1 \cdot SD$. Другими словами, 66,6%-й ДИ относительной погрешности между измерениями разных методик составит: среднее относительной погрешности $\pm 1 \cdot SD$. Исходя из регуляторных требований, получаем, что 67%-й ДИ величины $2(A - B)/(A + B)$ не должен пересекать границы $(-0,2; 0,2)$. Этот интервал также называют границами согласия [13].

Для наглядного представления прецизионности между методиками на диаграмме Бленда – Альтмана по оси X откладывается среднее двух измерений, а по Y – их относительная погрешность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты кросс-валидации двух методик количественного определения ФЕИ и 3-ОН-ФЕИ показали, что величины правильности и прецизионности находятся в допустимых диапазонах (0,85; 1,15) и $(-0,20; 0,20)$ соответственно.

Применение регрессии Деминга стоит рассматривать как дополнительный метод тестирования соответствия результатов измерений разными методами.

Подробно описанный в работе статистический подход может применяться при проведении кросс-валидации, а также повторном анализе испытуемых об-

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 06.10.2023.

² Исходя из свойств логарифмов, при любом основании (за исключением 0 и 1) будет получена величина, подчиняющаяся нормальному закону распределения. Поэтому выбор основания при логарифмировании логнормальной величины не имеет существенного значения, тем не менее наиболее часто в качестве основания при лог-преобразовании используют экспоненту или число 10.

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0085/> Ссылка активна на 06.10.2023.

разцов. Необходимо отметить универсальность данного подхода: кросс-валидация успешно применяется для анализа эффективности алгоритма машинного обучения на новых наборах данных, на которых искусственный интеллект не обучался [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Раменская Г.В., Шохин И.Е., Савченко А.Ю., Давыдова К.С., Кулес В.Г. Обзор требований к валидации биоаналитических методик. *Ремедиум*. 2011;12:60–63.
2. Эпштейн Н.А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
3. Briggs R.J., Nicholson R., Vazvaei F., Busch J., Mabuchi M., Mahesh K.S., Brudny-Kloeppel M., Weng N., Galvinas P.A.R., Duchene P., Hu P., Abbott R.W. Method transfer, partial validation, and cross validation: recommendations for best practices and harmonization from the global bioanalysis consortium harmonization team. *The AAPS Journal*. 2014;16(6):1143–1148. DOI: 10.1208/s12248-014-9650-3.
4. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. FDA. Biopharmaceutics; 2018. 44 p.
5. Городничев А.В., Костюкова Е.Г. Место феназепама в современном применении бензодиазепиновых транквилизаторов. *Современная Терапия Психических Расстройств*. 2011;2:26–29.
6. Syrjanen R., Greene S.L., Weber C., Smith J.L., Hodgson S.E., Abouchdid R., Gerostamoulos D., Maplesden J., Knott J., Hollerer H., Rotella J.-A., Graudins A., Schumann J.L. Characteristics and time course of benzodiazepine-type new psychoactive substance detections in Australia: results from the Emerging Drugs Network of Australia – Victoria project 2020–2022. *International Journal of Drug Policy*. 2023;122:104245. DOI: 10.1016/j.drugpo.2023.104245.
7. Акимова В.Д., Барсегян С.С., Плетенева Т.В. Персонализированный характер токсических эффектов на примере массовых несмертельных отравлений феназепамом и другими психоактивными веществами. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2024;67(1):47–55.
8. Воронина Т.А., Ларионов В.Б., Головенко Н.Я., Неробкова Л.Н., Гайдуков И.О. Роль 3-оксиметаболита феназепама и леваны в реализации их нейротропного действия. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2014;1:44–49.
9. Ivashchenko D.V., Rudik A.V., Poloznikov A.A., Nikulin S.V., Smirnov V.V., Tonevitsky A.G., Bryun E.A., Sychev D.A. Which cytochrome P450 metabolizes phenazepam? Step by step *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2018;33(2):65–73. DOI: 10.1515/dmpt-2017-0036.
10. Zastrozhin M.S., Skryabin V.Yu., Sorokin A.S., Petukhov A.E., Smirnov V.V., Pankratenko E.P., Grishina E.A., Ryzhikova K.A., Panov A.S., Savchenko L.M., Bryun E.A., Sychev D.A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Мирошниченко И.И., Платова А.И., Кузьмин И.И., Иващенко Д.В. Количественное определение феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различных процедурах экстракции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):199–207. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-3-1609.
12. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*. 1986;1(8476):307–310.
13. Rocci M.L., Devanarayan V., Haughey D.B., Jardieu P. Confirmatory reanalysis of incurred bioanalytical samples. *The AAPS Journal*. 2007;9(3):E336–E143.
14. Kelley M. Incurred sample reanalysis: it is just a matter of good scientific practice. *Bioanalysis*. 2011;3(9):931–932. DOI: 10.4155/bio.10.215.
15. Kringle R. O. An assessment of the 4-6-20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical research*. 1994;11(4):556–560. DOI: 10.1023/a:1018922701174.
16. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*. 2015;25(2):141–151. DOI: 10.11613/BM.2015.015.
17. Eastwood B.J., Farnen M.W., Iversen P.W., Craft T.J., Smallwood J.K., Garbison K.E., Delapp N.W., Smith G.F. The minimum significant ratio: a statistical parameter to characterize the reproducibility of potency estimates from concentration-response assays and estimation by replicate-experiment studies. *Journal of Biomolecular Screening*. 2006;11(3):253–261. DOI: 10.1177/1087057105285611.
18. Kocur A., Rubik J., Czarnowski P., Czajkowska A., Marszałek D., Sierakowski M., Górka M., Pawiński T. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid (MPA) using volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients: ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method development, cross-validation, and clinical application. *Pharmacological Reports*. 2023;75(4):1026–1042. DOI: 10.1007/s43440-023-00509-w.
19. Mano Yu. Method validation studies and an inter-laboratory cross validation study of lenvatinib assay in human plasma using LC-MS/MS. *Practical Laboratory Medicine*. 2018;12:e00103. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.e00103.
20. Marin C., Khoudour N., Millet A., Lebert D., Bros P., Thomas F., Ternant D., Lacarelle B., Guitton J., Ciccolini J., Blanchet B. Cross-Validation of a Multiplex LC-MS/MS Method for Assaying mAbs Plasma Levels in Patients with Cancer: A GPCO-UNICANCER Study. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):796. DOI: 10.3390/ph14080796.
21. Wickremsinhe E.R., Decker R.L., Lee L.B., Lelle E., Carlton L.A., Keller S.Y., Prakash A. Microsampling in pediatric studies: pharmacokinetic sampling for baricitinib (Olumiant™) in global pediatric studies. *Bioanalysis*. 2023;15(11):621–636. DOI: 10.4155/bio-2023-0044.
22. Meyer J.A., DeChenne S., Foerder C.A., Hengel S.M. Bioanalysis of tucatinib and metabolite, and a five-way cross-validation to support clinical pharmacokinetic analysis. *Bioanalysis*. 2022;14(22):1443–1452. DOI: 10.4155/bio-2022-0199.
23. Peris-Vicente J., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview. In: Anderson J.L., Berthod A., Estévez V.P., Stalcu A.M., editors. *Analytical Separation Science*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. P. 1757–1808. DOI: 10.1002/9783527678129.assep064.
24. Yang C., Liu Z., Fang Y., Cao X., Xu G., Wang Z., Hu Z., Wang S., Wu X. Development and validation of a clinic machine-learning nomogram for the prediction of risk stratifications of prostate cancer based on functional subsets of peripheral lymphocyte. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):465. DOI: 10.1186/s12967-023-04318-w.

REFERENCES

1. Ramenskaya G. V., SHohin I. E., Savchenko A. Yu., Davido-va K. S., Kukes V. G. Comparative requirements to validation of bioanalytical methods. *Remedium*. 2011;12:60–63. (In Russ.)
2. Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
3. Briggs R. J., Nicholson R., Vazvaei F., Busch J., Mabuchi M., Mahesh K. S., Brudny-Kloeppel M., Weng N., Galvinas P. A. R., Duchene P., Hu P., Abbott R. W. Method transfer, partial validation, and cross validation: recommendations for best practices and harmonization from the global bioanalysis consortium harmonization team. *The AAPS Journal*. 2014;16(6):1143–1148. DOI: 10.1208/s12248-014-9650-3.
4. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. FDA. Biopharmaceutics; 2018. 44 p.
5. Gorodnichenov A. V., Kostyukova E. G. The place of phenazepam in modern use of benzodiazepine tranquilizers. *Current Therapy of Mental Disorders*. 2011;2:26–29. (In Russ.)
6. Syrjanen R., Greene S. L., Weber C., Smith J. L., Hodgson S. E., Abouchedid R., Gerostamoulos D., Maplesden J., Knott J., Hollerer H., Rotella J.-A., Graudins A., Schumann J. L. Characteristics and time course of benzodiazepine-type new psychoactive substance detections in Australia: results from the Emerging Drugs Network of Australia – Victoria project 2020–2022. *International Journal of Drug Policy*. 2023;122:104245. DOI: 10.1016/j.drugpo.2023.104245.
7. Akimova V. D., Barseganyan S. S., Pleteneva T. V. Personalized character of toxic effects through mass nonlethal poisoning by phenazepam and psychoactive substances. *Forensic Medical Expertise*. 2024;67(1):47–55. (In Russ.) DOI: 10.17116/sudmed20246701147.
8. Voronina T. A., Larionov V. B., Golovenko N. Ya., Nerobkova L. N., Gaidukov I. O. Role of 3-oximetabolite phenazepam and levan in realize their neurotropic efficacy. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2014;1:44–49. (In Russ.)
9. Ivashchenko D. V., Rudik A. V., Poloznikov A. A., Nikulin S. V., Smirnov V. V., Tonevitsky A. G., Bryun E. A., Sychev D. A. Which cytochrome P450 metabolizes phenazepam? Step by step *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2018;33(2):65–73. DOI: 10.1515/dmpt-2017-0036.
10. Zastrozhin M. S., Skryabin V. Yu., Sorokin A. S., Petukhov A. E., Smirnov V. V., Pankratenko E. P., Grishina E. A., Ryzhikova K. A., Panov A. S., Savchenko L. M., Bryun E. A., Sychev D. A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Miroshnichenko I. I., Platova A. I., Kuzmin I. I., Ivaschenko D. V. Quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at different extraction procedures. *Drug development & registration*. 2024;13(3):199–207. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-3-1609.
12. Bland J. M., Altman D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The lancet*. 1986;1(8476):307–310.
13. Rocci M. L., Devanarayan V., Haughey D. B., Jardieu P. Confirmatory reanalysis of incurred bioanalytical samples. *The AAPS Journal*. 2007;9(3):E336–E143.
14. Kelley M. Incurred sample reanalysis: it is just a matter of good scientific practice. *Bioanalysis*. 2011;3(9):931–932. DOI: 10.4155/bio.10.215.
15. Kringle R. O. An assessment of the 4-6-20 rule for acceptance of analytical runs in bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical research*. 1994;11(4):556–560. DOI: 10.1023/a:1018922701174.
16. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*. 2015;25(2):141–151. DOI: 10.11613/BM.2015.015.
17. Eastwood B. J., Farnen M. W., Iversen P. W., Craft T. J., Smallwood J. K., Garbison K. E., Delapp N. W., Smith G. F. The minimum significant ratio: a statistical parameter to characterize the reproducibility of potency estimates from concentration-response assays and estimation by replicate-experiment studies. *Journal of Biomolecular Screening*. 2006;11(3):253–261. DOI: 10.1177/1087057105285611.
18. Kocur A., Rubik J., Czarnowski P., Czajkowska A., Marszałek D., Sierakowski M., Górka M., Pawiński T. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid (MPA) using volumetric absorptive microsampling (VAMS) in pediatric renal transplant recipients: ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method development, cross-validation, and clinical application. *Pharmacological Reports*. 2023;75(4):1026–1042. DOI: 10.1007/s43440-023-00509-w.
19. Mano Yu. Method validation studies and an inter-laboratory cross validation study of lenvatinib assay in human plasma using LC-MS/MS. *Practical Laboratory Medicine*. 2018;12:e00103. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.e00103.
20. Marin C., Khoudour N., Millet A., Lebert D., Bros P., Thomas F., Ternant D., Lacarelle B., Guitten J., Ciccolini J., Blanchet B. Cross-Validation of a Multiplex LC-MS/MS Method for Assaying mAbs Plasma Levels in Patients with Cancer: A GPCO-UNICANCER Study. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):796. DOI: 10.3390/ph14080796.
21. Wickremsinhe E. R., Decker R. L., Lee L. B., Lelle E., Carlton L. A., Keller S. Y., Prakash A. Microsampling in pediatric studies: pharmacokinetic sampling for baricitinib (Olumiant™) in global pediatric studies. *Bioanalysis*. 2023;15(11):621–636. DOI: 10.4155/bio-2023-0044.
22. Meyer J. A., DeChenne S., Foerder C. A., Hengel S. M. Bioanalysis of tucatinib and metabolite, and a five-way cross-validation to support clinical pharmacokinetic analysis. *Bioanalysis*. 2022;14(22):1443–1452. DOI: 10.4155/bio-2022-0199.
23. Peris-Vicente J., Esteve-Romero J., Carda-Broch S. Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview. In: Anderson J. L., Berthod A., Estévez V. P., Stalcu A. M., editors. *Analytical Separation Science*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. P. 1757–1808. DOI: 10.1002/9783527678129.assep064.
24. Yang C., Liu Z., Fang Y., Cao X., Xu G., Wang Z., Hu Z., Wang S., Wu X. Development and validation of a clinic machine-learning nomogram for the prediction of risk stratifications of prostate cancer based on functional subsets of peripheral lymphocyte. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):465. DOI: 10.1186/s12967-023-04318-w.



Possible mechanism of effect of the empagliflozin on cardiovascular mortality

Alexey V. Karpushev¹, Marina V. Krasnova², Dmitry Yu. Ivkin²✉, Valeria B. Mikhailova³,
Ekaterina S. Klimenko³, Sergey V. Okovityi², Alexander N. Kulikov⁴

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences. 44, prospekt Toreza, Saint-Petersburg, 194223, Russia

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

³ Almazov National Medical Research Centre. 2, Akkuratova str., Saint-Petersburg, 197341, Russia

⁴ First Pavlov State Medical University of St. Petersburg. 6–8, L'va Tolstogo str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Dmitry Yu. Ivkin. **E-mail:** dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ORCID: Alexey V. Karpushev – <https://orcid.org/0000-0001-8437-6424>;

Marina V. Krasnova – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>;

Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

Valeria B. Mikhailova – <https://orcid.org/0000-0001-9037-0045>;

Ekaterina S. Klimenko – <https://orcid.org/0000-0003-3404-897X>;

Sergey V. Okovityi – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>;

Alexander N. Kulikov – <https://orcid.org/0000-0003-0305-4787>.

Received: 08.07.2023

Accepted: 16.10.2024

Published: 17.10.2024

Abstract

Introduction. The development of heart failure is closely associated with the appearance of life threatening arrhythmias, which are often a terminal event for these patients. An analysis of randomized clinical trials of inhibitors of sodium-glucose cotransporter type 2 indicates the clinically significant potential of these drugs as agents with antiarrhythmic properties. However, at the moment the full mechanism by which this effect can be realized is still not fully understood.

Aim. To evaluate the effect of empagliflozin on the transmembrane calcium currents and the intracellular calcium transients on isolated ventricular cardiomyocytes of mice under conditions of normoglycemia.

Materials and methods. In the experiment, ventricular cardiomyocytes were isolated from 12 outbred male mice. 2 groups were formed: group № 1 – control ventricular cardiomyocytes; group № 2 – ventricular cardiomyocytes after two hours incubation with 5 µmol/L empagliflozin solution. Transmembrane calcium currents were recorded and intracellular calcium transients were assessed.

Results and discussion. Incubation of ventricular cardiomyocytes with empagliflozin significantly increased I_{Ca} current density and accelerated Ca^{2+} temporal dynamics. The amplitude of the Ca^{2+} wave and the rate of rise and decay were increased and the duration of the Ca^{2+} wave was shortened.

Conclusion. The result of the experiment indicates that empagliflozin is able to modulate Ca^{2+} -dependent mechanism of the excitation-contraction-coupling, enhancing and accelerating Ca^{2+} release into cytoplasm and reuptake. This presumably can optimize, namely reduce the time of systole and enhance it, which may be one of the important elements in the manifestation of empagliflozin antiarrhythmic properties.

Keywords: sodium-glucose co-transporter 2 Inhibitors, isolated ventricular cardiomyocytes, transmembrane calcium currents

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. Alexey V. Karpushev, Dmitry Yu. Ivkin and Marina V. Krasnova – conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing. Alexey V. Karpushev, Valeria B. Mikhailova. and Ekaterina S. Klimenko – performing animal experiments, collection, and assembly of data. Sergey V. Okovityi and Alexander N. Kulikov – conception and design, administrative support. All authors participated in the discussion of the results. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 22-15-00186).

For citation: Karpushev A. V., Krasnova M. V., Ivkin D. Yu., Mikhailova V. B., Klimenko E. S., Okovityi S. V., Kulikov A. N. Possible mechanism of effect of the empagliflozin on cardiovascular mortality. *Drug development & registration*. 2024;13(4):223–230. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1868>

О возможном механизме влияния эмпаглифлозина на сердечно-сосудистую смертность

А. В. Карпушев¹, М. В. Краснова², Д. Ю. Ивкин^{2✉}, В. Б. Михайлова³, Е. С. Клименко³,
С. В. Оковитый², А. Н. Куликов⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН). 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, литера А

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России). 197341, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

⁴ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8

✉ Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ORCID: А. В. Карпушев – <https://orcid.org/0000-0001-8437-6424>;

М. В. Краснова – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>;

Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

В. Б. Михайлова – <https://orcid.org/0000-0001-9037-0045>;

Е. С. Клименко – <https://orcid.org/0000-0003-3404-897X>;

С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>;

А. Н. Куликов – <https://orcid.org/0000-0003-0305-4787>.

Статья поступила: 08.07.2023

Статья принята в печать: 16.10.2024

Статья опубликована: 17.10.2024

Резюме

Введение. Развитие сердечной недостаточности тесно связано с появлением жизнеугрожающих аритмий, которые нередко являются терминальным событием для данных пациентов. Анализ рандомизированных клинических исследований ингибиторов натрий-глюкозного котранспортера 2 типа свидетельствует о клинически значимом потенциале данных препаратов как средств с антиаритмическими свойствами. Однако полный механизм, за счет которого может реализоваться данный эффект, в настоящий момент все еще остается до конца не изученным.

Цель. Оценка влияния эмпаглифлозина на трансмембранные токи кальция и внутриклеточные кальциевые переходные процессы на изолированных желудочковых кардиомиоцитах мышей в условиях нормогликемии.

Материалы и методы. В эксперименте проводили выделение желудочковых кардиомиоцитов от 12 аутбредных мышей самцов. Были сформированы 2 группы: группа № 1 – контрольные желудочковые кардиомиоциты; группа № 2 – желудочковые кардиомиоциты после двух часовой инкубации с 5 $\mu\text{моль/л}$ раствором эмпаглифлозина. Выполнялись запись трансмембранных токов кальция и оценка внутриклеточных кальциевых переходных процессов.

Результаты и обсуждение. Инкубация желудочковых кардиомиоцитов в присутствии эмпаглифлозина значительно увеличила плотность тока I_{Ca} и ускорила временную динамику Ca^{2+} . Амплитуда волны Ca^{2+} и скорость нарастания и затухания были увеличены, а продолжительность волны была сокращена.

Заключение. Результат эксперимента указывает на то, что эмпаглифлозин способен модулировать Ca^{2+} -зависимый механизм электромеханического сопряжения, усиливая и ускоряя выход Ca^{2+} в цитоплазму и обратный его захват. Это предположительно оптимизирует, а именно сокращает время систолы и усиливает ее, что может являться одним из важных элементов проявления антиаритмических свойств эмпаглифлозина.

Ключевые слова: ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 типа, изолированные желудочковые кардиомиоциты, трансмембранный ток кальция

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

Вклад авторов. А. В. Карпушев, Д. Ю. Ивкин и М. В. Краснова – концепция и дизайн, анализ и интерпретация данных, написание рукописи. А. В. Карпушев, В. Б. Михайлова и Е. С. Клименко – проведение экспериментов на животных, сбор и обработка данных. С. В. Оковитый и А. Н. Куликов – концепция и дизайн, административная поддержка. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование. Результаты работы получены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 22-15-00186).

Для цитирования: Карпушев А. В., Краснова М. В., Ивкин Д. Ю., Михайлова В. Б., Клименко Е. С., Оковитый С. В., Куликов А. Н. О возможном механизме влияния эмпаглифлозина на сердечно-сосудистую смертность. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):223–230. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1868>

INTRODUCTION

The course of chronic heart failure (CHF) in patients is often complicated by the occurrence of severe life threatening arrhythmias [1]. Sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors (SGLT2is) in a number of clinical trials (EMPEROR, EMBODY, DAPA-HF) has demonstrated a significant increase in protection against the occurrence of life threatening arrhythmias that can lead to sudden cardiac death (SCD) in patients. An extensive meta-analysis of 34 randomized clinical trials has demonstrated that using of SGLT2is is associated with a marked reduction in the risk of atrial arrhythmias and SCD [2].

Empagliflozin, one of the first representatives of SGLT2is, demonstrated its cardioprotective effect [3], has shown its antiarrhythmic potential in a number of preclinical studies. One of the first hypotheses was the possibility of inhibition the sodium-hydrogen exchanger isoform-1 (NHE-1) by the drug, which reduces the intake of Na^+ and Ca^{2+} into the cytoplasm of cardiomyocytes and increases the Ca^{2+} content in mitochondria, however, these data are contradictory [4–6]. In animals with CHF, the use of empagliflozin prevents the activation of late Na^+ current and related arrhythmogenic events [7]. It is assumed that this effect on voltage-dependent Na^+ channels activity is regulated by an indirect mechanism, which may include suppression of the activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and prevention of the CaMKII-dependent Ca^{2+} leakage from the sarcoplasmic reticulum [8]. Ca^{2+} overload is considered as potential factor in the genesis of various serious arrhythmias [9]. However, it is currently unknown whether intracellular Ca^{2+} handling can be an empagliflozin target regardless of Ca^{2+} overload, as an important chain of excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. Can empagliflozin have potential effects on contractile cardiac function through modulation of Ca^{2+} handling?

Thus **the aim of this study** was to evaluate the effect of empagliflozin on transmembrane Ca^{2+} currents and Ca^{2+} transients in isolated ventricular cardiomyocytes of mice.

MATERIALS AND METHODS

The animal study protocol was written in full compliance with the principles of the Basel Declaration, the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (European Treaty Service No. 123, 18 March 1986), and the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 199n (1 April 2016) “On the approval of the Rules of Good Laboratory Practice”. Experimental protocols were approved by Almazov National Medical Research Centre Ethical Committee.

Experimental animals and study object

The weight of male white outbred mice ($n = 12$) after the adaptation period at the beginning of the experiment was 23.6 ± 3.4 g. The animals were kept under 12/12-hour light-dark conditions and received standard feed and drinking water ad libitum.

The following 2 groups were included in the experiment:

- Group №1 – ventricular cardiomyocytes of mice without empagliflozin incubation (Control);
- Group №2 – ventricular cardiomyocytes of mice after two-hour incubation with $5 \mu\text{mol/L}$ empagliflozin solution (Treatment).

Isolation of Ventricular Cardiomyocytes

Intraperitoneal injection of heparin (1000 U/kg) was used to prevent blood coagulation in the coronary vessels of the heart. The mouse was euthanized by decapitation with the use of the rodent guillotine. The chest cavity was opened and the heart was rapidly exci-

sed. The heart was attached to a Langendorff apparatus using aorta cannulation for retrograde perfusion with Ca^{2+} -free solution of the following composition in mmol/L: 116.27 NaCl, 4.03 KCl, 1.66 NaH_2PO_4 , 25.24 NaHCO_3 , 30 taurine, 4.91 Na-pyruvate, 2.2 MgCl_2 , 10 hepes, 11.11 glucose and 1 mg/ml bovine serum albumin, pH 7.2 adjusted with NaOH. After 10 min perfusion with the Ca^{2+} -free solution the heart was perfused for 18–20 min with the same solution containing 0.45 mg/ml type II collagenase (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and 20 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 . The solutions was continuously bubbled with carbogen containing 95 % O_2 and 5 % CO_2 . The temperature was equilibrated at +37 °C. The atriums were removed and ventricular myocardium was destroyed mechanically (by cutting with surgical scissors and gently pipetting) to isolate individual cells. Cardiomyocytes were stored in the Kraftbrühe (KB) medium containing in mmol/L: 50 L-glutamic acid, 20 hepes, 20 taurine, 3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 KCl, 0.5 EGTA, 30 KH_2PO_4 , 10 glucose, pH 7.2 adjusted with KOH. The cells were stored in the KB medium for 2 hours before actual experiments and for up to 5–6 hours.

Recording of Ionic Currents

The whole-cell voltage clamp recordings of Ca^{2+} channel currents I_{Ca} were performed in the freshly isolated ventricular myocytes at +37 °C. Data acquisition was performed with amplifier Axopatch 200B and Clampex software, version 10.3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The ionic currents were acquired at 20–50 kHz and low-pass filtered at 5 kHz using the analog-to-digital interface Digidata 1440A acquisition system (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Patch pipettes of 2.5–3.5 M Ω resistance were pulled from the borosilicate glass B150-110-10 (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) with a puller P-1000 (Sutter Instrument, Novato, CA, USA). The pipette and cell capacities and access resistance were completely compensated. The series resistance was compensated by 85–90 %.

I_{Ca} was recorded in the bath solution contained in mM/L: 130 NaCl, 5 CsCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 5 Na-pyruvate, 10 hepes, 10 glucose, pH 7.4 adjusted with NaOH. The pipette solution contained in mM/L: 130 CsCl, 1 MgCl_2 , 5 EGTA, 10 hepes, 5 MgATP, 15 tetraethylammonium-Cl, pH 7.2 adjusted with CsOH. I_{Ca} was elicited from the holding potential of –50 mV with 200 ms prepulse to –40 mV to inactivate voltage-dependent sodium current and 300 ms depolarizing voltage steps from –40 to +50 mV in 10 mV increment. All pulse protocols were applied more than 5 min after membrane rupture. The current density, I_{Ca} normalized to the cell membrane capacitance, was plotted against the voltage steps. The recorded current traces were analyzed using Clampfit software, version 10.3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Recording of the Ca^{2+} Transients

The intracellular Ca^{2+} transients were recorded in the freshly isolated ventricular myocytes at +37 °C. Cells were loaded with 5 $\mu\text{mol/L}$ Fura-2 AM by 20 min incubation the dark at room temperature in Tyrode solution contained in mmol/L: 140 NaCl, 6 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucose, 10 hepes, pH 7.4 adjusted with NaOH. Fluorescence imaging was performed using a fluorescence photometry setup (IonOptix, Milton, MA, USA). The Ca^{2+} transients were detected with excitation at 340 or 380 nm and emission at 510 nm during a 1-Hz field-stimulation with 10-ms twice-threshold strength square-wave pulses. The fluorescent signal traces were recorded as the ratio of the emissions at the corresponding excitation wavelengths and were analyzed using IonWizard software, version 7.4.3.160 (IonOptix, Milton, MA, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out in STATISTICA v10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). All data are presented as mean values $\pm$ standard-error-of-mean (SEM). Data were tested for normality using the Shapiro–Wilk test, then tested for significant differences using the unpaired Mann-Whitney test. The significance threshold was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Effects of Empagliflozin on the Ca^{2+} Channel Current

We demonstrate that 2 hours incubation with 5 $\mu\text{mol/L}$ empagliflozin significantly increased the current density of I_{Ca} in the wild-type mice (Group № 2) ventricular myocytes (figure 1, table 1). This result indicate that empagliflozin is able to modulate, namely enhance, the Ca^{2+} channel activity.

Table 1. I_{Ca} peak current density at 0 mV, pA/pF

Group/Parameters	I_{Ca} peak current density at 0 mV
Group № 1 – control	13.1 $\pm$ 1.5
Group № 2 – treatment	18.0 $\pm$ 1.4
p-value	$p = 0.0301$

Effects of Empagliflozin on the Ca^{2+} transients

We evaluated parameters of the intracellular Ca^{2+} transients in mouse ventricular myocytes. 2 hours incubation with 5 $\mu\text{mol/L}$ empagliflozin significantly accelerated the Ca^{2+} transient dynamics in the control mice ventricular myocytes. The Ca^{2+} wave amplitude and rate of rise and decay were increased and wave duration was shortened (figure 2, table 2).

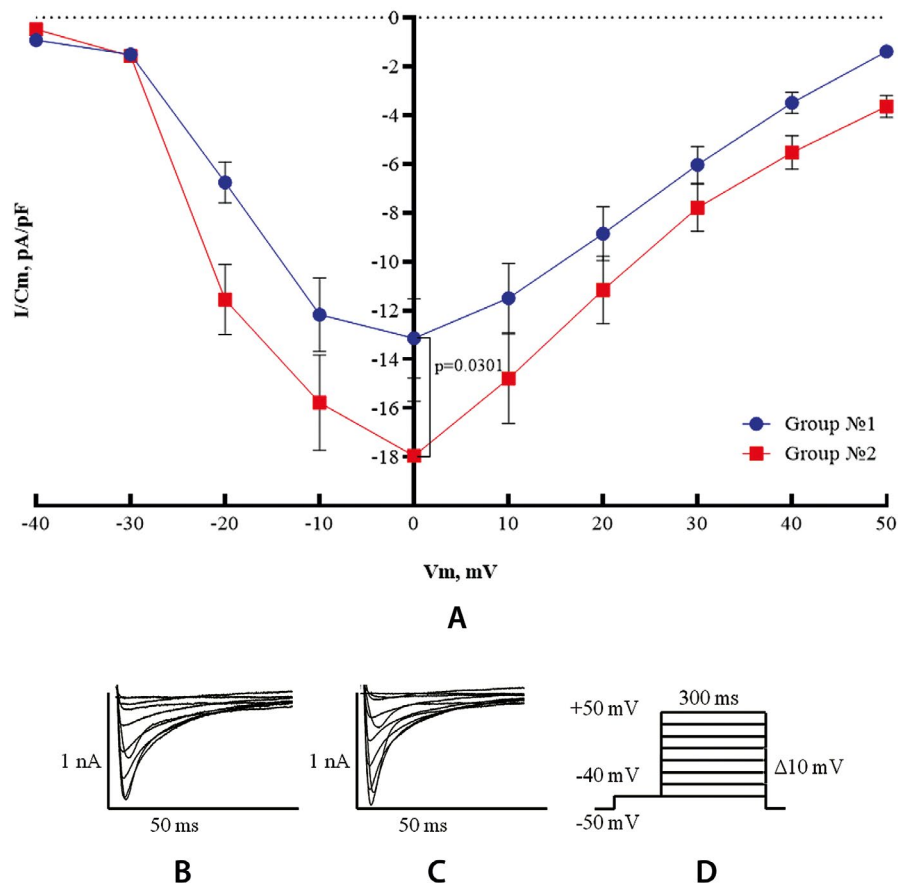


Figure 1. The I_{Ca} current density in the ventricular myocytes of wild-type mice:

A – The current density–voltage relationship of the I_{Ca} in mouse ventricular cardiomyocytes. Insert shows the voltage clamp protocol; **B** – Representative whole–cell current traces of I_{Ca} in ventricular cardiomyocytes in Group № 1; **C** – Representative whole–cell current traces of I_{Ca} in ventricular cardiomyocytes in Group № 2; **D** – Test Stimulus Delivery Protocol.

Note: Group № 1 – control; Group №2 – treatment

Taken together experimental data, we can conclude that empagliflozin has a modulating effect on the entire Ca^{2+} -dependent mechanism of the excitation-contraction-coupling.

Table 2. Parameters of the intracellular Ca^{2+} transients.

Parameters/ Group	Group № 1 control	Group № 2 treatment	p-value
Ca^{2+} wave amplitude	$0,096 \pm 0,005$	$0,134 \pm 0,007$	$p < 0,0001$
Rate of rise	$1,232 \pm 0,072$	$1,875 \pm 0,095$	$p < 0,0001$
Rate of decay	$0,555 \pm 0,033$	$0,847 \pm 0,047$	$p < 0,0001$
Ca^{2+} wave duration at 10 % decay	$0,173 \pm 0,003$	$0,148 \pm 0,002$	$p < 0,0001$
Ca^{2+} wave duration at 50 % decay	$0,256 \pm 0,005$	$0,218 \pm 0,004$	$p < 0,0001$
Ca^{2+} wave duration at 90 % decay	$0,519 \pm 0,013$	$0,473 \pm 0,012$	$p = 0,0094$

DISCUSSION

SGLT2 inhibitors have attracted significant research interest due to a number of clinical trials and researches demonstrating the substantial benefits of these drugs in the therapy of heart failure by lowering the risk of cardiovascular events, hospitalization, and mortality [10–11]. Despite the fact that cardiac SGLT2 expression is negligible [12–14], SGLT2 inhibitors appear to have cardio-specific effects on pathophysiological molecular mechanisms in the cell. One of the empagliflozin targets in cardiomyocytes has been suggested the sodium-hydrogen exchanger [4–6; 15–17]. Next target for the SGLT2 inhibitors may be considered the late Na^{+} current [7; 17–19]. Another important mechanism, which may be clinically beneficial, is Ca^{2+} handling [20]. Intracellular Ca^{2+} is a critical initiator of the contractile cycle in cardiac myocytes [21]. Therefore, proper regulation of Ca^{2+} dynamics is significant for normal heart function.

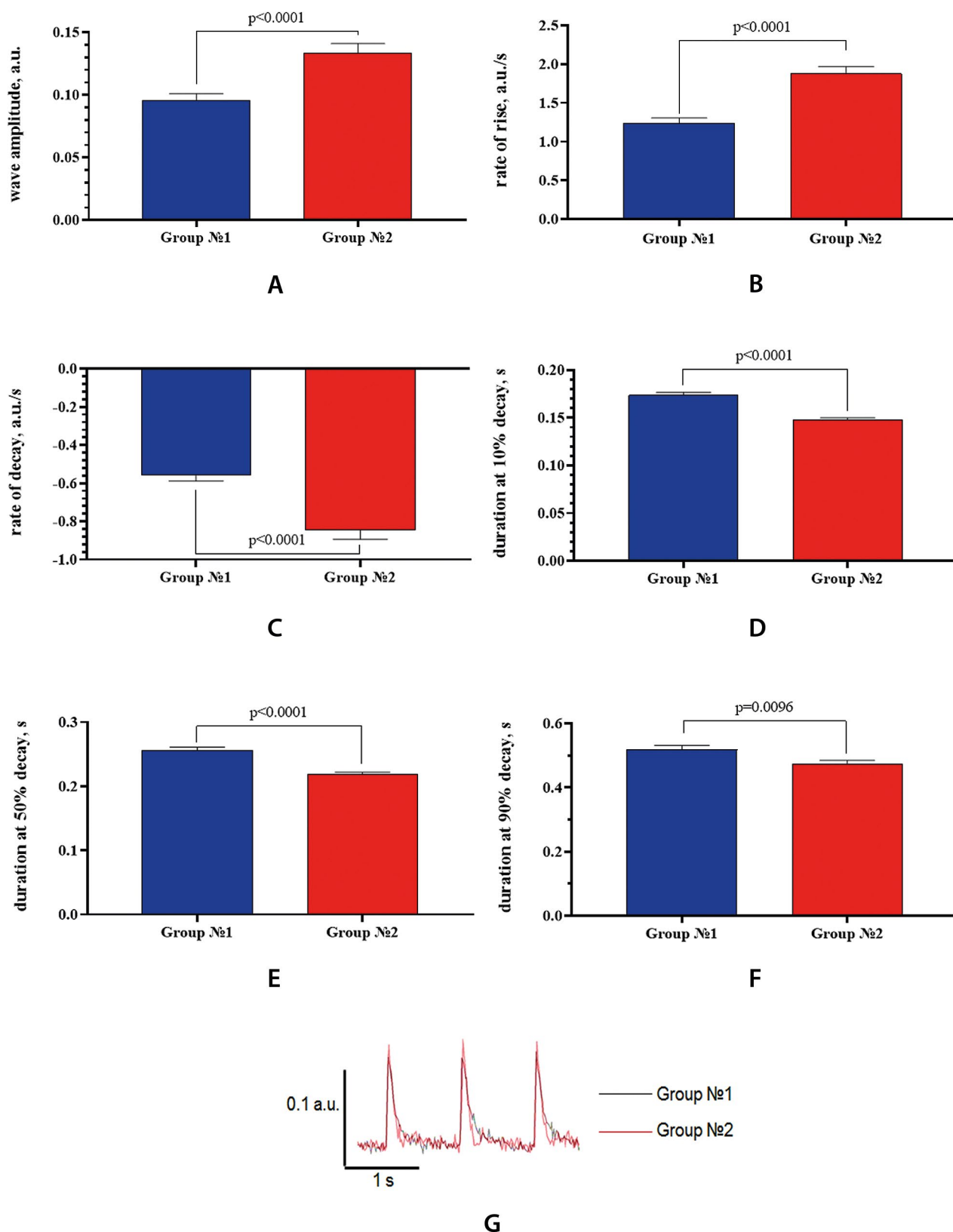


Figure 2. Parametrs of Ca²⁺ wave:

A – Ca²⁺ wave amplitude; **B** – Ca²⁺ wave rate of rise; **C** – Ca²⁺ wave rate of decay; **D** – Ca²⁺ wave duration at 10 % decay; **E** – Ca²⁺ wave duration at 50 % decay, **F** – Ca²⁺ wave duration at 90 % decay; **G** – Representative Ca²⁺ wave traces

Note: Group № 1 – control; Group № 2 – treatment

The present study was designed to determine the potential effects of empagliflozin on the intracellular Ca^{2+} kinetics and handling. For this purpose we focused in estimating the effects of the SGLT2 inhibitor on the Ca^{2+} channel current and the Ca^{2+} transients [22]. Our experiments have shown that empagliflozin increased the current density of I_{Ca} , accelerated the Ca^{2+} transient dynamics, and increased the Ca^{2+} transient amplitude in cardiac myocytes of healthy outbred mice. The data from our experiments are consistent with the data from previous study, which showed that 24 hrs of empagliflozin exposure significantly increased the amplitude and reduced the half-time for the recovery of the Ca^{2+} transients [23]. Additionally, it should be noted, that empagliflozin normalizes impaired kinetics of the Ca^{2+} transients and restores reduced current density of I_{Ca} in ventricular cardiomyocytes from animal models of diabetes mellitus [17] and diabetic cardiomyopathy [24]. However, Pabel and colleagues (2020) failed to observe empagliflozin effects on the Ca^{2+} transient amplitude and kinetics, diastolic Ca^{2+} levels, and sarcoplasmic Ca^{2+} load in human cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells after chronic treatment with empagliflozin [25]. It is also noteworthy that another representative of the class of SGLT2 inhibitors dapagliflozin was shown to reduce the amplitude of the Ca^{2+} transients and I_{Ca} in rat ventricular myocytes [26].

The cardiac beneficial effects of SGLT2 inhibitors treatment in terms of Ca^{2+} handling are thought to include the prevention of intracellular Ca^{2+} overload [28]. This is thought to result from the inhibition of ryanodine receptor 2 phosphorylation, which prevents Ca^{2+} leakage, and from increased reuptake of Ca^{2+} into the sarcoplasmic reticulum due to enhanced SERCA2a function [17; 24, 28, 29]. The latter explains the decrease in the decay time of the Ca^{2+} transients. The assessment provided in this study allows speculating that the enhanced and accelerated intracellular Ca^{2+} dynamics might reflect empagliflozin's ability to optimize the force and timing of the cardiac contractile cycle, to reduce the time of systole. Presumably, this may be one of the important elements in the manifestation of empagliflozin antiarrhythmic properties. Thus we hypothesize the presence of an additional cardioprotective effect of empagliflozin associated with contractile function. This hypothesis is supported by the results of a recent large meta-analysis of studies in humans, which convincingly confirmed the ability of NGLT2-inhibitors to increase the left ventricular ejection fraction [30].

CONCLUSION

The result of the experiment indicates that empagliflozin is able to modulate Ca^{2+} -dependent mechanism of the excitation-contraction-coupling, enhancing and accelerating Ca^{2+} release into cytoplasm and reuptake. This presumably can optimize, namely reduce the time

of systole and enhance it, which may be one of the important elements in the manifestation of empagliflozin antiarrhythmic properties.

REFERENCES

1. Santos-Gallego C. G., Vargas-Delgado A. P., Requena-Ibanez J. A., Garcia-Ropero A., Mancini D., Pinney S., Macaluso F., Sartori S., Roque M., Sabatel-Perez F., Rodriguez-Cordero A., Zafar M. U., Fergus I., Atallah-Lajam F., Contreras J. P., Varley C., Moreno P. R., Abascal V. M., Lala A., Tamler R., Sanz J., Fuster V., Badimon J. J. Randomized Trial of Empagliflozin in Nondiabetic Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2021;77(3):243–255. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.008.
2. Fernandes G. C., Fernandes A., Cardoso R., Penalver J., Knijnik L., Mitrani R. D., Myerburg R. J., Goldberger J. J. Association of SGLT2 inhibitors with arrhythmias and sudden cardiac death in patients with type 2 diabetes or heart failure: A meta-analysis of 34 randomized controlled trials. *Heart Rhythm*. 2021;18(7):1098–1105. DOI: 10.1016/j.hrthm.2021.03.028.
3. Zinman B., Wanner C., Lachin J. M., Fitchett D., Bluhmki E., Hantel S., Mattheus M., Devins T., Johansen O. E., Woerle H. J., Broedl U. C., Inzucchi S. E. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(22):2117–2128. DOI: 10.1056/NEJMoa1504720.
4. Baartscheer A., Schumacher C. A., Wüst R. C. I., Fiolet J. W. T., Stienen G. J. M., Coronel R., Zuurbier C. J. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na^+ through inhibition of the cardiac Na^+/H^+ exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia*. 2017;60(3):568–573. DOI: 10.1007/s00125-016-4134-x.
5. Uthman L., Baartscheer A., Bleijlevens B., Schumacher C. A., Fiolet J. W. T., Koeman A., Jancev M., Hollmann M. W., Weber N. C., Coronel R., Zuurbier C. J. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na^+/H^+ exchanger, lowering of cytosolic Na^+ and vasodilation. *Diabetologia*. 2018;61(3):722–726. DOI: 10.1007/s00125-017-4509-7.
6. Chung Y. J., Park K. C., Tokar S., Eykyn T. R., Fuller W., Pavlovic D., Swietach P., Shattock M. J. Off-target effects of sodium-glucose co-transporter 2 blockers: Empagliflozin does not inhibit Na^+/H^+ exchanger-1 or lower $[\text{Na}^+]_i$ in the heart. *Cardiovascular Research*. 2021;117(14):2794–2806. DOI: 10.1093/cvr/cvaa323.
7. Hegyi B., Mira Hernandez J., Shen E. Y., Habibi N. R., Bosuyt J., Bers D. M. Empagliflozin Reverses Late Na^+ Current Enhancement and Cardiomyocyte Proarrhythmia in a Translational Murine Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2022;145(13):1029–1031. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057237.
8. Muströph J., Wagemann O., Lucht C. M., Trum M., Hammer K. P., Sag C. M., Lebek S., Tarnowski D., Reinders J., Perbellini F., Terracciano C., Schmid C., Schopka S., Hilker M., Zausig Y., Pabel S., Sossalla S. T., Schweda F., Maier L. S., Wagner S. Empagliflozin reduces Ca^2+ /calmodulin-dependent kinase II activity in isolated ventricular cardiomyocytes. *ESC Heart Failure*. 2018;5:642–648. DOI: 10.1002/ehf2.12336.

9. Siri-Angkul N., Xie L.-H., Chattipakorn S.C., Chattipakorn N. Cellular Electrophysiology of Iron-Overloaded Cardiomyocytes. *Frontiers in Physiology*. 2018;9:1615. DOI: 10.3389/fphys.2018.01615.
10. Munteanu M. A., Swarnkar S., Popescu R.-I., Lungu A., Cio-botaru L., Nicolae C., Tufanoiu E., Nanea I.T. SGLT2 Inhibitor: an Emerging Pillar in Heart Failure Therapeutics? *Maedica*. 2023;18(1):102–110. DOI: 10.26574/maedica.2023.18.1.102.
11. Wahinya M., Khan Z. Sodium-Glucose Cotransporter-2 (SGLT2) Inhibitor Therapy for the Primary and Secondary Prevention of Heart Failure in Patients With and Without Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Cureus*. 2023;15(4):e37388. DOI: 10.7759/cureus.37388.
12. Vrhovac I., Balen Eror D., Klessen D., Burger C., Breljak D., Kraus O., Radović N., Jadrijević S., Aleksic I., Walles T., Sauvant C., Sabolić I., Koepsell H. Localizations of Na⁺-d-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. 2015;467(9):1881–1898. DOI: 10.1007/s00424-014-1619-7.
13. Chen J., Williams S., Ho S., Loraine H., Hagan D., Whaley J.M., Feder J.N. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Therapy*. 2010;1(2):57–92. DOI: 10.1007/s13300-010-0006-4.
14. Zhou L., Cryan E.V., D'Andrea M.R., Belkowski S., Conway B.R., Demarest K.T. Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003;90(2):339–346. DOI: 10.1002/jcb.10631. PMID: 14505350.
15. Uthman L., Nederlof R., Eerbeek O., Baartscheer A., Schumacher C., Buchholtz N., Hollmann M.W., Coronel R., Weber N.C., Zuurbier C.J. Delayed ischaemic contraction onset by empagliflozin associates with NHE1 inhibition and is dependent on insulin in isolated mouse hearts. *Cardiovascular Research*. 2019;115(10):1533–1545. DOI: 10.1093/cvr/cvz004.
16. Trum M., Riechel J., Lebek S., Pabel S., Sossalla S.T., Hirt S., Arzt M., Maier L.S., Wagner S. Empagliflozin inhibits Na⁺/H⁺ exchanger activity in human atrial cardiomyocytes. *ESC Heart Failure*. 2020;7(6):4429–4437. DOI: 10.1002/ehf2.13024.
17. Lee T.-I., Chen Y.-C., Lin Y.-K., Chung C.-C., Lu Y.-Y., Kao Y.-H., Chen Y.-J. Empagliflozin Attenuates Myocardial Sodium and Calcium Dysregulation and Reverses Cardiac Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(7):1680. DOI: 10.3390/ijms20071680.
18. Philippaert K., Kalyanamoorthy S., Fatehi M., Long W., Soni S., Byrne N.J., Barr A., Singh J., Wong J., Palechuk T., Schneider C., Darwesh A.M., Maayah Z.H., Seubert J.M., Barakat K., Dyck J.R.B., Light P.E. Cardiac Late Sodium Channel Current Is a Molecular Target for the Sodium/Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Empagliflozin. *Circulation*. 2021;143(22):2188–2204. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.053350.
19. Hegyi B., Hernandez J.M., Ko C.Y., Hong J., Shen E.Y., Spencer E.R., Smoliarchuk D., Navedo M.F., Bers D.M., Bossuyt J. Diabetes and Excess Aldosterone Promote Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of the American Heart Association*. 2022;11(23):e027164. DOI: 10.1161/JAHA.122.027164.
20. Hegyi B., Bers D.M. New cardiac targets for empagliflozin: O-GlcNAcylation, CaMKII, and calcium handling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2023;324(3):H338–H340. DOI: 10.1152/ajpheart.00003.2023.
21. Szedlak P., Steele D.S., Hopkins P.M. Cardiac muscle physiology. *BJA Education*. 2023;23(9):350–357. DOI: 10.1016/j.bjae.2023.05.004.
22. Karpushev A.V., Mikhailova V.B., Klimenko E.S., Kulikov A.N., Ivkin D.Y., Kaschina E., Okovityi S.V. SGLT2 Inhibitor Empagliflozin Modulates Ion Channels in Adult Zebrafish Heart. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23:9559. DOI: 10.3390/ijms23179559.
23. Silva Dos Santos D., Turaça L.T., da Silva Coutinho K.C., Andrade Quintanilha Barbosa R., Polidoro J.Z., Katsai-Brunswick T.H., Campos de Carvalho A.C., Castello Costa Girardi A. Empagliflozin reduces arrhythmogenic effects in rat neonatal and human iPSC-derived cardiomyocytes and improves cytosolic calcium handling at least partially independent of NHE1. *Scientific Reports*. 2023;13(1):8689. DOI: 10.1038/s41598-023-35944-5.
24. Kadosaka T., Watanabe M., Natsui H., Koizumi T., Nakao M., Koya T., Hagiwara H., Kamada R., Temma T., Karube F., Fujiyama F., Anzai T. Empagliflozin attenuates arrhythmogenesis in diabetic cardiomyopathy by normalizing intracellular Ca²⁺ handling in ventricular cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2023;324(3):H341–H354. DOI: 10.1152/ajpheart.00391.2022.
25. Pabel S., Reetz F., Dybkova N., Shomroni O., Salinas G., Mastroph J., Hammer K.P., Hasenfuss G., Hamdani N., Maier L.S., Streckfuss-Bömeke K., Sossalla S. Long-term effects of empagliflozin on excitation-contraction coupling in human induced pluripotent stem cell cardiomyocytes. *Journal of Molecular Medicine*. 2020;98(12):1689–1700. DOI: 10.1007/s00109-020-01989-6.
26. Hamouda N.N., Sydorenko V., Qureshi M.A., Alkaabi J.M., Oz M., Howarth F.C. Dapagliflozin reduces the amplitude of shortening and Ca(2+) transient in ventricular myocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2015;400(1–2):57–68. DOI: 10.1007/s11010-014-2262-5.
27. Jing Yu., Yang R., Chen W., Ye Q. Anti-Arrhythmic Effects of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:898718. DOI: 10.3389/fphar.2022.898718.
28. Hammoudi N., Jeong D., Singh R., Farhat A., Komajda M., Mayoux E., Hajjar R., Lebeche D. Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2017;31(3):233–246. DOI: 10.1007/s10557-017-6734-1.
29. Goerg J., Sommerfeld M., Greiner B., Lauer D., Seckin Y., Kulikov A., Ivkin D., Kintscher U., Okovityi S., Kaschina E. Low-Dose Empagliflozin Improves Systolic Heart Function after Myocardial Infarction in Rats: Regulation of MMP9, NHE1, and SERCA2a. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5437. DOI: 10.3390/ijms22115437.
30. Chen J., Jiang C., Guo M., Zeng Y., Jiang Z., Zhang D., Tu M., Tan X., Yan P., Xu X., Long Y., Xu Y. Effects of SGLT2 inhibitors on cardiac function and health status in chronic heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovascular Diabetology*. 2024;23(1):2. DOI: 10.1186/s12933-023-02042-9.

Оригинальная статья / Research article

УДК 578.832.1; 616.36; 577.161.22

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1857>



Влияние сапонины таурозиды Sx1 на продолжительность жизни и экспрессию рецепторов к витамину D в ткани печени мышей на фоне гриппозной инфекции

Т. П. Сатаева✉, В. Ю. Малыгина, Т. П. Макалиш, М. А. Кривенцов, А. К. Гуртовая

Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С. И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (КФУ имени В. И. Вернадского). 295000, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, бульвар Ленина, д. 5–7

✉ **Контактное лицо:** Сатаева Татьяна Павловна. **E-mail:** tanzcool@mail.ru

ORCID: Т. П. Сатаева – <https://orcid.org/0000-0001-6451-7285>;
В. Ю. Малыгина – <http://orcid.org/0000-0002-7681-6773>;
Т. П. Макалиш – <https://orcid.org/0000-0003-1884-2620>;
М. А. Кривенцов – <https://orcid.org/0000-0001-5193-4311>;
А. К. Гуртовая – <https://orcid.org/0000-0001-8633-1166>.

Статья поступила: 02.07.2024

Статья принята в печать: 07.11.2024

Статья опубликована: 08.11.2024

Резюме

Введение. Развитие гриппозной инфекции нередко сопровождается гепатитом, механизм патогенеза которого до конца не изучен. Согласно литературным данным, дефицит витамина D, участвующего в регуляции иммунного ответа, является одним из факторов риска возникновения ОРВИ. Известно, что некоторые растительные соединения способны взаимодействовать с рецептором витамина D (VDR). Подобными активаторами могут быть сапонины, которые нашли применение в клинической практике благодаря широкому спектру биологической и фармакологической активности, противовирусные механизмы которой являются малоизученными.

Цель. Исследовать влияние перорального введения сапонины таурозиды Sx1, полученного из крымского плюща, на продолжительность жизни и активацию рецепторов к витамину D в печени мышей при гриппозной инфекции различной степени тяжести.

Материалы и методы. В эксперименте были использованы 11 подгрупп, сформированных из самцов мышей BALB/c с гриппозной инфекцией различной степени тяжести в зависимости от введения им инфицирующей дозы 5 ЛД₅₀ или 10 ЛД₅₀ вируса, включая контроль. В качестве корректора применяли сапонин таурозид Sx1. Иммуногистохимическое исследование проводили в автоматическом режиме в иммуногистостейнере BOND-MAX (Leica, Германия). Использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к рецептору витамина D.

Результаты и обсуждение. На фоне введения таурозиды Sx1 в дозе 200 мкг/мышь/сутки на 4,6 дня увеличивается средняя продолжительность жизни животных, получавших сапонин. Снижение инфицирующей дозы вируса гриппа (ВГ) с 10 ЛД₅₀ до 5 ЛД₅₀ также изменило срок начала гибели животных на 2 дня в обеих группах. При различной инфицирующей дозе вируса на 10-й день эксперимента в подгруппах без коррекции изменяется экспрессия рецепторов к витамину D. В подгруппе 2V количество суммарных положительных клеток было ниже, чем в контрольной группе. При этом в подгруппе 2Vir экспрессия VDR была значительно выше группы контроля.

Заключение. Исследуемый сапонин таурозид Sx1 в дозе 200 мкг/мышь/сутки оказывает противовирусный эффект при экспериментальном инфицировании мышей вирусом гриппа A/H1N1, который проявляется увеличением средней продолжительности жизни животных (на 4,6 дня) и уменьшением процента летальности при тяжелой гриппозной инфекции в сравнении с контрольной группой. Введение сапонины на 4-й день эксперимента во всех подгруппах снижает общее количество иммунных клеток, интенсивно экспрессирующих VDR.

Ключевые слова: тритерпеновый сапонин, вирус гриппа типа A (H1N1), рецептор к витамину D

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

© Сатаева Т. П., Малыгина В. Ю., Макалиш Т. П., Кривенцов М. А., Гуртовая А. К., 2024

© Sataieva T. P., Maligina V. Yu., Makalish T. P., Kriventsov M. A., Gurtovaya A. K., 2024

Вклад авторов. Т.П. Сатаева – научное руководство работой, разработка дизайна рукописи и ее написание, анализ и интерпретация статистических данных. В.Ю. Малыгина – сбор данных, выполнение практической части исследования, написание рукописи. Т.П. Макалиш – выполнение практической части исследования. М.А. Кривенцов и А.К. Гуртовая – анализ и интерпретация статистических данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Источник финансирования. Исследование поддержано грантом РФФ 23-15-20015, соглашение от 20.04.2023.

Для цитирования: Сатаева Т.П., Малыгина В.Ю., Макалиш Т.П., Кривенцов М.А., Гуртовая А.К. Влияние сапонина таурозида Sx1 на продолжительность жизни и экспрессию рецепторов к витамину D в ткани печени мышей на фоне гриппозной инфекции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):231–237. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1857>

Influence of saponin tauroside Sx1 on lifespan and expression of vitamin D receptors in the liver tissue of mice with influenza infection

Tatiana P. Sataieva✉, Veronika Yu. Maligina, Tatiana P. Makalish, Maxim A. Kriventsov, Anna K. Gurtovaya

V. I. Vernadsky Crimean Federal University. 5–7, bulvar Lenina, Simferopol, Republic of Crimea, 295000, Russia

✉ **Corresponding author:** Tatiana P. Sataieva. **E-mail:** tanzcool@mail.ru

ORCID: Tatiana P. Sataieva – <https://orcid.org/0000-0001-6451-7285>;
Veronika Yu. Maligina – <http://orcid.org/0000-0002-7681-6773>;
Tatiana P. Makalish – <https://orcid.org/0000-0003-1884-2620>;
Maxim A. Kriventsov – <https://orcid.org/0000-0001-5193-4311>;
Anna K. Gurtovaya – <https://orcid.org/0000-0001-8633-1166>.

Received: 02.07.2024

Accepted: 07.11.2024

Published: 08.11.2024

Abstract

Introduction. Respiratory infections, including influenza, are often accompanied by hepatitis in humans which pathogenesis is not fully understood. According to the available data D deficiency is presumably a risk factor in the occurrence of acute respiratory viral infections due to its modulation of immune response. Recent studies indicate that several plant compounds can interact with vitamin D receptors (VDRs) and modulate the activity of VDRs. The biologically active components saponins have found widespread use in clinical practice due to their wide range of biological and pharmacological effects which mechanisms are still largely unclear.

Aim. To study the effect of oral administration of saponin tauroside Sx1, obtained from Crimean ivy, on life expectancy and activation of vitamin D receptors in the liver of mice during experimental viral infection of varying severity.

Materials and methods. The 11 subgroups were formed from male BALB/c mice, were used in the experiment depending on the infectious dose of influenza virus, 5 LD₅₀ virus or 10 LD₅₀ virus, respectively, including control. Saponin tauroside Sx1 was used as a corrector. Immunohistochemical studies were carried out automatically in a BOND-MAX immunohistainer (Leica, Germany). Primary rabbit polyclonal antibodies to the vitamin D receptor were used.

Results and discussion. Due to the administration of tauroside Sx1 at a dose of 200 µg/mouse/day increases the average life expectancy of animals receiving saponin by 4.6 days. Reducing the infectious dose of IV from 10 LD₅₀ to 5 LD₅₀ also changed the onset of death of animals by 2 days in both groups. With different infectious doses of the virus, on the 10th day of the experiment in the subgroups, the expression of vitamin D receptors changes without correction. In subgroup 2V, the number of total positive cells was lower than the control group. Moreover, in the 2Vir subgroup, VDR expression was significantly higher than the control group.

Conclusion. The saponin tauroside Sx1 at a dose of 200 µg/mouse/day has a fairly pronounced antiviral effect during experimental infection of mice with the influenza A/H1N1 virus, which is manifested by an increase in the average life expectancy of animals (for 4.6 days) and a decrease in the mortality rate during severe influenza infection, compared with the control group, where 100 % mortality was observed by the 14th day of the experiment. The introduction of saponin on the 4th day of the experiment in all subgroups reduces the total number of immune cells that intensively express VDR.

Keywords: triterpene saponin, Influenza virus type A (H1N1), vitamin D receptors

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

Contribution of the authors. Tatiana P. Sataieva – scientific supervision of the work, development of the design of the manuscript and its writing, analysis and interpretation of statistical data. Veronika Yu. Maligina – collecting data, performing the practical part of the study, writing the manuscript. Maxim A. Kriventsov and Anna K. Gurtovaya – analysis and interpretation of statistical data. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant 23-15-20015, agreement dated 04/20/2023.

For citation: Sataieva T. P., Maligina V. Yu., Makalish T. P., Kriventsov M. A., Gurtovaya A. K. Influence of saponin tauroside Sx1 on lifespan and expression of vitamin D receptors in the liver tissue of mice with influenza infection. *Drug development & registration*. 2024;13(4):231–237. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1857>

ВВЕДЕНИЕ

В Российской Федерации более 30 млн человек ежегодно болеют гриппом и ОРВИ, что составляет свыше 90 % в структуре инфекционной заболеваемости¹. Выявлено, что при пневмонии, вызванной гриппом H1N1/09, возможно развитие полиорганной недостаточности, в том числе и поражение печени [1]. Благодаря способности синтезировать фактор воспаления реактивный белок С печень играет большую роль при вирусных поражениях. При гриппозной инфекции нередко развивается клеточно-опосредованный гепатит, который обычно протекает в легкой форме и не диагностируется. Механизм такого рода поражения печени до конца не изучен [2].

В последние годы активно изучается влияние витамина D на иммунитет и воспаление. Дефицит витамина D, предположительно, является фактором риска возникновения ОРВИ и может определять силу их тяжести [3–6]. Рецептор витамина D (VDR) является ДНК-связывающим транскрипционным фактором, который экспрессируется на моноцитах периферической крови и активированных Т-лимфоцитах. VDR, как ядерный рецептор, действует как лиганд-стимулируемый фактор транскрипции и активирует метаболит 1,25(OH)2D3 на транскрипционном уровне [7–10].

Активация VDR регулирует иммунный ответ путем ингибирования пролиферации Т-хелперов 1-го типа (Th1) и продукции провоспалительных цитокинов, а также индуцирования пролиферации клеток Th2 [11]. Это объясняет широкую распространенность экспрессии рецепторов витамина D (VDR) среди клеток врожденной и приобретенной иммунной системы [4]. Недавние исследования показывают, что сапонины способны взаимодействовать с VDR и модулировать их активность [12, 13]. Сапонины, являясь биологически активными соединениями, проявляют ряд фармакологических эффектов, таких как противовоспалительные, иммунопотенцирующие [14], антиоксидантные, антипролиферативные, антимикробные и противовирусные [15], механизмы реализации которых малоизучены [16].

¹ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 17 (утв. Министерством здравоохранения РФ 14 декабря 2022 г.). Доступно по: https://nmrc.ru/wpcontent/uploads/2022/12/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V17.pdf. Ссылка активна на 21.04.2023.

Цель. Исследовать влияние перорального введения сапонины таурозида Sx1, выделенного из крымского плюща, на продолжительность жизни и активацию рецепторов к витамину D в печени мышей при экспериментальной гриппозной инфекции различной степени тяжести.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали самцов мышей линии BALB/c весом 16–18 г и возрастом 4–6 недель. Заражение мышей интраназально осуществляли под легким эфирным наркозом, путем введения по 50 мкл аллантоисной жидкости с вирусом гриппа A/WSN/1/33(H1N1). Сапонин животные получали перорально с концентрацией 5 мг/мл (доза 200 мкг/мышь/день) [14, 17]. Животных разделили на следующие группы и подгруппы:

1. Контрольная группа К, получавшая перорально 50 мкл физраствора 3 дня. Вывод из эксперимента (ВиЭ) на 10-й день ($n = 6$).
2. Животные, получавшие перорально сапонин 3 дня: подгруппы KS, ВиЭ на 4-й день ($n = 11$), и 2KS, получавшие сапонин, ВиЭ на 10-й день ($n = 11$).
3. Зараженные животные: подгруппы V и Vir, ВиЭ на 4-й день ($n = 22$), и подгруппы 2V и 2Vir, ВиЭ на 10-й день ($n = 22$).
4. Зараженные животные, получавшие перорально сапонин: подгруппы SV и SVir, ВиЭ на 4-й день ($n = 22$), и подгруппы 2SV и 2SVir, получавшие сапонин, ВиЭ на 10-й день эксперимента ($n = 22$).

В эксперименте в качестве корректора применяли тритерпеновый гликозид с формулой 3-O-а-L-рамнопиранозил-(1 → 2)-а-L-арабинопиранозид хедерагенина, сокращенно – сапонин таурозид Sx1, выделенный в Таврическом национальном университете им. В. И. Вернадского из крымского плюща *Hedera taurica* (Hibberd) Carrière профессором В. И. Гришковцом [18].

Гистологическую оценку тканей печени выведенных из эксперимента животных проводили согласно общепринятым гистологическим методикам [19]. Иммуногистохимическое исследование проводили в автоматическом режиме в иммуногистостейнере BOND-MAX (Leica, Германия). Использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к рецептору витамина D (Affinity, cat. № DF6917, разведение 1 : 100). Визуализацию проводили с системой детекции BOND

Polymer Detection System (Leica, Великобритания). Микроскопический анализ выполняли с помощью системы видеомикроскопии (микроскоп DM2000, камера DFC295, Leica, Германия). Количество позитивных клеток подсчитывали в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$.

Исследование одобрено протоколом заседания комитета по этике № 10 от 23.11.2021 ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского». Работу с животными осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Минвуза № 724 от 13.11.1984).

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ STATISTICA 10.0, используя критерий Шапиро–Уилка для проверки нормальности распределения, дисперсионный анализ, метод Шеффе и критерий Даннета. Уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из таблицы 1, введение таурозида Sx1 увеличивает среднюю продолжительность жизни (СПЖ) зараженных животных при 100 % гибели в контрольной группе к 14-му дню эксперимента, $p < 0,05$.

Таблица 1. Влияние перорального введения сапонина таурозида Sx1 на продолжительность экспериментальной гриппозной инфекции в зависимости от инфицирующей дозы вируса

Table 1. Effect of oral administration of saponin tauroside Sx1 on the duration of experimental influenza infection depending on the infectious dose of the virus

Группа, доза ВГ (ЛД ₅₀) Group, dose of VG (LD ₅₀)	Смертность, % Mortality, %		СПЖ (дни) Average life expectancy (days)	Начало гибели животных (день) Beginning of animal death (day)
	Дни наблюдения Observation days			
	7	14		
V, 5 ЛД ₅₀ V, 5 LD ₅₀	0	73	9,9 ± 1,3	6
SV, 5 ЛД ₅₀ SV, 5 LD ₅₀	0	45	14,5 ± 2,3*	7
Vir, 10 ЛД ₅₀ Vir, 10 LD ₅₀	10	100	6,5 ± 0,7	4
SVir, 10 ЛД ₅₀ SVir, 10 LD ₅₀	10	70	11,1 ± 2,2*	5

Примечание. * Различие средних между группами V и SV, а также Vir и SVir, $p < 0,05$.

Note. * Difference of means between groups V and SV, as well as Vir and SVir, $p < 0.05$.

Из результатов иммуногистохимического исследования, приведенных в таблице 2, следует, что при разных инфицирующих дозах вируса в группах без коррекции наблюдаются различия в экспрессии VDR в зависимости от длительности инфекционного процесса. Так, при инфицирующей дозе ВГ 5 ЛД₅₀ в течение 6 дней экспрессия VDR уменьшалась, а при инфицирующей дозе ВГ 10 ЛД₅₀ – возрастала. Высокий уровень экспрессии VDR в подгруппах без коррекции может, с одной стороны, способствовать восстановлению утраченных клеточных структур, но при этом стимулировать митотическую активность клеток, что необходимо для поддержания репликации вируса гриппа А [20, 21]. При этом в подгруппе 2Vir (инфицирующая доза ВГ 10 ЛД₅₀) экспрессия VDR была значительно интенсивнее, чем в группе контроля. Морфологическая картина в этой подгруппе выявила преобладание числа клеток Купфера и других непаренхиматозных клеток с очень интенсивной экспрессией VDR (+++/++++), что, вероятно, связано с увеличением их численности и активности на фоне нарастающих инфильтративных изменений в паренхиме печени инфицированных мышей.

Введение сапонина контрольной подгруппе животных без инфицирования ВГ (подгруппа KS) к 4-му дню эксперимента способствовало снижению общего количества клеток, экспрессирующих VDR, через 6 дней после введения сапонина (2KS) значимые различия суммарной экспрессии с контрольной подгруппой (K) исчезали.

Аналогичная тенденция при введении сапонина была выявлена и на 4-й день эксперимента вне зависимости от инфицирующей дозы (SV и SVir), где сумма процентов интенсивно окрашенных клеток составляла 24,6 и 20,5 % соответственно и была ниже, чем в группах V и Vir. После введения корректора на 10-й день эксперимента по-прежнему наблюдалось незначимое по сравнению с контролем увеличение экспрессии VDR в подгруппах 2SV и 2SVir, причем в подгруппе 2SVir наблюдался более высокий процент клеток с очень интенсивной экспрессией VDR, чем в подгруппе 2SV ($p < 0,01$).

Выявленную тенденцию умеренного усиления экспрессии VDR можно трактовать с учетом того, что сапонин при вирусных инфекциях в большей степени обеспечивает активацию пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов, чем макрофагов и клеток Купфера, в которых может размножаться вирус гриппа, а также способствует повышению функциональной активности NK-клеток, направленных на непосредственную элиминацию пораженных вирусами клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемый сапонин таурозид Sx1 оказывает довольно выраженный противовирусный эффект при экспериментальном инфицировании мышей вирусом гриппа А/H1N1, который проявляется стати-

Таблица 2. Количество иммунопозитивно окрашенных к VDR клеток печени

Table 2. Number of liver cells immunopositively stained for VDR

Подгруппа Subgroup	Количество положительно окрашенных клеток, % от всех положительно окрашенных Number of positively stained cells, % of all positively stained cells				Сумма положительно окрашенных клеток Sum of positively stained cells
	Интенсивность окрашивания ядра Color intensity of cell nucleus				
	++++	+++	++	+	
K	56,8 ± 5,9	112,2 ± 5,2	91,2 ± 7,9	103,2 ± 3,8	363,4 ± 14,4
	15,6 %	30,9 %	25,1 %	28,4 %	100 %
KS	22,0 ± 6,2	68,0 ± 11,5	73,8 ± 4,1	128,8 ± 7,8	292,6 ± 17,0*
	7,5 %	23,4 %	25,2 %	44,0 %	100 %
2 KS	60,4 ± 3,2	108,6 ± 9,5	82,4 ± 6,2	87,6 ± 3,1	339,0 ± 9,8
	17,8 %	32,0 %	24,3 %	25,8 %	100 %
V	58,4 ± 5,2	127,2 ± 4,4	98,8 ± 5,5	89,6 ± 4,4	374,0 ± 10,2****
	15,6 %	34,0 %	26,4 %	23,9 %	100 %
2V	30,6 ± 4,7	78,6 ± 2,6	71,0 ± 5,3	91,6 ± 7,5	271,8 ± 9,1*/**/****
	11,3 %	28,9 %	26,1 %	33,7 %	100 %
SV	8,8 ± 1,7	63,4 ± 5,4	78,4 ± 5,4	142,4 ± 7,0	293,0 ± 7,2*
	3,0 %	21,6 %	26,8 %	48,6 %	100 %
2SV	24,4 ± 4,3	131,2 ± 15,1	76,6 ± 3,9	69,6 ± 3,8	301,8 ± 15,3***
	8,0 %	43,5 %	25,4 %	23,1 %	100 %
Vir	12,0 ± 1,3	125,6 ± 3,1	112,8 ± 4,8	120,4 ± 6,1	370,8 ± 3,9****
	3,2 %	33,9 %	30,4 %	32,5 %	100 %
2Vir	69,2 ± 4,9	171,0 ± 4,7	130,0 ± 3,7	120,0 ± 7,2	490,2 ± 5,9*/**/****
	14,1 %	34,9 %	26,5 %	24,5 %	100 %
SVir	8,4 ± 2,9	55,8 ± 8,4	117,4 ± 9,5	131,4 ± 7,7	313,0 ± 4,1
	2,7 %	17,8 %	37,5 %	41,9 %	100 %
2SVir	82,8 ± 5,1	119,2 ± 5,6	111,0 ± 10,1	112,0 ± 6,4	425,0 ± 11,8***
	19,5 %	28,1 %	26,1 %	26,3 %	100,0 %

Примечание. * Различие средних с контрольной группой, $p < 0,01$.

** Различие средних между группами 2V и 2Vir, $p < 0,01$.

*** Различие средних между группами 2SV и 2SVir, $p < 0,01$.

**** Различие средних между группами V и 2V, а также Vir и 2Vir, $p < 0,01$.

Note. * Difference of means with the control group, $p < 0.01$.

** Difference of means between groups 2V and 2Vir, $p < 0.01$.

*** Difference of means between groups 2SV and 2SVir, $p < 0.01$.

**** Difference of means between groups V and 2V, as well as Vir and 2Vir, $p < 0.01$.

стически значимым увеличением средней продолжительности жизни животных на 4,6 дня ($p < 0,05$) и уменьшением процента летальности при тяжелой гриппозной инфекции в сравнении с контрольной группой без коррекции, где наблюдалась 100%-я гибель к 14 дню эксперимента. Введение сапонина на 4-й день эксперимента во всех подгруппах снижает общее количество иммунных клеток, интенсивно экспрессирующих VDR. Положительные эффекты сапонина могут быть опосредованы механизмами повышения естественной резистентности, вероятным снижением синтеза провоспалительных цитокинов и замедлением миграции клеток макрофагального звена, что приводит к уменьшению масштабов повреждения печени при гриппозной инфекции и требует более детального изучения.

ЛИТЕРАТУРА

- Семененкова А. Н., Штонда М. В., Пристром М. С., Семененков И. И. Поражение печени при коронавирусной инфекции. *Важнейшие достижения отечественной и зарубежной медицинской науки*. 2022;7:12–16.
- Rammaert B., Desjardins A., Lortholary O. New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses*. 2012;55(3):e74–e84. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2012.02182.x.
- Fairchok M., Schofield C., Chen W.-J., Pugh M., Bigg H., Arnold J. C., Millar E. V. Inverse Correlation between 25-OH Vitamin D Levels and Severity of Viral Respiratory Illness in Infants. *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology*. 2017;3(2):030. DOI: 10.23937/2474-3658/1510030.
- Guo C., Rosoha E., Lowry M. B., Borregaard N., Gombart A. F. Curcumin induces human cathelicidin antimicrobial peptide gene expression through a vitamin D receptor-inde-

- pendent pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24(5):754–759. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.002.
5. Di Rosa M., Malaguarnera M., Nicoletti F., Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology*. 2011;34(2):123–139. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03482.x.
 6. Gruber-Bzura B.M. Vitamin D and Influenza—Prevention or Therapy? *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(8):2419. DOI: 10.3390/ijms19082419.
 7. Garand M., Toufiq M., Singh P., Huang S.S.Y., Tomei S., Mathew R., Mattei V., Al Wakeel M., Sharif E., Al Khodor S. Immunomodulatory Effects of Vitamin D Supplementation in a Deficient Population. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):5041. DOI: 10.3390/ijms22095041.
 8. Athanassiou L., Mavragani C.P., Koutsilieris M. The Immunomodulatory Properties of Vitamin D. *Mediterranean Journal of Rheumatology*. 2022;33(1):7–13. DOI: 10.31138/mjr.33.1.7.
 9. Громова О.А., Торшин И.Ю., Спиричев В.Б. Полногеномный анализ сайтов связывания рецептора витамина D указывает на широкий спектр потенциальных применений витамина D в терапии. *Медицинский Совет*. 2016;1(1):12–21. DOI: 10.21518/2079-701X-2016-1-12-21.
 10. Chen X., Wan Z., Geng T., Zhu K., Li R., Lu Q., Lin X., Liu S., Chen L., Guo Y., Shan Z., Liu L., Pan A., Manson J.E., Liu G. Vitamin D Status, Vitamin D Receptor Polymorphisms, and Risk of Microvascular Complications Among Individuals With Type 2 Diabetes: A Prospective Study. *Diabetes Care*. 2023;46(2):270–277. DOI: 10.2337/dc22-0513.
 11. Zhou Q., Qin S., Zhang J., Zhong L., Pen Z., Xing T. 1,25(OH)2D3 induces regulatory T cell differentiation by influencing the VDR/PLC-γ1/TGF-β1/pathway. *Molecular Immunology*. 2017;91:156–164. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.09.006.
 12. Yao M., Oduro P.K., Akintibu A.M., Yan H. Modulation of the vitamin D receptor by traditional Chinese medicines and bioactive compounds: potential therapeutic applications in VDR-dependent diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2024;15:1298181. DOI: 10.3389/fphar.2024.1298181.
 13. Ma Y., Zhao Y., Luo M., Jiang Q., Liu S., Jia Q., Bai Z., Wu F., Xie J. Advancements and challenges in pharmacokinetic and pharmacodynamic research on the traditional Chinese medicine saponins: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*. 2024;15:1393409. DOI: 10.3389/fphar.2024.1393409.
 14. Малыгина В.Ю., Андроновская И.Б., Криворутченко Ю.Л., Гришковец В.И. Сравнение влияния перорального введения сапонина таурозида Sx1 на выработку антител при иммунизации различными противогриппозными вакцинами. *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*. 2018;4(70):125–133.
 15. Сатаева Т.П., Малыгина В.Ю., Кривенцов М.А., Комиссарова В.В., Крутиков П.Е. Влияние тритерпенового гликозида на выживаемость и изменение цитокинового профиля в селезенке мышей линии BALB/c в условиях летальной гриппозной инфекции A/WSN/1/33(H1N1). *Казанский медицинский журнал*. 2024;105(2):251–259. DOI: 10.17816/KMJ623237.
 16. Zhang T., Zhong S., Li T., Zhang J. Saponins as modulators of nuclear receptors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020;60(1):94–107. DOI: 10.1080/10408398.2018.1514580.
 17. Малыгина В.Ю., Андроновская И.Б., Криворутченко Ю.Л., Гришковец В.И. Зависимость протективного действия таурозида Sx1 от доз, способа и схем введения сапонина при экспериментальном гриппе у мышей. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2012;2(1–2):98–102.
 18. Гришковец В.И., Чирва В.Я., Качала В.В., Шашков А.С. Тритерпеновые гликозиды аралиевых: структуры выделенных тритерпеновых гликозидов. *Труды Никитского ботанического сада*. 2007;128:90–102.
 19. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина; 1982.
 20. Charoenngam N., Holick M.F. Immunologic effects of vitamin D on human health and Disease. *Nutrients*. 2020;12(7):2097. DOI: 10.3390/nu12072097.
 21. Bishop E.L., Ismailova A., Dimeloe S., Hewison M., White J.H. Vitamin D and immune regulation: Antibacterial, antiviral, anti-inflammatory. *JBM Plus*. 2021;5(1):e10405. DOI: 10.1002/jbm4.10405.

REFERENCES

1. Semenenkova A.N., Shtonda M.V., Pristrom M.S., Semenkov I.I. Liver damage in coronavirus infection. *Vazhnyeh dostizheniya otechestvennoy i zarubezhnoy meditsinskoj nauki*. 2022;7:12–16. (In Russ.)
2. Rammaert B., Desjardins A., Lortholary O. New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses*. 2012;55(3):e74–e84. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2012.02182.x.
3. Fairchok M., Schofield C., Chen W.-J., Pugh M., Bigg H., Arnold J.C., Millar E.V. Inverse Correlation between 25-OH Vitamin D Levels and Severity of Viral Respiratory Illness in Infants. *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology*. 2017;3(2):030. DOI: 10.23937/2474-3658/1510030.
4. Guo C., Rosoha E., Lowry M.B., Borregaard N., Gombart A.F. Curcumin induces human cathelicidin antimicrobial peptide gene expression through a vitamin D receptor-independent pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24(5):754–759. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.002.
5. Di Rosa M., Malaguarnera M., Nicoletti F., Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology*. 2011;34(2):123–139. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03482.x.
6. Gruber-Bzura B.M. Vitamin D and Influenza—Prevention or Therapy? *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(8):2419. DOI: 10.3390/ijms19082419.
7. Garand M., Toufiq M., Singh P., Huang S.S.Y., Tomei S., Mathew R., Mattei V., Al Wakeel M., Sharif E., Al Khodor S. Immunomodulatory Effects of Vitamin D Supplementation in a Deficient Population. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):5041. DOI: 10.3390/ijms22095041.
8. Athanassiou L., Mavragani C.P., Koutsilieris M. The Immunomodulatory Properties of Vitamin D. *Mediterranean Journal of Rheumatology*. 2022;33(1):7–13. DOI: 10.31138/mjr.33.1.7.
9. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Spirichev V.B. The genome-wide analysis of the vitamin D receptor binding sites evidences a wide range of potential therapeutic applications of vitamin D. *Medical Council*. 2016;1(1):12–21. (In Russ.) DOI: 10.21518/2079-701X-2016-1-12-21.
10. Chen X., Wan Z., Geng T., Zhu K., Li R., Lu Q., Lin X., Liu S., Chen L., Guo Y., Shan Z., Liu L., Pan A., Manson J.E., Liu G. Vitamin D Status, Vitamin D Receptor Polymorphisms, and

- Risk of Microvascular Complications Among Individuals With Type 2 Diabetes: A Prospective Study. *Diabetes Care*. 2023;46(2):270–277. DOI: 10.2337/dc22-0513.
11. Zhou Q., Qin S., Zhang J., Zhon L., Pen Z., Xing T. 1,25(OH)2D3 induces regulatory T cell differentiation by influencing the VDR/PLC- γ 1/TGF- β 1/pathway. *Molecular Immunology*. 2017;91:156–164. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.09.006.
 12. Yao M., Oduro P. K., Akintibu A. M., Yan H. Modulation of the vitamin D receptor by traditional Chinese medicines and bioactive compounds: potential therapeutic applications in VDR-dependent diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2024;15:1298181. DOI: 10.3389/fphar.2024.1298181.
 13. Ma Y., Zhao Y., Luo M., Jiang Q., Liu S., Jia Q., Bai Z., Wu F., Xie J. Advancements and challenges in pharmacokinetic and pharmacodynamic research on the traditional Chinese medicine saponins: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology*. 2024;15:1393409. DOI: 10.3389/fphar.2024.1393409.
 14. Malygina V. Yu., Andronovskaya I. B., Krivorutchenko Yu. L., Grishkovets V. I. A comparison of the effects of saponin tauroside Sx1 oral administration on antibody production during immunization with different anti-influenza vaccines. *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya*. 2018;4(70):125–133. (In Russ.)
 15. Sataieva T. P., Maligina V. Yu., Kriventsov M. A., Komissarova V. V., Krutikov P. E. The effect of triterpene glycoside on survival and changes in the cytokine profile in the spleen of BALB/c mice under conditions of lethal influenza infection A/WSN/1/33(H1N1). *Kazan medical journal*. 2024;105(2):251–259. (In Russ.) DOI: 10.17816/KMJ623237.
 16. Zhang T., Zhong S., Li T., Zhang J. Saponins as modulators of nuclear receptors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020;60(1):94–107. DOI: 10.1080/10408398.2018.1514580.
 17. Malygina V. Yu., Andronovskaya I. B., Krivorutchenko Yu. L., Grishkovets V. I. Dependence of the protective effect of tauroside Sx1 on the doses, route and schedule of saponin administration during experimental influenza in mice. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2012;2(1–2):98–102. (In Russ.)
 18. Grishkovets V. I., Chirva V. Ya., Kachala V. V., Shashkov A. S. Araliaceae triterpene glycosides: structures of isolated triterpene glycosides. *Trudy Nikitskogo botanicheskogo sada*. 2007;128:90–102. (In Russ.)
 19. Volkova O. V. Eletskiy Yu. K. Fundamentals of histology with histological techniques. Moscow: Meditsina; 1982. (In Russ.)
 20. Charoenngam N., Holick M. F. Immunologic effects of vitamin D on human health and Disease. *Nutrients*. 2020;12(7):2097. DOI: 10.3390/nu12072097.
 21. Bishop E. L., Ismailova A., Dimeloe S., Hewison M., White J. H. Vitamin D and immune regulation: Antibacterial, antiviral, anti-inflammatory. *JBMR Plus*. 2021;5(1):e10405. DOI: 10.1002/jbm4.10405.



Изучение фармакокинетики нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида на крысах

И. И. Яичков^{1,2}✉, М. К. Корсаков², Н. Н. Вольхин¹, С. С. Петухов^{1,2},
А. Н. Тюшина^{1,2}, В. Е. Зайкова^{1,2}, О. Э. Лазарянц^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России). 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского». Центр трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова. 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1

✉ Контактное лицо: Яичков Илья Игоревич. E-mail: iyaichkov@yspu.org

ORCID: И. И. Яичков – <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>;

М. К. Корсаков – <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>;

Н. Н. Вольхин – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;

С. С. Петухов – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>;

А. Н. Тюшина – <https://orcid.org/0009-0007-8084-5239>;

В. Е. Зайкова – <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>;

О. Э. Лазарянц – <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>.

Статья поступила: 16.07.2024

Статья принята в печать: 12.11.2024

Статья опубликована: 15.11.2024

Резюме

Введение. 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида (R004) является новой перспективной молекулой для терапии ревматоидного артрита. Данное соединение находится на стадии доклинического исследования, в ходе которого вместе с эффективностью и безопасностью необходимо изучить его фармакокинетику. При этом необходимо установить основные фармакокинетические параметры лекарственного средства и его метаболитов в плазме крови при однократном введении.

Цель. Оценка линейности фармакокинетики и относительной биодоступности 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида после однократного введения субстанции крысам.

Материалы и методы. Субстанцию R004 вводили крысам однократно перорально в дозировках 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг и внутрибрюшинно в дозировке 10 мг/кг. Исследование проводилось на 24 крысах линии Wistar: по 6 крыс на каждую из доз. Образцы крови отбирались до введения и через 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 24 ч после введения лекарственного средства. Полученная плазма стабилизировалась 250 мМ раствором ацетата аммония для предотвращения гидролиза R004. Подготовку проб плазмы осуществляли путем осаждения белков ацетонитрильным раствором внутренних стандартов. Измерение концентрации R004 и его метаболитов 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1) и 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (M2) проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС. При оценке фармакокинетических параметров применялся некомпартментный подход.

Результаты и обсуждение. Разработанная биоаналитическая методика прошла полную валидацию согласно требованиям руководств ЕАЭС по проведению исследований биоэквивалентности и ICH M10. Аналитический диапазон определения в плазме R004 составил 2–2000 нг/мл, M1 и M2 – 1–1000 нг/мл. Зависимость параметров C_{max} и AUC_{0-t} изучаемого соединения и его метаболитов от введенной дозы носила линейный характер. Так, величина коэффициента корреляции C_{max} R004 составил 0,9995, а параметра AUC_{0-t} – 0,9932. Установлено наличие энтерогепатической рециркуляции R004. Величина относительной биодоступности R004 составила 21,26 %.

Заключение. Разработанная методика успешно применена для фармакокинетического исследования. R004 и его метаболиты обладают линейной фармакокинетикой при пероральном введении субстанции.

Ключевые слова: производное 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида, ингибитор PAR-2-рецепторов, ВЭЖХ-МС/МС, плазма, фармакокинетика, стабилизация, крысы

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

Вклад авторов. И. И. Яичков проводил разработку и валидацию биоаналитической методики, анализ образцов животных. М. К. Корсаков отвечал за формулирование целей и задач, организационную часть исследования. Н. Н. Вольхин, С. С. Петухов, А. Н. Тюшина, В. Е. Зайкова, О. Э. Лазарянц отвечали за работу с лабораторными животными.

Финансирование. Статья подготовлена в рамках государственного задания Ярославского государственного педагогического университета им. К. Д. Ушинского на 2024 год от Минпросвещения РФ по теме «Разработка нового лекарственного средства для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе ингибитора моноаминоксидазы» (номер реестровой записи 720000Ф.99.1.БН62АА12000).

Для цитирования: Яичков И. И., Корсаков М. К., Вольхин Н. Н., Петухов С. С., Тюшина А. Н., Зайкова В. Е., Лазарянц О. Э. Изучение фармакокинетики нового производного 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамида на крысах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):238–250. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1876>

Pharmacokinetic study of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats

Ilya I. Yaichkov^{1,2}✉, Mikhail K. Korsakov², Nikita N. Volkhin¹, Sergey S. Petukhov^{1,2},
Alena N. Tyushina^{1,2}, Valeria E. Zaykova^{1,2}, Olga E. Lasaraynz^{1,2}

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Yaroslavl State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

² Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky. M. V. Dorogov Pharmaceutical Technology Transfer Center. 108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

✉ **Corresponding author:** Ilya I. Yaichkov. **E-mail:** i.yaichkov@yspu.org

ORCID: Ilya I. Yaichkov – <https://orcid.org/0000-0002-0066-7388>;
Mikhail K. Korsakov – <https://orcid.org/0000-0003-0913-2571>;
Nikita N. Volkhin – <https://orcid.org/0000-0002-4275-9037>;
Sergey S. Petukhov – <https://orcid.org/0009-0007-8435-7689>;
Alena N. Tyushina – <https://orcid.org/0009-0007-8084-5239>;
Valeria E. Zaykova – <https://orcid.org/0009-0008-9431-1980>;
Olga E. Lasaraynz – <https://orcid.org/0009-0002-1249-3669>.

Received: 16.07.2024 **Accepted:** 12.11.2024 **Published:** 15.11.2024

Abstract

Introduction. 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide (R004) is a prospective new molecule for the treatment of rheumatoid arthritis. This compound is at the stage of preclinical research, during which its pharmacokinetics must be studied along with efficacy and safety. In this case, it is necessary to establish the main pharmacokinetic parameters of the drug and its metabolites in blood plasma after a single administration.

Aim. Evaluation of linearity of pharmacokinetics and relative bioavailability of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its main metabolites in plasma after a single administration of the substance to rats.

Materials and methods. Substance R004 was administered to rats once orally at dosages of 10 mg/kg, 20 mg/kg and 40 mg/kg and intraperitoneally at a dosage of 10 mg/kg. The study was carried out using 24 Wistar rats: 6 rats were used for each of the dosage. Blood samples were collected before administration and 30 min, 1 h, 1 h, 30 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h after administration of the drug. The obtained plasma was stabilized with a 250 mM ammonium acetate solution to prevent hydrolysis of R004. Plasma samples were prepared by means proteins precipitation by acetonitrile solution of internal standards. Measurement of the concentration of R004 and its metabolites 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxylic acid (M1) and 4-methoxy-3-(trifluoromethyl)aniline (M2) was performed using HPLC-MS/MS. A non-compartment approach was applied for evaluation pharmacokinetic parameters.

Results and discussion. The developed bioanalytical method has been fully validated in accordance with the requirements of the EAEU guideline for conducting bioequivalence study and ICH M10 guideline. The analytical range of determination in plasma of R004 was 2–2000 ng/ml, M1 and M2 – 1–1000 ng/ml. The dependence of the parameters C_{max} and AUC_{0-t} of the studied compound and its metabolites on the administered dose was linear. Thus, the value of the correlation coefficient of C_{max} R004 was 0.9995, and value of the correlation coefficient of AUC_{0-t} was 0.9991. The presence of enterohepatic recirculation R004 has been determined. The relative bioavailability of R004 was 21.26 %.

Conclusion. The developed method was successfully applied for the pharmacokinetic research. R004 and its metabolites have linear pharmacokinetics in case of oral administration.

Keywords: 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide derivative, PAR-2 receptor inhibitor, HPLC-MS/MS, plasma, pharmacokinetics, stabilization, 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. Ilya I. Yaichkov carried out the development and validation of bioanalytical methods, analysis of animal samples. Mikhail K. Korsakov carried out formulation of aims and objectives, the organizational part of the study. Nikita N. Volkhin, Sergey S. Petukhov, Alena N. Tyushina, Valeria E. Zaykova, Olga E. Lasaraynz carried out the experiment on laboratory animals.

Funding. The article was prepared within the framework of the State assignment of the Yaroslavl State Pedagogical University named after K.D. Ushinsky for 2024 from the Ministry of Education of the Russian Federation on the topic "Development of a new drug for the treatment of neurodegenerative diseases based on a monoamine oxidase inhibitor" (registry entry number 720000Ф.99.1.БН62АА12000).

For citation: Yaichkov I. I., Korsakov M. K., Volkhin N. N., Petukhov S. S., Tyushina A. N., Zaykova V. E., Lasaraynz O. E. Pharmacokinetic study of a new 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivative in rats. *Drug development & registration*. 2024;13(4):238–250. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1876>

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) является достаточно распространенным заболеванием, от которого страдает до 1,0 % населения. Риск развития РА увеличивается с возрастом [1]. Одной из перспективных мишеней для лечения РА является ингибирование PAR-2-рецепторов, локализованных на мембранах клеток иммунной системы. Для данных целей наряду с моноклональными антителами применяются низкомолекулярные соединения [2, 3]. 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R004) (рисунок 1) является новым селективным ингибитором PAR-2-рецепторов. Данный препарат проявлял свою фармакологическую активность на модели отека, вызванного формальдегидом. Так, по своему противовоспалительному эффекту R004 превзошел диклофенак натрия [4].

В ходе изучения биотрансформации установлено, что R004 метаболизируется путем гидролиза с образованием 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1); 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (M2) (см. рисунок 1) [5]. Других фармакокинетических исследований данной молекулы ранее не проводилось. На следующем этапе необходимо оценить основные фармакокинетические параметры R004 и его метаболитов в плазме крови после однократного введения, проверить гипотезу их линейности [6]. Наиболее часто для этих целей используют крыс [7–9].

Биоаналитическая методика, использованная для скрининга метаболитов R004, слишком длительна и не предназначена для количественного определения [5]. Поэтому требуется разработка новой, более быстрой и точной методики. В рамках доклиническо-

го исследования требуется оценка фармакокинетических параметров лекарственного средства как минимум на двух видах животных [6], один из которых не относится к грызунам. Как правило, для этих целей используются кролики [10, 11]. Поэтому новая биоаналитическая методика будет разработана для плазмы обоих видов животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование и реактивы

Количественное определение R004 и его метаболитов проводилось с помощью ВЭЖХ-МС/МС-системы, оснащенной жидкостным хроматографом 1260 Infinity (Agilent Technologies, Германия) и масс-спектрометрическим детектором AB SCIEX QTRAP5500 (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур), с программным обеспечением Analyst 1.6.2 (AB Sciex, США) для управления прибором и MultiQuant 3.0.5 (AB Sciex, США) для интегрирования хроматограмм и количественных расчетов.

Субстанции 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (99,2 %), 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (99,3 %), а также 3-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[3,4-диметилфенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид (R002) (98,5 % – внутренний стандарт) произведены в Центре трансфера фармацевтических технологий им. М. В. Дорогова ЯГПУ им. К. Д. Ушинского. Образцы 4-метокси-3-(трифторметил)анилина (99,0 %, Alfa Aesar, США) и 4-хлоранилина (4CA) (≥ 98 % (внутренний стандарт), ALPHA CHEMICA, Индия) получены из коммерческих источников.

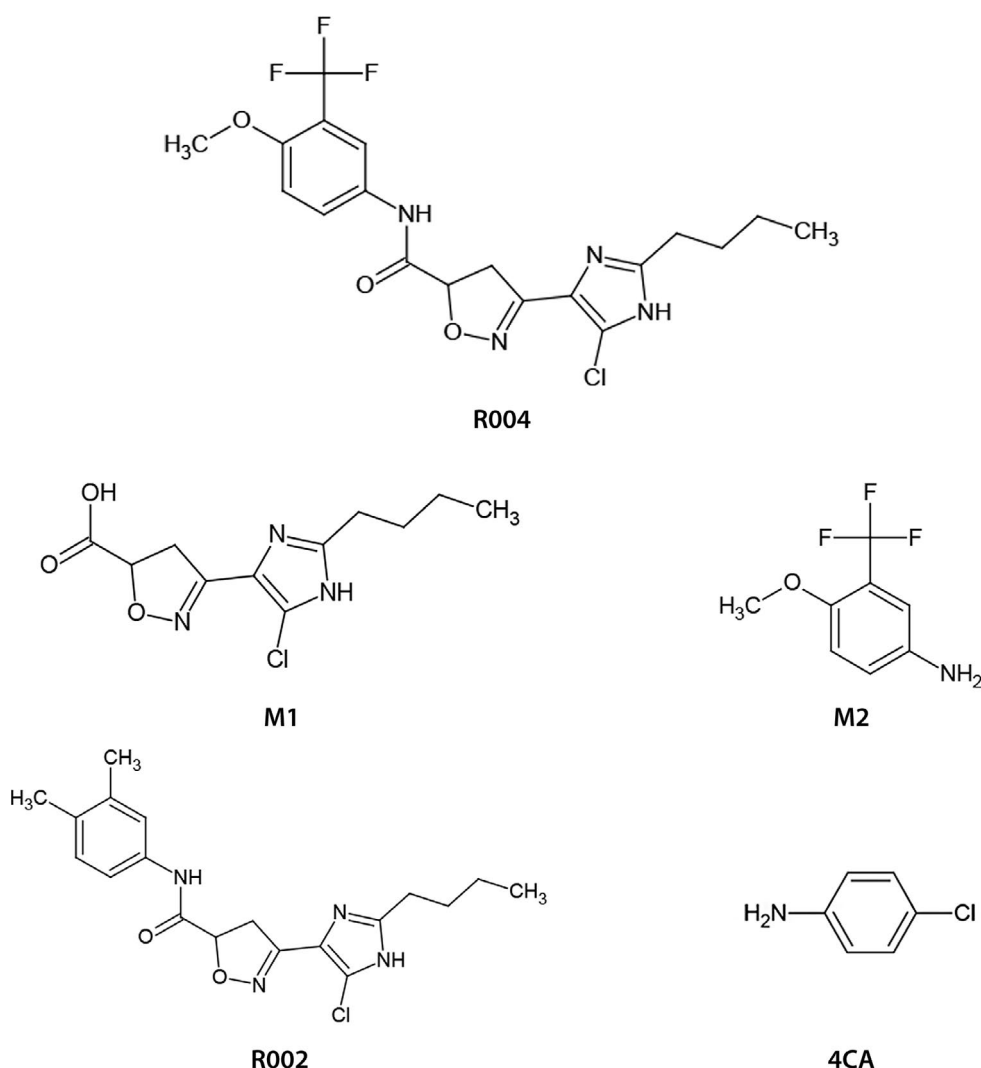


Рисунок 1. Структурные формулы 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида (R004), его основных метаболитов 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоновой кислоты (M1), 4-метокси-3-(трифторметил)анилина и внутренних стандартов R002 и 4-хлоранилина (4CA)

Figure 1. The structure of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide, its metabolites 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxylic acid (M1), 4-methoxy-3-(trifluoromethyl)aniline (M2) and internal standards R002 and 4-chloroaniline (4CA)

Для приготовления подвижной фазы и подготовки проб использовались следующие реактивы:

- ✓ ацетонитрил, класс «Optima™ LC/MS-Grade» (для ВЭЖХ-МС, Fisher Chemicals, Бельгия) – элюент В;
- ✓ ацетонитрил (о.с.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия) – для подготовки проб;
- ✓ муравьиная кислота, класс «eluent additive for LC-MS» (для ВЭЖХ-МС, Scharlab, Китай);
- ✓ ацетат аммония (класс «для ВЭЖХ», High Purity Laboratory Chemicals Pvt. Ltd., Индия);
- ✓ уксусная кислота ледяная (х.ч., АО «База № 1 Химреактивов», Россия);
- ✓ диметилсульфоксид (х.ч., АО «ЭКОС-1», Россия).

Подготовка проб плазмы

Содержание R004, M1 и M2 в основных растворах в ДМСО составляло 1000 мкг/мл. Приготовление калибровочных образцов (K1–K8), образцов контроля качества нижнего (LQC), среднего (MQC) и верхнего (HQC) уровней концентраций и образцов для теста разведения (Dil) осуществлялось путем добавления комбинированного рабочего раствора аналитов с концентрацией, которая в 20 раз превышает концентрацию в соответствующем образце (таблица 1), к холостому образцу плазмы в объемном соотношении 1:19 (раб. раствор:плазма). Далее образец не-

медленно стабилизировали путем добавления 250 мМ раствора ацетата аммония (pH = 4,0) из расчета 20 мкл раствора на 100 мкл K₃ЭДТА-плазмы.

Таблица 1. Концентрации 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамиды и его метаболитов в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 1. Concentrations of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in calibration and QC samples

Аналит Analyte	Концентрация, нг/мл Concentration, ng/ml							
	Калибровочные образцы Calibration samples							
	K1 (LLOQ)	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
R004	2	10	50	200	500	1000	1500	2000
M1	1	5	25	100	250	500	750	1000
M2	1	5	25	100	250	500	750	1000
	Образцы контроля качества Quality control samples							
	LQC	MQC		HQC		Dil		
R004	6	750		1750		3500		
M1	3	375		875		1750		
M2	3	375		875		1750		

Для подготовки проб к 25 мкл стабилизированной плазмы добавлялось 100 мкл ацетонитрильного раствора внутренних стандартов R002 и 4CA с концентрациями обоих соединений 40 нг/мл. Затем смесь перемешивали на шейкере и центрифугировали 5 мин при 10 тыс. об/мин. Надосадочная жидкость переносилась в микровставки и вводилась в ВЭЖХ-МС/МС-систему в объеме 7 мкл.

Параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

Хроматографическое разделение проводилось на хроматографической колонке Zorbax Eclipse Plus C18 (150 × 3,0 мм, 3,5 мкм) с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 (12,5 × 2,1 мм, 5,0 мкм) при скорости потока 0,5 мл/мин и температуре 40 °C в градиентном режиме (таблица 2).

Масс-спектрометрическое детектирование осуществлялось в MRM-режиме (таблица 3) в следующих условиях:

- ✓ электрораспылительная ионизация;
- ✓ полярность – положительная;
- ✓ напряжение электроспрея – 5500 В;
- ✓ температура источника ионов – 650 °C.

Таблица 2. Условия градиентного элюирования

Table 2. Gradient elution conditions

Время, мин Time, min	A, %	B, %
0,00	60	40
0,50	60	40
3,00	10	90
8,50	10	90
8,60	60	40
12,50	60	40

Примечание. 0,2%-й водный р-р муравьиной кислоты – А; ацетонитрил – В.

Note. 0,2 % aqueous formic acid solution – A; acetonitrile – B.

Таблица 3. Параметры масс-спектрометрического детектирования определяемых веществ

Table 3. Parameters of mass spectrometric detection of studied compounds

Вещества Compounds		SRM-переход SRM-transition		Тип SRM-перехода Type of SRM-transition
		Q1	Q3	
Аналиты Analytes	R004	445	425	Количественный Quantitative
		445	200	Контрольный Control
	M1	272	200	Количественный Quantitative
		272	144	Контрольный Control
	M2	192	108	Количественный Quantitative
		192	123	Контрольный Control
Внутренние стандарты Internal standards	R002	375	226	ВС для R004 IS for R004
	4CA	128	93	ВС для M1 IS for M1
		128	75	ВС для M2 IS for M2

Примечание. Количественные SRM-переходы использовались для количественных расчетов; контрольные SRM-переходы использовались для подтверждения корректности идентификации.

Note. Quantitative SRM-transitions were used for quantitative calculations; control SRM transitions were used to confirm the correctness of identification.

В качестве внутреннего стандарта для определения R004 использовался близкий по структуре кандидат R002. Для расчетов концентрации метаболитов применялся 4CA: более интенсивный MRM-переход 128 → 93 m/z – для M1; менее интенсивный MRM-переход 128 → 75 m/z – для M2.

Валидация биоаналитической методики

Валидация разработанной методики была выполнена согласно требованиям Решения Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 г. № 85¹ и руководства ICH M10² по следующим показателям: селективности; калибровочной кривой; правильности и прецизионности внутри аналитического цикла (по 2 серии на образцах биоматериала крысы и кролика) и между аналитическими циклами; эффекту разведения образца (2-кратное разведение); эффекту матрицы [расчет относительного стандартного отклонения (RSD) нормализованного фактора матрицы (NMF)]; эффекту переноса анализируемых веществ и внутренних стандартов из предыдущей пробы; воспроизводимости при повторном вводе аналитической серии. Селективность и матричные эффекты оценивались отдельно на плазме крысы и на плазме кролика. В процессе валидации были изучены следующие виды стабильности: краткосрочная стабильность (STS) (стабилизированная плазма); долгосрочная стабильность (LTS) (стабилизированная плазма); стабильность после 3 циклов заморозки/разморозки (FTS) (стабилизированная плазма); стабильность приготовленных проб в автодозаторе (ASS); стабильность в цельной крови. Исследование LTS также проводилось на плазме обоих видов животных.

Дизайн фармакокинетического исследования

Субстанцию R004 в виде суспензии (1%-й твин-80 в 0,9%-м растворе натрия хлорида) лекарственного средства вводили перорально (п/о) с помощью зонда в дозировках 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг, а также внутривенно (в/в) в дозировке 10 мг/кг. Испытание с каждой дозировкой выполнялось на отдельной группе крыс линии Wistar (питомник ООО «СМК Стелар»), включающей в себя 6 особей (по 3 самца и 3 самки). Масса животных в группах ($M \pm SEM$) составляла 256 ± 2 г (10 мг/кг – п/о), 249 ± 2 г (20 мг/кг – п/о), 249 ± 3 г (40 мг/кг – п/о), 269 ± 3 г (10 мг/кг – в/в). Для предотвращения влияния пищи на абсорбцию R004 исследование проводилось на голодный желудок: крыс не кормили за 12 ч до введения и не поили за 2 ч до введения субстанции. Доступ к корму и воде был возобновлен спустя 4 ч после начала эксперимента.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

Отбор проб крови в объеме 0,2 мл (антикоагулянт: К₃ЭДТА) осуществляли через предварительно установленный в правую яремную вену катетер. Использовались следующие временные точки: 0 ч (до введения), 30 мин, 1 ч, 1 ч 30 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 24 ч после введения. Кровь немедленно центрифугировали 5 мин при 2500 об/мин и температуре 4 °С. К полученной плазме добавляли 250 мМ раствор ацетата аммония (pH = 4,0) в объемном соотношении 1:5 (стабилизатор: плазма). Образцы хранились в морозильной камере при температуре не выше –70 °С.

Статистические расчеты

Для R004, а также его метаболитов были рассчитаны следующие фармакокинетические параметры в плазме крови крысы: максимальная концентрация аналита в плазме (C_{max}); время достижения максимальной концентрации аналита в плазме (T_{max}); площадь под фармакокинетической кривой от момента введения ЛС до времени последнего отбора крови (AUC_{0-t}); площадь под фармакокинетической кривой от момента введения ЛС до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$); период полувыведения аналита ($T_{1/2}$); среднее время удержания аналита в крови (среднее резидентное время, MRT); клиренс (Cl/F); объем распределения (Vd/F).

Для расчета фармакокинетических параметров использовался пакет R, ver. 3.3.2 (модуль Bear, ver. 2.7.7), для расчета элементов описательной статистики (среднее значение (M), стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD), стандартная ошибка среднего (SEM), медиана (Med), минимальное (Min) и максимальное (Max) значение); для проверки гипотезы линейности C_{max} и AUC_{0-t} использовалось ПО Statsoft Statistica 10.0.1011.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследования была разработана и валидирована ВЭЖХ-МС/МС-методика. Для предотвращения гидролиза R004 после отбора к 75 мкл К₃ЭДТА-плазмы добавлялось 15 мкл 250 мМ раствора ацетата аммония (pH = 4,0) в объемном соотношении 1:5, как и при изучении биотрансформации [5]. Требуемой чувствительности удалось достичь с помощью осаждения белков плазмы ацетонитрильным раствором внутренних стандартов.

Площадь хроматографических пиков R004 в холостых образцах крысы не превышала 5,93 % от площади хроматографических пиков в образцах LLOQ, в холостых образцах кролика – 3,95 % площади хроматографических пиков в образцах LLOQ. В области времени удерживания M1, M2, а также внутренних стандартов R002 и 4CA аналитический сигнал отсутствовал в интактной плазме обоих видов животных (рисунок 2) Также в рамках оценки селективно-

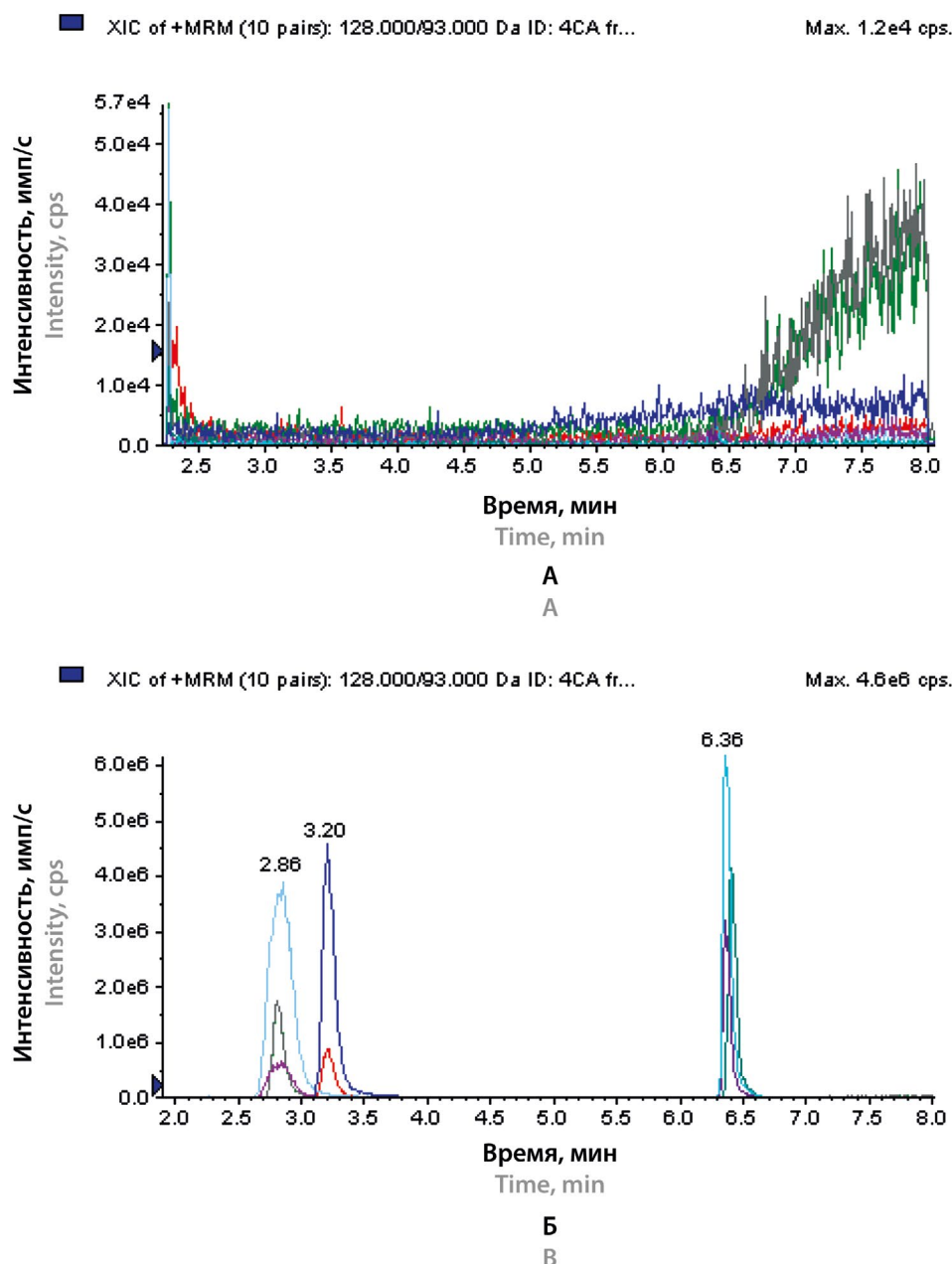


Рисунок 2. Пример хроматограммы холостого образца плазмы (А) и хроматограммы калибровочного образца К4 (В).

Примечание. R004 – $t_R = 6,36$ мин; M1 – $t_R = 2,86$ мин; M2 – $t_R = 2,86$ мин; R002 – $t_R = 6,41$ мин; 4CA – $t_R = 3,20$ мин

Figure 2. Example of chromatogram of a blank plasma sample (A) and chromatogram of a K4 calibration sample (B).

Note. R004 – $t_R = 6.36$ min; M1 – $t_R = 2.86$ min; M2 – $t_R = 2.86$ min; R002 – $t_R = 6.41$ min; 4CA – $t_R = 3.20$ min

сти изучалась возможность повторного образования R004 из M1 и M2 после отбора. Для этого 3 образца стабилизированной плазмы крысы и 3 образца плазмы кролика с концентрациями M1 и M2 на уровне НQC выдерживали 24 ч при комнатной температуре. Площадь хроматографического пика R004 в испытуемых образцах составляла 0,00–4,95 % от площади хроматографических пиков в образцах LLOQ, что не превышало максимально допустимые 20 %. Калибро-

вочные зависимости носили линейный характер в диапазоне 2–2000 нг/мл для R004 и в диапазоне 1–1000 нг/мл для M1 и M2. Угловые коэффициенты градуировочных кривых, построенных на плазме крысы и кролика, имеют близкие значения (таблица 4).

Оценка матричных эффектов проводилась также на образцах обоих видов животных. Величина RSD нормализованного фактора матрицы (NMF) была менее 15 % для каждого аналита, что соответствовало

Таблица 4. Результаты оценки линейности методики

Table 4. The results of evaluation of linearity of the method

Аналит Analyte	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/ml	Весовой коэффициент Weighting	Угловые коэффициенты калибровочных кривых (мин. – макс.) Slopes of calibration curves (min. – max.)		Свободные коэффициенты калибровочных кривых (мин. – макс.) Intercepts of calibration curves (min. – max.)	
			Крыса (n = 7) Rat (n = 7)	Кролик (n = 3) Rabbit (n = 3)	Крыса (n = 7) Rat (n = 7)	Кролик (n = 3) Rabbit (n = 3)
R004	2–2000	1/x ²	0,00174–0,00200	0,00182–0,00193	0,00069–0,00187	0,00051–0,00190
M1	1–1000	1/x	0,00375–0,00431	0,00380–0,00415	0,00051–0,00152	0,00071–0,00122
M2	1–1000	1/x	0,00322–0,00375	0,00354–0,00381	0,00082–0,00210	0,00112–0,00196

установленным требованиям^{1,2} (таблица 5). Расхождение абсолютных значений NMF между пробами крыс и кроликов для R004, M1 и M2 также не превышало 15 % (таблица 5).

Таблица 5. Оценка эффекта матрицы методики определения 5-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксиамида и его метаболитов в плазме

Table 5. Evaluation of matrix effect of the method of determination of 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in plasma

Аналит Analyte	Концентрация Concentration	Плазма крысы Rat plasma		Плазма кролика Rabbit plasma	
		NMF	RSD (NMF), %	NMF	RSD (NMF), %
R004	LQC	1,034	2,81	1,019	3,93
	HQC	0,994	3,43	1,008	2,87
M1	LQC	0,845	2,24	0,887	10,98
	HQC	0,830	5,31	0,878	4,66
M2	LQC	1,003	6,14	0,972	8,30
	HQC	0,978	2,95	0,987	4,32

Величина среднего значения относительной погрешности (δ) на уровнях концентрации LQC, MQC, HQC при определении R004 варьировала в диапазоне 0,44–11,35 %, при определении M1 – в диапазоне –2,23–10,41 %, при определении M2 – в диапа-

зоне –0,76–8,33 %. Данные результаты входили в допустимый интервал ± 15 %. Значение δ на уровне нижнего предела количественного определения для R004 не превышало 12,61 %, для M1 – 8,40 %, для M2 – 15,60 % (таблица 6). Это укладывалось в установленный предел ± 20 %^{3,4}. Величина RSD рассчитанных концентраций на уровнях LQC, MQC, HQC для R004 составила 1,20–5,95 %, для M1 – 2,70–6,84 %, для M2 – 1,98–10,03 %. Для образцов LLOQ значение RSD при определении R004 находилось в диапазоне 4,78–12,61 %, при определении M1 – в диапазоне 3,89–15,90 %, при определении M2 – в диапазоне 3,43–9,55 % (таблица 6). Таким образом, результаты оценки внутрисерийной прецизионности соответствовали установленным требованиям^{5,6}. Отсутствие различий при испытаниях селективности, эффекта матрицы, градуировочной кривой (схожесть типа регрессии и величины угловых коэффициентов калибровочных зависимостей) позволило объединить данные 4 аналитических серий, проведенных на плазме крыс и на плазме кроликов, для подтверждения межсерийной правильности и прецизионности (см. таблицу 6). При двукратном разведении образцов стабилизированной плазмы среднее значение относительной погрешности определения

³ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

⁴ ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

⁶ ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

Таблица 6. Результаты оценки правильности и прецизионности методики определения 3-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболитов в плазме

Table 6. The results of evaluation of accuracy and precision of the method of determination of 3-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in plasma

Испытание Test		Концентрация Concentration	R004		M1		M2	
			δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %	δ, %	RSD, %
Внутрисерийная правильность и прецизионность Intraday accuracy and precision	Серия 1 (n = 6) Batch 1 (n = 6)	LLOQ	4,37	9,08	-3,12	12,89	7,45	6,46
		LQC	10,37	1,20	1,58	6,84	8,33	4,07
		MQC	8,25	5,51	6,36	6,16	6,69	4,85
		HQC	11,35	1,52	10,41	2,70	7,72	1,98
	Серия 2 (n = 6) Batch 2 (n = 6)	LLOQ	0,63	12,61	-3,80	15,90	15,60	3,43
		LQC	5,06	3,59	0,21	6,77	6,47	4,40
		MQC	3,90	5,51	4,30	5,78	5,81	6,49
		HQC	8,72	3,47	9,66	3,08	5,67	2,49
	Серия 3 (n = 6) Batch 3 (n = 6)	LLOQ	13,16	4,78	8,40	3,89	-1,80	9,55
		LQC	9,11	4,20	9,18	3,77	6,43	7,01
		MQC	0,44	3,37	2,38	3,22	0,76	4,21
		HQC	3,07	4,29	8,19	5,19	4,56	2,38
	Серия 4 (n = 6) Batch 4 (n = 6)	LLOQ	4,03	7,42	-0,60	12,03	-1,55	9,43
		LQC	3,71	5,09	5,08	2,71	5,52	10,03
		MQC	0,44	5,95	-2,23	3,40	2,42	3,59
		HQC	5,93	2,06	2,07	5,29	5,24	2,92
Межсерийная правильность и прецизионность (n = 24) Interday accuracy and precision (n = 24)		LLOQ	5,55	9,29	0,22	11,99	4,93	9,81
		LQC	7,06	4,38	4,01	5,97	6,69	6,39
		MQC	3,26	5,80	2,70	5,55	3,92	5,19
		HQC	7,18	4,86	7,58	4,99	5,80	2,56
Воспроизводимость при повторном вводе серии (48 ч) (n = 6) Reinjection reproducibility (48 h) (n = 6)		LLOQ	2,38	9,68	8,90	5,05	5,27	5,29
		LQC	5,58	6,63	8,47	5,61	5,67	5,66
		MQC	-5,63	3,77	-2,78	3,48	1,78	2,46
		HQC	-2,41	3,91	4,99	6,06	5,40	3,65

Примечание. Серии 1 и 2 выполнены на плазме крысы, серии 3 и 4 выполнены на плазме кролика; в рамках серий 2 и 4 выполнялось изучение селективности методики.

Note. Series 1 and 2 were performed on rat plasma, series 3 and 4 were performed on rabbit plasma; selectivity of the method was studied within series 2 and 4.

R004 составило 3,82 %, M1 – 4,08 %, M2 – 8,65 %, что отвечает критериям приемлемости^{1,2}. Величина RSD при этом не превышала 6,43 %. Перенос R004 из предыдущей пробы не превышал 13,83 % от площади хроматографического пика в пробах LLOQ, а перенос близкого по структуре R002 (BC) – 0,18 %. Попадания M1, M2 и 4CA в последующий образец не наблюдалось.

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 16.07.2024.

² ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. Accessed: 16.07.2024.

Испытания STS, FTS и ASS проводили на стабилизированной плазме крыс ввиду положительных результатов при подборе антикоагулянта и раствора стабилизатора [5] с целью оптимизации объема валидационных испытаний. R004 и его метаболиты остаются стабильными в течение 24 ч хранения при комнатной температуре, 3 циклов заморозки и разморозки, 48 ч хранения готовых проб в автосемплере, а также 30 мин хранения образцов цельной крови на ледяной бане (таблица 7). Изучение LTS осуществляли на плазме крыс и кроликов. Межвидовые различия в активности ферментных систем не влияли на стабильность аналитов (таблица 7). Воспроизводимость результатов при повторном вводе аналитической серии спустя 48 ч также сохраняется (см. таблицу 6).

После успешной валидации биоаналитической методики проводился анализ проб плазмы крыс. Всего было проанализировано 288 образцов.

Таблица 7. Изучение стабильности 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов в плазме

Table 7. Stability study of 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in plasma

Испытание Test		% отклонения от номинального значения % of deviation from nominal value					
		R004		M1		M2	
		LQC (n = 6)	HQC (n = 6)	LQC (n = 6)	HQC (n = 6)	LQC (n = 6)	HQC (n = 6)
Краткосрочная стабильность при комнатной температуре (24 ч) Short-term stability at room temperature (24 h)		8,29	4,12	5,06	3,43	3,56	0,51
Стабильность после 3 циклов заморозки (12 ч) и разморозки (4 ч) Stability after 3 cycles of freeze (12 h) and thaw (4h)		3,45	4,14	6,81	2,83	-0,68	0,67
Стабильность в автосемплере (48 ч при +4 °C) Autosampler stability (48 h at +4 °C)		7,12	3,24	4,44	4,80	-0,21	3,23
Долгосрочная стабильность в морозильной камере (не выше -70 °C, 30 дней) Long-term stability at freezer (no higher than -70 °C, 30 days)	Плазма крысы Rat plasma	12,03	-1,26	5,56	0,05	3,77	10,17
	Плазма кролика Rabbit plasma	5,31	2,08	2,16	-1,53	0,21	1,33
Стабильность в цельной крови (30 мин) Stability in whole blood (30 min)		5,54	1,24	0,57	0,22	-0,09	3,20

На фармакокинетических профилях R004 после перорального введения наблюдается два пика нарастания концентрации: через 0,5–1 ч после введения и около 4 часов (рисунок 3). При этом у части животных C_{max} достигается в начальных точках, а у другой части – в точке 4 ч. Это обуславливает высокие величины RSD времени достижения максимальной концентрации после приема дозы 10 и 20 мг/кг. После приема самой высокой дозы 40 мг/кг T_{max} R004 у всех животных составляет 0,5 ч (таблица 8). На фармакокинетической кривой изучаемого соединения после внутрибрюшинной инъекции также отмечается прирост его концентрации в точках 4–6 ч (рисунок 3). Это свидетельствует о наличии энтеро-гепатической рециркуляции действующего вещества. Зависимость параметра C_{max} и AUC_{0-t} от введенной дозы носила линейный характер: величина коэффициентов корреляции 0,9995 и 0,9932 соответственно (рисунок 4). Относительная биодоступность субстанции R004 составила 21,26 %.

Рисунок 3. Усредненные фармакокинетические кривые (со стандартной ошибкой среднего) 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов в плазме крови крысы

Figure 3. Averaged pharmacokinetic curves (with standard error of mean) of 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites in rat blood plasma

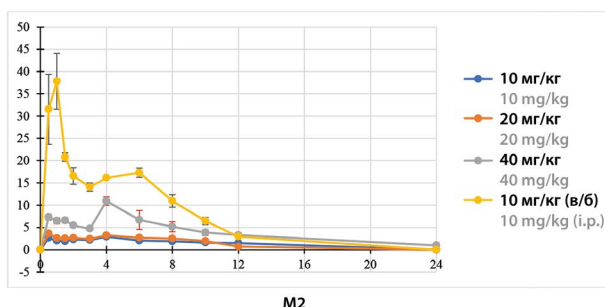
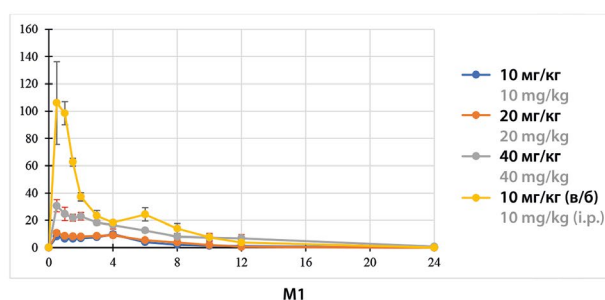
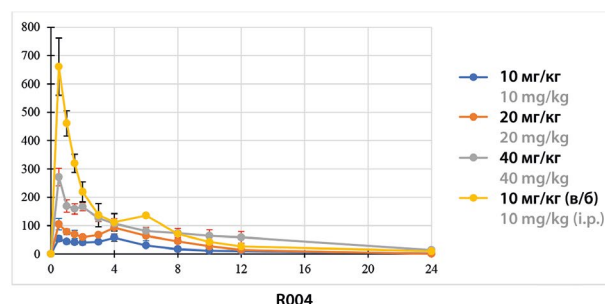


Таблица 8. Значения фармакокинетических параметров 5-(2-бутил-5-хлоро-1Н-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамида и его метаболитов
Table 8. Values of pharmacokinetic parameters 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites

Вещество Substance		R004 (n = 6)				M1 (n = 6)				M2 (n = 6)			
Дозировка, мг/кг Dosage, mg/kg		10	20	40	10 (в/б) 10 (i/p)	10	20	40	10 (в/б) 10 (i/p)	10	20	40	10 (в/б) 10 (i/p)
C _{max} , нг/мл C _{max} , ng/ml	M ± SEM	68,6 ± 10,67	130,13 ± 17,79	271,26 ± 31,14	697,49 ± 93,65	11,02 ± 1,34	12,46 ± 1,28	32,76 ± 4,86	135,97 ± 18,57	3,30 ± 0,47	4,03 ± 0,43	11,30 ± 1,14	45,85 ± 5,93
	RSD	38,11	33,48	28,12	30,02	29,84	25,20	36,33	33,45	35,13	26,27	24,60	31,67
	Med (Min–Max)	4,0 (0,5–4,0)	1,0 (0,5–6,0)	0,5 (0,5–0,5)	0,5 (0,5–1,5)	2,8 (0,5–4,0)	1,0 (0,5–4,0)	0,5 (0,5–1,5)	0,8 (0,5–1,0)	4,0 (0,5–4,0)	1,3 (0,5–4,0)	4,0 (0,5–6,0)	1,0 (0,5–1,0)
C _{max} , ч C _{max} , h	RSD	48,56	106,92	0,00	55,90	73,34	93,95	55,78	36,51	63,79	89,48	47,52	30,98
	M ± SEM	391,5 ± 34,4	644,9 ± 59,5	1514,1 ± 266,9	1871,4 ± 139,7	52,2 ± 4,0	62,1 ± 4,5	184,9 ± 34,0	301,2 ± 31,8	23,4 ± 2,1	27,9 ± 2,7	87,2 ± 17,1	165,6 ± 8,7
	RSD	21,54	22,62	43,18	18,29	18,70	17,91	44,99	25,87	22,26	23,78	48,17	12,92
AUC _{0–t} , нг · ч/мл AUC _{0–t} , ng · h/ml	M ± SEM	415,2 ± 36,2	707,6 ± 66,6	1755,8 ± 342,0	1988,9 ± 147,6	58,0 ± 4,0	69,8 ± 3,5	201,5 ± 36,4	317,0 ± 35,2	41,2 ± 3,8	38,2 ± 2,6	136,9 ± 23,0	175,3 ± 8,7
	RSD	21,33	23,07	47,71	18,18	16,84	12,23	44,19	27,23	22,69	16,56	41,05	12,21
	M ± SEM	5,1 ± 1,0	2,8 ± 0,6	6,8 ± 1,3	6,8 ± 1,4	3,8 ± 0,7	3,1 ± 0,8	4,2 ± 0,6	2,4 ± 0,1	8,3 ± 1,3	5,1 ± 0,6	14,4 ± 2,7	2,2 ± 0,2
T _{1/2} , ч T _{1/2} , h	RSD	49,66	48,63	47,95	51,74	48,08	62,55	33,80	13,85	37,65	29,23	45,94	25,29
	M ± SEM	6,2 ± 0,5	4,8 ± 0,2	6,5 ± 1,0	4,9 ± 0,4	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,3	5,3 ± 1,0	3,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,3 ± 0,2	7,2 ± 0,9	4,5 ± 0,2
	RSD	19,62	11,79	37,91	18,82	7,88	17,39	45,34	14,68	8,32	6,90	31,44	8,84
Cl/F, мл/ч Cl/F, ml/h	M ± SEM	251 ± 24	147 ± 13	70 ± 14	51 ± 4	1770 ± 135	1450 ± 73	597 ± 117	334 ± 33	2553 ± 277	2690 ± 205	836 ± 133	578 ± 29
	RSD	23,70	21,79	49,80	18,49	18,71	12,25	48,12	24,24	26,57	18,70	38,92	12,20
	M ± SEM	1756 ± 288	587 ± 119	614 ± 120	502 ± 98	9622 ± 2003	6502 ± 1740	3229 ± 469	1124 ± 111	28738 ± 2511	19599 ± 2719	15763 ± 2354	1830 ± 213
	RSD	40,12	49,72	47,79	47,75	50,98	65,55	35,57	24,13	21,40	33,98	36,57	28,52

Примечание. В/б – внутривенное введение.
Note. I/p – intraperitoneal injection.

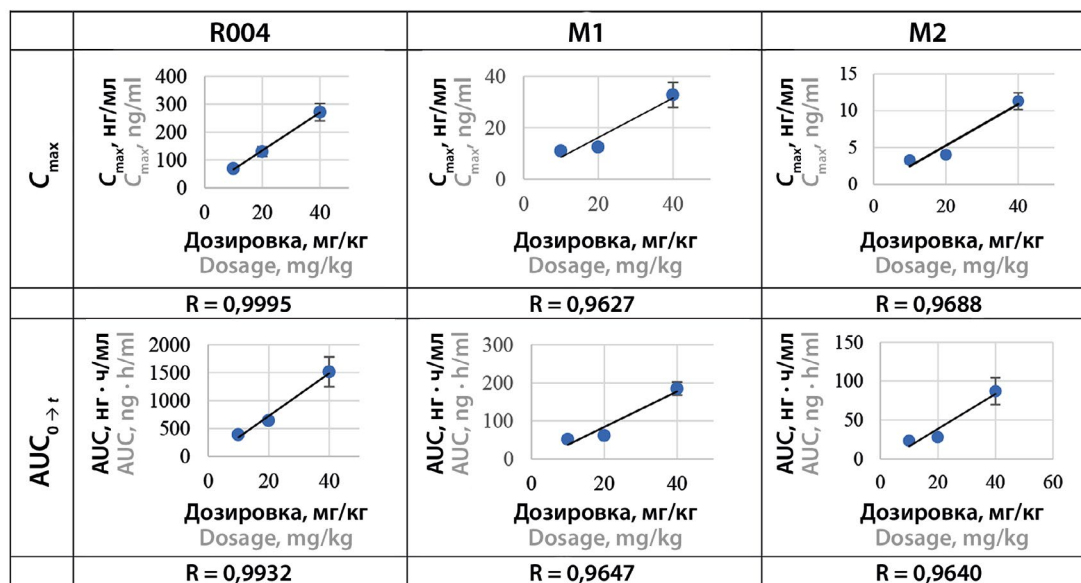


Рисунок 4. Результаты оценки линейности зависимости параметров C_{max} и $AUC_{0 \rightarrow t}$ от введенной дозы для 5-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболитов (со стандартной ошибкой среднего)

Figure 4. Results of evaluation of the linearity of dependence of C_{max} and $AUC_{0 \rightarrow t}$ parameters on the administered dose for 5-(2-butyl-5-chloro-1H-imidazole-4-yl)-N-[4-methoxy-3-(trifluoromethyl)phenyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole-5-carboxamide and its metabolites (with standard error of mean)

Для основных метаболитов M1 и M2 также характерно наличие двух периодов нарастания концентрации, как и для действующего вещества. После введения дозы 40 мг/кг T_{max} M1 смещена к начальным точкам фармакокинетической кривой, как и у R004, а T_{max} M2 достигается в районе $3,75 \pm 0,73$ ч. Величина параметров C_{max} и $AUC_{0 \rightarrow t}$ M1 и M2 изменяется линейно при увеличении дозы (см. рисунок 4).

Таким образом, 5-(2-бутил-5-хлоро-1H-имидазол-4-ил)-N-[4-метокси-3-(трифторметил)фенил]-4,5-дигидро-1,2-оксазол-5-карбоксамид и его метаболиты обладают линейной фармакокинетикой. Это позволяет использовать один уровень дозы R004 в эксперименте с многократным введением субстанции, а также хронической токсичности. Наличие энтерогепатической рециркуляции указывает на высокую липофильность изучаемого соединения и позволяет спрогнозировать высокие концентрации данного соединения в органах и тканях при исследовании распределения, а также в желчи и фекалиях при исследовании экскреции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная биоаналитическая методика определения R004 и его метаболитов в плазме была валидирована согласно требованиям руководств ЕАЭС по проведению исследований биоэквивалентности и ICH M10. Предпринятые меры по стабилизации

позволили предотвратить гидролиз R004 после пробоотбора и обеспечили достоверность полученных данных. R004, а также его метаболиты обладают линейной фармакокинетикой в диапазоне доз от 10 мг/кг до 40 мг/кг. Так, коэффициенты корреляции параметров C_{max} и $AUC_{0 \rightarrow t}$ данных соединений превышают 0,9. Относительная биодоступность субстанции изучаемого лекарственного средства при внутрижелудочном введении по сравнению с внутривенной инъекцией составила 21,26 %. В дальнейшем планируется изучение фармакокинетики готовой лекарственной формы R004 на кроликах с использованием разработанной методики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Scherer H. U., Häupl T., Burmester G. R. The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. 2020;110:102400. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.102400.
2. Romanycheva A. A., Korsakov M. K., Fedorov V. N., Shetnev A. A., Arshinov A. V. Prospects for innovative drugs for the treatment of rheumatoid arthritis. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2023;(12):55–63. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2023-12-07.
3. Kalogera S., He Y., Bay-Jensen A.-C., Gantzel T., Sun S., Manon-Jensen T., Karsdal M. A., Thudium C. S. The activation fragment of PAR2 is elevated in serum from patients with rheumatoid arthritis and reduced in response to anti-IL6R treatment. *Scientific Reports*. 2021;11(1):24285. DOI: 10.1038/s41598-021-03346-0.

4. Korsakov M. K., Fedorov V. N., Smirnov N. A., Shetnev A. A., Leonova O. V., Volkhin N. N., Andreyev A. I. Screening of anti-inflammatory activity of 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide (PAR-2 inhibitors) based on formaldehyde oedema model among white lab rats. *Research Results in Pharmacology*. 2023;9(4):105–111. DOI: 10.18413/rrpharmacology.9.10061.
5. Khokhlov A. L., Yaichkov I. I., Alexeev M. A., Korsakov M. K., Shetnev A. A., Ivanovsky S. A., Volkhin N. N., Petukhov S. S., Vasilyeva E. A. Identification and synthesis of metabolites of the new 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide derivate. *Research Results in Pharmacology*. 2024;10(2):83–95. DOI: 10.18413/rrpharmacology.10.482.
6. Mironov A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
7. Hu W., Zhong Z.-Y., Gao Y.-T., Ren X.-F., Liu H.-Y., Tang X.-J. Establishment of LC-MS/MS Method for Determination of GMDTC in Rat Plasma and Its Application in Pre-clinical Pharmacokinetics. *Molecules*. 2023;28(3):1191. DOI: 10.3390/molecules28031191.
8. Sun P., Xiao H., Qiu J., Cao Y., Kong J., Zhang S., Cao X. Plasma Protein Binding Rate and Pharmacokinetics of Lekethromycin in Rats. *Antibiotics*. 2022;11(9):1241. DOI: 10.3390/antibiotics11091241.
9. Yang Z., Sun Q., Wang S., Tang B., Yuan C., Wu Y., Dai J., Yang C., Wang L., Zhou Q., Wang J., Weng Q. Pharmacokinetics, tissue distribution, and plasma protein binding rate of curcumol in rats using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1036732. DOI: 10.3389/fphar.2022.1036732.
10. Xiong J., Xu Y., He S., Zhang Y., Wang Z., Wang S., Jiang H. Pharmacokinetics and bioavailability of tildipirosin in rabbits following single-dose intravenous and intramuscular administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2020;43(5):448–453. DOI: 10.1111/jvp.12882.
11. Wilson S. E., Carpenter J. W., Gardhouse S., KuKanich B. Pharmacokinetics of mavacoxib in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *American Journal of Veterinary Research*. 2023;84(5). DOI: 10.2460/ajvr.22.11.0196.

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.282.84

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1923>



Противогрибковая активность нового производного тиадиазола при экспериментальном кандидозе у мышей

Д. Ю. Ивкин[✉], А. В. Караваева, Т. Ф. Черных, М. В. Краснова

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, литера А

✉ Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ORCID: Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;
А. В. Караваева – <https://orcid.org/0000-0001-8231-6364>;
Т. Ф. Черных – <https://orcid.org/0009-0000-1539-8013>;
М. В. Краснова – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>.

Статья поступила: 30.08.2024

Статья принята в печать: 18.11.2024

Статья опубликована: 22.11.2024

Резюме

Введение. В современном мире все больше внимания уделяется проблеме увеличения случаев микозов. В октябре 2022 года ВОЗ опубликовала первый список патогенных грибов, требующих первоочередного внимания и представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. Среди микотических инфекций одну из лидирующих позиций по частоте занимают различные формы кандидоза. Дрожжи *Candida albicans* ВОЗ отнесены к группе с критическим приоритетом. Поэтому поиск новых эффективных антимикотических средств является актуальным. В Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете было синтезировано новое производное 1,3,4-тиадиазола. В опытах *in vitro* было показано, что оно обладает широким спектром противогрибковой активности, по эффективности сопоставимым с вориконазолом.

Цель. Оценить противогрибковую активность фармацевтической субстанции хлорида 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия (производное тиадиазола, ПТ) на моделях неинвазивного кандидоза кишечника и острой септицемии (сепсиса), вызванных *C. albicans*.

Материалы и методы. Моделирование неинвазивного кандидоза кишечника проводили путем инфицирования мышей линии BALB/c кандидой при свободном доступе к поилке, содержащей суспензию дрожжевых клеток *C. albicans*. Предварительно у животных вызывали дисбактериоз раствором антибиотиков (ванкомицин, клиндамицин, гентамицин) в питьевой воде. Моделирование острой септицемии, вызванное *C. albicans*, проводили путем инфицирования мышей линии BALB/c внутривенным введением взвеси дрожжевой культуры. После заражения мышей им ежедневно однократно внутривенно вводили исследуемую субстанцию и препараты сравнения – вориконазол и флуконазол. В конце эксперимента оценивали количество павших животных и проводили микробиологическое исследование внутренних органов.

Результаты и обсуждение. Было показано, что количество дрожжевых клеток, выделяемых из толстого и тонкого кишечника у мышей с неинвазивным кандидозом кишечника, после введения нового производного тиадиазола во всех испытанных дозах (1, 5, 10 мг/кг) достоверно снижалось по сравнению с контрольной группой № 6 без лечения. В дозе 10 мг/кг испытуемая субстанция проявляла антикандидозное действие на уровне препаратов сравнения, вориконазола и флуконазола. У мышей с септиемией летальность также зависела от дозы производного тиадиазола, но эффективной дозой оказалась только 10 мг/кг.

Заключение. В ходе исследования выявлено, что новое производное тиадиазола хлорид 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия проявляло противогрибковую активность в отношении *Candida albicans* на модели неинвазивного кандидоза кишечника и модели септицемии (сепсиса). Установлено, что в дозе 10 мг/кг ПТ проявляло активность на уровне препаратов сравнения, вориконазола и флуконазола.

Ключевые слова: кандидоз кишечника, острая септицемия, противогрибковая активность, производное тиадиазола, *Candida albicans*

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

Вклад авторов. Д. Ю. Ивкину принадлежит научная идея и окончательная корректура статьи. А. В. Караваева отвечала за дизайн эксперимента, участвовала в написании статьи. Т. Ф. Черных проводила моделирование кандидоза, участвовала в обработке данных. М. В. Краснова участвовала в написании статьи. Все авторы участвовали в обсуждении статьи.

© Ивкин Д. Ю., Караваева А. В., Черных Т. Ф., Краснова М. В., 2024

© Ivkin D. Yu., Karavaeva A. V., Chernykh T. F., Krasnova M. V., 2024

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России».

Для цитирования: Ивкин Д. Ю., Караваяева А. В., Черных Т. Ф., Краснова М. В. Противогрибковая активность нового производного тиadiaзола при экспериментальном кандидозе у мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):251–258. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1923>

Antifungal activity of thiadiazole derivative in experimental candidiasis in mice

Dmitry Yu. Ivkin✉, Anna V. Karavaeva, Tatyana F. Chernykh, Marina V. Krasnova

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

✉ **Corresponding author:** Dmitry Yu. Ivkin. **E-mail:** dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ORCID: Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

Anna V. Karavaeva – <https://orcid.org/0000-0001-8231-6364>;

Tatyana F. Chernykh – <https://orcid.org/0009-0000-1539-8013>;

Marina V. Krasnova – <https://orcid.org/0000-0001-8138-6408>.

Received: 30.08.2024

Accepted: 18.11.2024

Published: 22.11.2024

Abstract

Introduction. In the modern world, more attention is paid to the problem of increasing cases of mycosis. In October 2022, the World Health Organization (WHO) published the first fungal priority pathogens list which constitute the greatest danger to human health. Among mycotic infections, one of the leading positions in frequency is occupied by various forms of candidiasis. The WHO has classified *Candida albicans* as a critical priority group. Therefore, the search for new effective antimycotics is relevant. A new derivative of 1,3,4-thiadiazole was synthesized at Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. *In vitro* experiments, it was shown that it has a wide spectrum of antifungal activity in effectiveness comparable to voriconazole.

Aim. To evaluate the antifungal activity of 2-[(1Z)-1-(3,5-diphenyl-1,3,4-thiadiazol-2(3H)-ylidene)methyl]-3,5-diphenyl-1,3,4-thiadiazole-3-ium (thiadiazole derivative, TD) chloride drug substance in non-invasive bowel candidiasis and acute septicemia (sepsis) models caused by *C. albicans*.

Materials and methods. Simulations of non-invasive intestinal candidiasis were performed by infecting BALB/c mice with candida with free access to a drinking bottle containing *C. albicans* yeast cells suspension. Previously, dysbiosis was caused in animals by adding a solution of antibiotics (vancomycin, clindamycin, gentamicin) in drinking water. Simulations of *C. albicans*-induced acute septicemia were performed by infecting BALB/c mice with intravenous yeast culture suspension. After the mice were infected, the test substance and the comparators Voriconazole and Fluconazole were administered intragastrically once daily. At the end of the experiment, the number of fallen animals were estimated and microbiological examination of internal organs was carried out.

Results and discussion. It was shown that the number of yeast cells secreted from the large and small intestines in mice with non-invasive intestinal candidiasis after administration of a new thiadiazole derivative at all doses tested (1, 5, 10 mg/kg) were significantly reduced compared with control group No. 6 without treatment. At 10 mg/kg, the test substance demonstrated anticandidosis effects at the level of comparators drugs, Voriconazole and Fluconazole. In mice with septicemia, mortality also depended from the dose of the thiadiazole derivative, but only 10 mg/kg proved to be an effective dose.

Conclusion. The study revealed that the new thiadiazol derivative 2-[(1Z)-1-(3,5-diphenyl-1,3,4-thiadiazol-2(3H)-ylidene)methyl]-3,5-diphenyl-1,3,4-thiadiazole-3-ium showed antifungal activity against *Candida albicans* in the model of non-invasive intestinal candidiasis and the model of septicemia (sepsis). At 10 mg/kg, TD was found to be active at the level of comparators, Voriconazole and Fluconazole.

Keywords: intestinal candidiasis, acute septicemia, antifungal activity, thiadiazole derivative, *Candida albicans*

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

Contribution of the authors. Dmitry Yu. Ivkin was responsible for the scientific idea and final proofreading of the article. Anna V. Karavaeva was responsible for the design of the experiment, participated in writing the article. Tatyana F. Chernykh conducted candidiasis modeling, participated in data processing. Marina V. Krasnova participated in writing the article. All authors participated in the discussion of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University".

For citation: Ivkin D. Yu., Karavaeva A. V., Chernykh T. F., Krasnova M. V. Antifungal activity of thiadiazole derivative in experimental candidiasis in mice. *Drug development & registration*. 2024;13(4):251–258. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1923>

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире все больше внимания уделяется проблеме увеличения случаев микозов. Есть несколько причин данного положения дел. Во-первых, возрастает количество людей со сниженным иммунитетом. Это люди со злокачественными образованиями, после трансплантации органов, ВИЧ-инфицированные, получающие агрессивную химиотерапию (например, глюкокортикостероиды, иммунодепрессанты, противоопухолевые препараты), а также люди пожилого возраста [1–8]. Во-вторых, участились случаи микозов, связанные с оказанием такой медицинской помощи, как гемодиализ, длительная искусственная вентиляция легких, пролонгированная катетеризация центральных вен [1, 9]. В-третьих, микозы возникают при дисбактериозе, вызванном длительным или повторным применением антибактериальных препаратов [1, 5, 9]. В-четвертых, увеличились темпы появления устойчивых патогенных и условно-патогенных грибов к широко распространенным антимикотикам [1, 3]. Все это привело к тому, что в октябре 2022 года ВОЗ опубликовала первый список патогенных грибов, требующих первоочередного внимания и представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека¹ [3]. В данном списке 19 грибковых патогенов были разделены на три группы (критические, высокие и средние) по приоритетности научных изысканий. Кроме того, в докладе ВОЗ отмечено, что на данный момент существует всего четыре класса противогрибковых лекарственных препаратов и всего несколько препаратов-кандидатов в стадии клинических разработок. Дрожжи *Candida albicans* и *Candida auris* ВОЗ отнесены к группе с критическим приоритетом.

Среди микотических инфекций одну из лидирующих позиций по частоте занимают различные формы кандидоза. Дрожжи *Candida* spp. составляют 8–10 % всех нозокомиальных инфекций. Они занимают четвертое место после *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus* spp. среди наиболее часто выделяемых из крови возбудителей. Причем на *C. albicans* приходится 15–60 % случаев. На инфекции кровотока, связанные с *Candida* spp., в мире приходится 600 000 случаев в год, а количество ежегодно регистрируемых случаев инвазивного кандидоза без положительного посева крови составляет более 900 000 во всем мире [1, 3, 9].

Дрожжи рода *Candida* отличает способность колонизировать различные биотопы организма человека, сохранять жизнеспособность при контактном механизме передачи в лечебно-профилактических учреждениях, формировать биопленку на различных искусственных материалах (например, имплантах) [9].

¹ WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 25 October 2022. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>. Accessed: 30.08.2024.

C. auris отличает множественная лекарственная устойчивость и возможность вызывать инвазивные инфекции и вспышки с высоким уровнем смертности среди госпитализированных пациентов, особенно в отделениях интенсивной терапии [9, 11].

Из вышесказанного следует, что поиск новых эффективных антимикотических средств является актуальным. В Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете было синтезировано новое производное 1,3,4-тиадиазола. В опытах *in vitro* было показано, что оно обладает широким спектром противогрибковой активности, по эффективности сопоставимым с вориконазолом [12].

Цель исследования – оценка противогрибковой эффективности фармацевтической субстанции хлорида 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия (производное тиадиазола, ПТ) на моделях неинвазивного кандидоза кишечника и острой септицемии (сепсиса), вызванных *Candida albicans*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тест-микроорганизм: *Candida albicans* 45 ВГНКИ VRC-S FLU-S, клинический изолят, чувствительный к флуконазолу и вориконазолу.

Исследуемая фармацевтическая субстанция: хлорид 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия.

Препараты сравнения: флуконазол, субстанция (серия FL0040115, HETERO DRUGS Limited, Индия); вориконазол, субстанция (серия C10463132, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH, Германия).

Препараты, используемые при моделировании инфекции: ванкомицин, лиофилизат для приготовления растворов для приема внутрь (Ванкомицин-Тева, Венгрия); клиндамицин, раствор для инфузий (серия C500141, Hemopharm infectologica, Сербия).

Контрольное вещество: вода очищенная в соответствии с ФС².

Исследование проводилось на 280 мышах-самках линии BALB/c массой 18–20 г. Источник получения животных – филиал «Столбовая» НЦБМТ РАМН. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (ви-вариев).

Перерасчет доз препаратов для мышей с человека проводили при помощи коэффициентов в зависимости от массы тела по E. J. Freireich (1966) [13]. Индивидуальный объем вводимой дозы для каждого животного рассчитывался исходя из значения массы тела, полученного после последнего взвешивания.

² Государственная фармакопея РФ XIV издания, ФС.2.2.0020 «Вода очищенная». Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-2-0020-15-voda-ochishhennaya/>. Ссылка активна на 30.08.2024.

Моделирование неинвазивного кандидоза кишечника

Методом рандомизации было сформировано 7 экспериментальных групп по 20 животных в каждой (5 опытных и 2 контрольных). Животные 1 группы получали исследуемую субстанцию в дозе 1 мг/кг и были инфицированы кандидой, животные 2 группы получали исследуемую субстанцию в дозе 5 мг/кг и были инфицированы кандидой, животные 3 группы получали исследуемую субстанцию в дозе 10 мг/кг и были инфицированы кандидой, животные 4 группы получали препарат сравнения вориконазол в дозе 26 мг/кг и были инфицированы кандидой, животные 5 группы получали препарат сравнения флуконазол в дозе 25 мг/кг и были инфицированы кандидой, животные 6 группы (контрольной 1) получали воду очищенную и были инфицированы кандидой, животные 7 группы (контрольной 2) получали воду очищенную, не были инфицированы.

Схема проведения эксперимента.

1 этап. Подготовка грибной взвеси *C. albicans* 45 ВГНКИ VRC-S FLU-S.

C. albicans культивировали в течение 24 ч при температуре 36 °C на среде Сабуро. Затем биомассу смывали физиологическим раствором с добавлением стрептомицина 2 мг/мл, подсчитывали концентрацию дрожжевых клеток в камере Горяева и доводили ее до $1,0E + 10$ /мл. Для контроля концентрации дрожжевых клеток делали посев 1 мл приготовленной суспензии культуры на среду Сабуро и через 24 ч подсчитывали количество выросших колоний. Приготовленную суспензию хранили в холодильнике в течение 24 ч до получения результатов количественного учета жизнеспособных дрожжевых клеток. Для заражения животных использовали культуру одной генерации.

2 этап. Антибиотикотерапия экспериментальных мышей линии BALB/c.

В течение 4 суток животные всех групп вместо питьевой воды получали раствор антибиотиков в питьевой воде. Раствор содержал 1 мг/мл ванкомицина, 1 мг/мл клиндамицина и 200 мг/мл гентамицина.

3 этап. Инфицирование мышей.

За 8 ч до инфицирования ограничивали доступ животных к питьевой воде. Культуральную взвесь (см. этап 1, $1,0E + 10$ КОЕ/мл) разводили в десятикратном объеме питьевой воды. Полученной взвесью на 24 ч заменяли питьевую воду для мышей во всех группах, кроме группы № 7 (контрольная 2). По истечении этого времени мыши снова получали питьевую воду.

4 этап. Фармакологическая терапия.

Исследуемую субстанцию и препараты сравнения вводили внутривентрикулярно при помощи желудочного зонда (1,3 мм) в объеме 0,5 мл ежедневно однократно в первой половине дня начиная со следующего дня после инфицирования в течение 15 суток.

5 этап. Учет результатов эксперимента (клиническое наблюдение за животными, исследование органов ЖКТ на выявление *C. albicans*).

Каждый пятый день после начала терапии случайно отбирали 3 животных в каждой группе, подвергали их эвтаназии (метод эвтаназии – цервикальная дислокация) и вскрывали. Затем проводили микробиологическое исследование тонкого и толстого кишечника с целью выделения *C. albicans* и количественного учета дрожжевых клеток.

В качестве критерия эффективности лекарственной терапии использовали количество дрожжевых клеток, выделяемых из органов пищеварительной системы животных из контрольных и опытных групп на день окончания эксперимента. Для статистической обработки и выражения промежуточных и итоговых данных использованы логарифмические единицы, выражающие значение показателя «КОЕ/орган» в виде десятичного логарифма числа КОЕ, выделенных из соответствующего органа.

Моделирование острой септицемии, вызванное *C. albicans*

Методом рандомизации было сформировано 7 экспериментальных групп по 20 животных в каждой (5 опытных и 2 контрольных). Животные 1 группы получали исследуемую субстанцию в дозе 1 мг/кг и были инфицированы кандидой в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ, животные 2 группы получали исследуемую субстанцию в дозе 5 мг/кг и были инфицированы кандидой в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ, животные 3 группы получали исследуемую субстанцию в дозе 10 мг/кг и были инфицированы кандидой в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ, животные 4 группы получали препарат сравнения вориконазол в дозе 26 мг/кг и были инфицированы кандидой в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ, животные 5 группы получали препарат сравнения флуконазол в дозе 25 мг/кг и были инфицированы кандидой в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ, животные 6 группы (контрольной 1) получали воду очищенную и были инфицированы кандидой в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ, животные 7 группы (контрольной 2) получали воду очищенную, не были инфицированы.

Схема проведения эксперимента.

1 этап. Подготовка грибной взвеси *C. albicans* 45 ВГНКИ VRC-S FLU-S.

C. albicans культивировали в течение 24 ч при температуре 36 °C на среде Сабуро. Затем биомассу смывали физиологическим раствором, подсчитывали концентрацию дрожжевых клеток в камере Горяева и доводили ее до $1,0E + 8$ /мл. Для контроля концентрации дрожжевых клеток делали посев 1 мл приготовленной суспензии культуры на среду Сабуро и через 24 ч подсчитывали количество выросших колоний. Приготовленную суспензию хранили в холодильнике в течение 24 ч до получения результатов количественного учета жизнеспособных дрожжевых клеток. Для заражения животных использовали культуру одной генерации.

2 этап. Инфицирование мышей.

Мышей инфицировали внутривенным введением (в хвостовую вену) 0,25 мл свежеприготовленной (см. 1 этап) взвесью дрожжевой культуры. Таким образом, каждое животное получало $2,5 \times 10^7$ дрожжевых клеток.

3 этап. Фармакологическая терапия.

Исследуемую субстанцию и препараты сравнения вводили внутривенно при помощи желудочного зонда (1,3 мм) в объеме 0,5 мл ежедневно однократно в первой половине дня начиная со дня заражения и продолжали до гибели всех животных из 6 группы (контрольной 1). Дата гибели всех животных данной группы считалась датой окончания эксперимента.

4 этап. Учет результатов.

В качестве критерия эффективности лекарственного препарата использовали количество павших животных в опытных группах по сравнению с контрольной группой (№ 6), не получавшей лечения. Для учета животного в анализе было необходимо удостовериться в причине его гибели. Павших животных вскрывали и проводили микробиологическое исследование внутренних органов (печень, селезенка). Необходимым условием для включения животного в анализ служило выделение из внутренних органов *C. albicans*. Павшие животные, из органов которых кандиды не выделялись, признавались погибшими от случайных факторов и в статистический анализ не включались.

Статистическая обработка результатов.

В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики согласно рекомендациям Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [14]. Межгрупповые различия анализировали непараметрическими методами для множественного сравнения с использованием критерия Манна–Уитни. Различия определяли при 0,05 уровне значимости. Использовалось программное обеспечение STATISTICA 6.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании неинвазивного кандидоза кишечника мыши линии BALB/c из опытных групп (№№ 1–5) и контрольной группы № 6 получали антибиотики (ванкомицин, клиндамицин и гентамицин) в течение 4 дней с целью вызвать дисбактериоз кишечника у мышей для облегчения инфицирования кандидой. Затем питьевую воду заменяли питьевой водой с клетками *C. albicans* в концентрации $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл на 24 ч, обеспечивали свободный доступ к питью. Начиная со следующего дня после инфицирования в течение 15 суток животным ежедневно внутривенно вводили исследуемую субстанцию в дозах 1, 5 или 10 мг/кг, а также препараты сравнения в терапевтической дозе в зависимости от группы. Каждый пятый день после начала терапии проводили

микробиологическое исследование тонкого и толстого кишечника с целью выделения *C. albicans* и количественного учета дрожжевых клеток. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Анализ данных таблицы показывает, что количество дрожжевых клеток, выделяемых из толстого и тонкого кишечника после введения исследуемой субстанции во всех испытанных дозах, достоверно снижалось по сравнению с контрольной группой № 6 без лечения. Наблюдался дозозависимый эффект. Наиболее эффективной была доза ПТ 10 мг/кг, после введения которой уже на 10 день после инфицирования кандиды не выделялись. После введения инфицированным мышам препаратов сравнения в терапевтической дозе на 10 день после заражения кандиды также не выделялись.

Таким образом, субстанция хлорида 2-[[1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия проявляла противогрибковую активность в отношении *C. albicans* на модели неинвазивного кандидоза кишечника мышей в дозах 1, 5 и 10 мг/кг. Более того, в дозе 10 мг/кг ПТ проявлял антикандидозное действие на уровне препаратов сравнения, вориконазола и флуконазола.

При моделировании острой септицемии, вызванной *C. albicans*, мышей линии BALB/c из опытных групп (№№ 1–5) и контрольной группы № 6 инфицировали взвесью *C. albicans* внутривенно в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ/мышь. В тот же день начинали вводить внутривенно исследуемую субстанцию в дозах 1, 5 или 10 мг/кг, а также препараты сравнения в терапевтической дозе в зависимости от группы. Введение продолжали до гибели всех животных из контрольной группы № 6. Дата гибели всех животных данной контрольной группы № 6 считалась датой окончания эксперимента. Динамика гибели мышей в ходе эксперимента представлена в таблице 2.

Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что все животные первой контрольной группы № 6 погибли в течение 6 дней. Поэтому эксперимент далее не продолжали. Через 6 дней после инфицирования и лечения исследуемой субстанцией в дозе 1 мг/кг погибло 18 мышей из 20, при лечении в дозе 5 мг/кг – 12 мышей, при лечении в дозе 10 мг/кг – 3 мыши. Таким образом, так же как и при неинвазивном кандидозе кишечника, на данной модели тоже наблюдалась зависимость эффекта от дозы. Однако достоверным отличием от контрольной группы № 6 без лечения можно считать только вариант с применением дозы 10 мг/кг.

Чтобы удостовериться в том, что причина гибели мышей связана с кандидозом, павших животных вскрывали и проводили микробиологическое исследование печени и селезенки. Из органов павших животных была выделена *C. albicans* в количестве не менее 30 КОЕ на 1 мл гомогената органа. Таким образом, можно сделать вывод о том, что все павшие животные погибли в результате развития септицемии, вызванной *C. albicans*.

Таблица 1. Количество дрожжевых клеток, выделяемых из органов, (log 10) КОЕ/орган

Table 1. Number of yeast cells excreted from organs (log 10) CFU/organ

Группа Group	Кишечник Intestinal tract	Дни после инфицирования Days after infection		
		5	10	15
1. ПТ 1 мг/кг 1. TD 1 mg/kg	Тонкий Small	1,80 ± 0,23*	1,53 ± 0,15*	1,13 ± 0,03*
	Толстый Large	2,97 ± 0,03*	2,37 ± 0,20*	1,97 ± 0,09*
2. ПТ 5 мг/кг 2. TD 5 mg/kg	Тонкий Small	0,90 ± 0,10*	0,97 ± 0,09*	0,17 ± 0,07*
	Толстый Large	0,93 ± 0,07*	0,53 ± 0,09*	0,13 ± 0,03*
3. ПТ 10 мг/кг 3. TD 10 mg/kg	Тонкий Small	0,13 ± 0,03*	0	0
	Толстый Large	0,13 ± 0,03*	0	0
4. Вориконазол 4. Voriconazole	Тонкий Small	0,10 ± 0,00*	0	0
	Толстый Large	0,10 ± 0,00*	0	0
5. Флуконазол 5. Fluconazole	Тонкий Small	0,10 ± 0,00*	0	0
	Толстый Large	0,10 ± 0,00*	0	0
6. Контроль 1 6. Control 1	Тонкий Small	2,93 ± 0,03	2,50 ± 0,17	2,27 ± 0,15
	Толстый Large	4,07 ± 0,03	4,17 ± 0,12	4,10 ± 0,21
7. Контроль 2 7. Control 2	Тонкий Small	0	0	0
	Толстый Large	0	0	0

Примечание. * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой № 6.

Note. * $p \leq 0.05$ compared to group № 6.

Таблица 2. Количество погибших животных в ходе эксперимента

Table 2. Number of animal mortality during the experiment

Группа Group	Количество животных Number of animals	Дни после инфицирования Days after infection						Всего погибших животных Total animal mortality
		1	2	3	4	5	6	
1. ПТ 1 мг/кг 1. TD 1 mg/kg	20	2	0	2	5	6	3	18
2. ПТ 5 мг/кг 2. TD 5 mg/kg	20	0	1	2	7	1	1	12
3. ПТ 10 мг/кг 3. TD 10 mg/kg	20	0	0	1	0	1	1	3
4. Вориконазол 4. Voriconazole	20	0	0	1	1	0	0	2
5. Флуконазол 5. Fluconazole	20	0	0	0	0	0	1	1
6. Контроль 1 6. Control 1	20	1	1	3	3	8	4	20
7. Контроль 2 7. Control 2	20	0	0	0	0	0	0	0

В результате проведенного эксперимента по оценке противогрибковой активности субстанции производного тиадиазола на модели септицемии, вызванной *C. albicans*, было показано, что эффективная доза исследуемой субстанции составила 10 мг/кг. Результат лечения был сопоставим с эффективностью препаратов сравнения – вориконазола и флуконазола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования выявлено, что новое производное тиадиазола хлорид 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия проявляло противогрибковую активность в отношении *Candida albicans* на модели неинвазивного кандидоза кишечника и модели септицемии (сепсиса). Установлено, что в дозе 10 мг/кг ПТ проявляло активность на уровне препаратов сравнения, вориконазола и флуконазола.

ЛИТЕРАТУРА

- Акимкин В. Г., Тутельян А. В., Шулакова Н. И. Микологический айсберг: современные сдвиги в эпидемиологии микозов. *Инфекционные болезни*. 2022;20(1):120–126. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-1-120-126.
- Липницкий А. В., Половец Н. В., Муругова А. А., Топорков А. В. Анализ и прогноз распространения в мире особо опасных микозов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(4):16–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-16-23.
- Casalini G., Giacomelli A., Antinori S. The WHO fungal priority pathogens list: a crucial reappraisal to review the prioritisation. *The Lancet Microbe*. 2024;5(7):717–724. DOI: 10.1016/S2666-5247(24)00042-9.
- Хостелиди С. Н. Инвазивные микозы у реципиентов трансплантатов внутренних органов (обзор литературы). *Проблемы медицинской микологии*. 2023;25(4):3–14. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-4-3-14.
- Багирова Н. С. Инвазивные грибковые инфекции: пересмотр определений, новое в диагностике по данным EORTC/MSGERC. *Злокачественные опухоли*. 2020;10(3S1):39–48. DOI: 10.18027/2224-5057-2019-10-3S1-39-48.
- Попова М. О., Рогачева Ю. А. Инвазивные микозы у пациентов с онкогематологическими заболеваниями и реципиентов трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: результаты систематического обзора, обзора литературы и метаанализа. *Онкогематология*. 2023;18(1):101–120. DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-1-101-120.
- Wang R., Huang C., Zhang Y., Li R. Invasive dermatophyte infection: A systematic review. *Mycoses*. 2021;64(4):340–348. DOI: 10.1111/myc.13212.
- Jacobs S. E., Wengenack N. L., Walsh T. J. Non-Aspergillus Hyaline Molds: Emerging Causes of Sino-Pulmonary Fungal Infections and Other Invasive Mycoses. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020;41(1):115–130. DOI: 10.1055/s-0039-3401989.

- Казак В. И., Черновецкий М. А., Скоповец Е. Я. Инвазивные грибковые инфекции: эпидемиология и диагностика (обзор литературы). *Лабораторная диагностика*. *Восточная Европа*. 2023;11(3):363–374. DOI: 10.34883/PI.2022.11.3.011.
- Махрова Т. В., Заславская М. И., Галка А. Г., Костров А. В. Противогрибковое действие холодной гелиевой плазмы на *Candida* spp. в экспериментах *in vitro*. *Проблемы медицинской микологии*. 2020;22(2):45–49. DOI: 10.24412/1999-6780-2020-2-45-49.
- Босак И. А., Выборнова И. В., Чилина Г. А., Оганесян Э. Г., Венчакова В. В., Паршикова Е. Г., Богомолова Т. С., Ковыркин С. В., Авдеенко Ю. Л., Карпов С. А., Павлова И. Э., Васильева Н. В. Вирулентность и особенности патогенеза диссеминированного кандидоза, обусловленного штаммами *Candida auris* с различной фосфолипидной активностью, в экспериментальной модели. *Проблемы медицинской микологии*. 2023;25(4):52–58. DOI: 10.24412/1999-6780-2023-4-52-58.
- Кошевенко А. С., Ананьева Е. П., Яковлев И. П., Юсковец В. Н. Антифунгальная активность новых производных 1,3,4-тиадиазола. *Проблемы медицинской микологии*. 2016;18(3):42–44.
- Freireich E. J., Gehan E. A., Rail D. P., Schmidt L. H., Skipper H. E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemotherapy Reports*. 1966;50(4):219–244.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.

REFERENCES

- Akimkin V. G., Tutelyan A. V., Shulakova N. I. Medical mycological iceberg: recent trends in the epidemiology of mycoses. *Infectious diseases*. 2022;20(1):120–126. (In Russ.) DOI: 10.20953/1729-9225-2022-1-120-126.
- Lipnitsky A. V., Polovets N. V., Murugova A. A., Toporkov A. V. Analysis and Forecast of the Spread of Particularly Dangerous Mycoses around the World. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(4):16–23. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-16-23.
- Casalini G., Giacomelli A., Antinori S. The WHO fungal priority pathogens list: a crucial reappraisal to review the prioritisation. *The Lancet Microbe*. 2024;5(7):717–724. DOI: 10.1016/S2666-5247(24)00042-9.
- Khoshelidi S. N. Invasive mycoses in recipients of solid organ transplants (literature review). *Problems in Medical Mycology*. 2023;25(4):3–14. (In Russ.) DOI: 10.24412/1999-6780-2023-4-3-14.
- Bagirova N. S. Invasive fungal infections: revision of definitions, new in diagnosis according to data EORTC/MSGERC. *Malignant Tumours*. 2020;10(3s1):39–48. (In Russ.) DOI: 10.18027/2224-5057-2019-10-3s1-39-48.
- Popova M. O., Rogacheva Yu. A. Invasive mycoses in patients with hematological malignancies and recipients of hematopoietic stem cell transplantation: results of a systematic review, literature review and meta-analysis. *Oncohematology*. 2023;18(1):101–120. (In Russ.) DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-1-101-120.

7. Wang R., Huang C., Zhang Y., Li R. Invasive dermatophyte infection: A systematic review. *Mycoses*. 2021;64(4):340–348. DOI: 10.1111/myc.13212.
8. Jacobs S.E., Wengenack N.L., Walsh T.J. Non-Aspergillus Hyaline Molds: Emerging Causes of Sino-Pulmonary Fungal Infections and Other Invasive Mycoses. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020;41(1):115–130. DOI: 10.1055/s-0039-3401989.
9. Kazak V.I., Tchernovetskiy M.A., Skopovets E.Ya. Invasive fungal infections: epidemiology and diagnostics (literature review). Laboratory diagnostics. *Eastern Europe*. 2023;11(3): 363–374. (In Russ.) DOI: 10.34883/Pl.2022.11.3.011.
10. Makhrova T.V., Zaslavskaya M.I., Galka A.G., Kostrov A.V. Antifungal action of cold helium plasma on *Candida* spp. in experiments *in vitro*. *Problems in Medical Mycology*. 2020;22(2):45–49. (In Russ.) DOI: 10.24412/1999-6780-2020-2-45-49.
11. Bosak I.A., Vybornova I.V., Chilina G.A., Oganessian E.G., Venchakova V.V., Parshikova E.G., Bogomolova T.S., Kovyrshin S.V., Avdeenko Y.L., Karpov S.A., Pavlova I.V., Vasilyeva N.V. Virulence and pathogenesis features of disseminated candidiasis caused by *Candida auris* strains with different phospholipase activities in an experimental model. *Problems in Medical Mycology*. 2023;25(4):52–58. (In Russ.) DOI: 10.24412/1999-6780-2023-4-52-58.
12. Koshevenko A.S., Ananyeva E.P., Yakovlev I.P., Yuskovets V.N. Antifungal activity of new derivatives of 1,3,4-thiadiazole. *Problems in Medical Mycology*. 2016;18(3):42–44. (In Russ.)
13. Freireich E.J., Gehan E.A., Rail D.P., Schmidt L.H., Skipper H.E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemotherapy Reports*. 1966;50(4):219–244.
14. Guidelines for Preclinical Trials of Medicinal Products. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)

Оригинальная статья / Research article

УДК 615.03

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1965>



Изучение фармакокинетики производного малоновой кислоты этмабена в рамках I фазы клинического исследования

П. К. Карнакова^{1,2}✉, К. К. Карнакова¹, Т. Н. Комаров^{1,2,3}, Н. С. Багаева¹,
М. О. Попова¹, Д. Ю. Ивкин², О. А. Арчакова¹, И. Е. Шохин^{1,2}, И. А. Наркевич²

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА»). 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, литера А

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН). 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

✉ Контактное лицо: Карнакова Полина Константиновна. E-mail: p.karnakova@cpha.ru

ORCID: П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>;

К. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-4010-1231>;

Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>;

Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;

М. О. Попова – <https://orcid.org/0009-0008-1688-1902>;

Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;

И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>;

И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 06.11.2024

Статья принята в печать: 26.11.2024

Статья опубликована: 27.11.2024

Резюме

Введение. Этмабен – производное малоновой кислоты с кардиотропной активностью, являющееся перспективным средством для лечения ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности. Препарат «Этмабен» находится на фазе I клинических исследований (КИ), ранее его фармакокинетика у человека не изучалась.

Цель. Целью исследования является изучение фармакокинетики препарата «Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг» (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России) у здоровых добровольцев после приема натошак различных доз препарата при однократном и многократном применении в течение 7 дней.

Материалы и методы. В открытом нерандомизированном КИ приняли участие 48 здоровых добровольцев, разделенных на 6 когорт. Добровольцы когорты 1 принимали по 600 мг этмабена однократно, когорты 2 – по 900 мг однократно, когорты 3 – по 1200 мг однократно. Добровольцы когорты 4 получали суточную дозу 600 мг, когорты 5 – 900 мг, когорты 6 – 1200 мг. Концентрации этмабена в плазме крови определялись методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Фармакокинетические параметры вычислялись с помощью Microsoft Excel с расширением Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США).

Результаты и обсуждение. Фармакокинетические параметры были рассчитаны для 6 когорт по 8 добровольцев после однократного и многократного применения препарата «Этмабен» в дозах 600, 900 и 1200 мг. Максимальная концентрация этмабена (C_{max}) в плазме достигалась в среднем за 0,5 ч. C_{max} варьировались от $2,708 \pm 1,461$ мкг/мл до $19,871 \pm 4,415$ мкг/мл. Максимальный период полувыведения составил $0,874 \pm 0,236$ ч. Константа элиминации не превышала $1,053 \pm 0,149$ ч⁻¹. Среднее время удержания (MRT) этмабена в плазме составило не более $1,527 \pm 0,272$ ч. Среднее значение объема распределения составило более 45 л, а клиренса – более 42 л, что указывает на значительное распределение в тканях и быстрое выведение препарата. Невысокие значения площадей под кривыми «концентрация – время» и высокая скорость элиминации свидетельствуют о минимальной кумуляции этмабена.

© Карнакова П. К., Карнакова К. К., Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Попова М. О., Ивкин Д. Ю., Арчакова О. А., Шохин И. Е., Наркевич И. А., 2024

© Karnakova P. K., Karnakova K. K., Komarov T. N., Bagaeva N. S., Popova M. O., Ivkin D. Yu., Archakova O. A., Shohin I. E., Narkevich I. A., 2024

Заключение. Были рассчитаны фармакокинетические параметры, построены усредненные фармакокинетические профили в линейных и логлинейных координатах после однократного и многократного применения различных доз исследуемого препарата. Впервые была изучена фармакокинетика препарата этмабена у человека. Полученные результаты позволяют перейти к следующей фазе КИ препарата «Этмабен».

Ключевые слова: 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойная кислота, фармакокинетика, сердечно-сосудистые заболевания, ишемическая болезнь сердца, разработка препарата

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

Вклад авторов. П. К. Карнакова, Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова участвовали в проведении аналитического этапа исследования. Н. С. Багаева и К. К. Карнакова проводили статистическую обработку данных. Д. Ю. Ивкин выполнял консультативную работу. М. О. Попова отвечала за качество данных и организацию системы менеджмента качества. И. Е. Шохин, И. А. Наркевич отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Карнакова П. К., Карнакова К. К., Комаров Т. Н., Багаева Н. С., Попова М. О., Ивкин Д. Ю., Арчакова О. А., Шохин И. Е., Наркевич И. А. Изучение фармакокинетики производного малоновой кислоты этмабена в рамках I фазы клинического исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):259–271. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1965>

Phase I pharmacokinetic study of etmaben, a malonic acid derivative

Polina K. Karnakova^{1,2}✉, Kseniia K. Karnakova¹, Timofey N. Komarov^{1,2,3},
Natalia S. Bagaeva¹, Mariia O. Popova¹, Dmitry Yu. Ivkin², Olga A. Archakova¹,
Igor E. Shohin^{1,2}, Igor A. Narkevich²

¹ Limited Liability Company "Center of Pharmaceutical Analytics" (LLC "CPHA"). 8, Simferopolsky bulvar, Moscow, 117246, Russia

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba. 6, Miklouho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

✉ **Corresponding author:** Polina K. Karnakova. **E-mail:** p.karnakova@cpha.ru

ORCID: Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>;
Kseniia K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-4010-1231>;
Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>;
Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;
Mariia O. Popova – <https://orcid.org/0009-0008-1688-1902>;
Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;
Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;
Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>;
Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 06.11.2024

Accepted: 26.11.2024

Published: 27.11.2024

Abstract

Introduction. Etmaben is a malonic acid derivative that has shown cardiotropic activity and is a promising candidate for treating ischemic heart disease and chronic heart failure. It is currently undergoing Phase I clinical trials, and its pharmacokinetics have not yet been studied in humans.

Aim. The aim of the study is to investigate the pharmacokinetics of Etmaben, film-coated tablets, 300 mg (SPCPU, Russia) in healthy volunteers after fasting administration of different doses following both single and multiple dosing over a 7-day period.

Materials and methods. The open-label, non-randomized clinical trial involved 48 healthy volunteers divided into 6 cohorts. Volunteers in cohort 1 received a single dose of 600 mg of etmaben, cohort 2 received 900 mg, and cohort 3 received 1200 mg. Cohorts 4, 5, and 6 received daily doses of 600 mg, 900 mg, and 1200 mg, respectively. Plasma concentrations of etmaben were measured using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. Pharmacokinetic parameters were calculated using Microsoft Excel with the Boomer extension (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, USA).

Results and discussion. Pharmacokinetic parameters were calculated for 6 cohorts of 8 volunteers after single and multiple dosing of Etmaben at doses of 600, 900, and 1200 mg. The maximum plasma concentration (C_{max}) of etmaben was reached on average within 0.5 h. C_{max} values ranged from 2.708 ± 1.461 µg/mL to 19.871 ± 4.415 µg/mL. The maximum half-life was 0.874 ± 0.236 h, with an elimination rate constant not exceeding 1.053 ± 0.149 h⁻¹. The mean residence time (MRT) of etmaben in plasma did not exceed 1.527 ± 0.272 h. The average volume of distribution was above 45 L, and clearance exceeded 42 L, indicating significant tissue distribution and rapid drug elimination. Due to low area under the curve values and high elimination rates, the accumulation of etmaben is minimal.

Conclusion. Pharmacokinetic parameters were calculated, and averaged pharmacokinetic profiles were constructed in linear and semilogarithmic coordinates after single and multiple dosing of various etmaben doses. This study represents the first investigation of etmaben pharmacokinetics in humans, paving the way for subsequent clinical trials.

Keywords: 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino]benzoic acid, pharmacokinetics, cardiovascular diseases, ischemic heart disease, drug development

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

Contribution of the authors. Polina K. Karnakova, Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova were involved in the analytical part of the study. Natalia S. Bagaeva, Kseniia K. Karnakova performed the statistical data analysis. Dmitry Yu. Ivkin provided consulting work. Maria O. Popova was responsible for data quality and organization of the quality management system. Igor E. Shohin, Igor A. Narkevich were responsible for the organizational aspects of the study. All the mentioned authors participated in the discussion of the results obtained in the form of a scientific discussion.

For citation: Karnakova P. K., Karnakova K. K., Komarov T. N., Bagaeva N. S., Popova M. O., Ivkin D. Yu., Archakova O. A., Shohin I. E., Narkevich I. A. Phase I pharmacokinetic study of etmaben, a malonic acid derivative. *Drug development & registration*. 2024;13(4):259–271. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1965>

ВВЕДЕНИЕ

Этмабен (4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойная кислота) является новым синтетическим соединением, разработанным в Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете (СПХФУ) [1, 2]. Данное вещество, производное малоновой кислоты, обладает антиишемической и антиоксидантной активностью, что делает его потенциальным средством для лечения ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности. Кардиотропная активность этмабена связана с его способностью снижать интенсивность окислительных процессов за счет ингибирования дыхательной цепи митохондрий, оказывать влияние на гликолиз и окислительное фосфорилирование, снижать окислительный стресс и обеспечивать нормальное функционирование кардиомиоцитов в условиях сохраняющейся гипоксии, что подтверждено результатами доклинических исследований [3–11].

На этапе доклинических исследований, проведенных на грызунах и негрызунах, была подтверждена низкая токсичность этмабена (препарат отнесен к классу токсичности «5 класс токсичности или не классифицируется»), а также его выраженная кардиотропная активность, что позволяет перейти к фазе I клинических исследований (КИ), направленной на изучение безопасности, переносимости и фармакокинетики препарата у здоровых добровольцев [4–6]. На данном этапе исследование включает оценку фармакокинетических параметров после приема этмабена в различных дозах при однократном и многократном

применении, что является ключевым для оптимизации его режима дозирования. Выбор доз для данного этапа КИ осуществлялся исходя из данных, полученных на этапе доклинических исследований по изучению фармакодинамики, фармакокинетики и безопасности этмабена [5].

Поскольку этмабен является инновационным препаратом, его фармакокинетика у человека ранее не изучалась.

Целью данной работы является изучение фармакокинетических параметров препарата «Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг» (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) при однократном и многократном применении с эскалацией доз у здоровых добровольцев. Данные, полученные в ходе исследования, позволяют составить полное представление о его абсорбции, распределении и выведении, избегая нежелательных побочных эффектов, что является важным этапом в разработке нового препарата и его дальнейшем клиническом применении [12–14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический, аналитический и статистический этапы исследования фармакокинетики препарата «Этмабен» проводились в рамках фазы I КИ «Открытое нерандомизированное клиническое исследование по оценке безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров различных доз препарата «Этмабен», таблетки, покрытые оболочкой (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), у здоровых добровольцев». Исследование одобрено Министерством здра-

вохранения Российской Федерации РКН № 733 от 28 декабря 2022 г., протокол № СРНУ-МЛА-01-2022¹. В рамках данного исследования проводилась оценка фармакокинетических параметров при однократном приеме различных доз препарата «Этмабен» натощак, а также при многократном приеме различных доз препарата «Этмабен» в течение 7 дней натощак.

Участники исследования

В исследовании участвовали здоровые добровольцы мужского пола в возрасте от 18 до 45 лет включительно с индексом массы тела в пределах 18,5–30,0 кг/м², отвечающие остальным критериям включения. Верифицированный диагноз «здоров» устанавливался по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования. Основными критериями исключения были отягощенный аллергологический анамнез, наличие острых и хронических заболеваний, непереносимость компонентов препарата и злоупотребление алкоголем. Все добровольцы дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Дизайн исследования

Данное исследование представляло собой открытое нерандомизированное клиническое исследование по оценке фармакокинетических параметров различных доз препарата «Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг» (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) у здоровых добровольцев. Исследование проводилось в два этапа: на первом этапе оценивались фармакокинетические параметры после однократного применения исследуемого препарата, на втором этапе – после многократного применения.

Первый этап исследования по изучению однократного применения препарата

Исследование проводилось в трех когортах по восемь человек с эскалацией дозы для каждой последующей когорты. Добровольцы когорты 1 получали по 600 мг этмабена однократно, когорты 2 – по 900 мг однократно, когорты 3 – по 1200 мг однократно. Также для снижения рисков при приеме нового препарата с неизученной для человека безопасностью добровольцы в каждой когорте были разделены на две подкогорты по четыре добровольца в каждой. Исследование начиналось с наименьшей

дозы исследуемого препарата. Добровольцы первой подкогорты каждой когорты получали препарат последовательно: второй доброволец подкогорты получал препарат через сутки после первого добровольца, следующие добровольцы – еще через сутки после предыдущего добровольца. Применение препарата в каждой последующей когорте начиналось только после оценки безопасности в течение двух недель с момента приема препарата последним добровольцем предыдущей когорты и принятия решения о возможности эскалации дозы.

Второй этап исследования по изучению многократного применения препарата

Во втором этапе исследования принимали участие добровольцы, не включенные в первый этап. Добровольцы также были разделены на три когорты, а каждая когорта разделена на две подкогорты по четыре человека в каждой. Добровольцы когорты 4 получали суточную дозу 600 мг (по 2 таблетки 300 мг один раз в сутки), когорты 5 – суточную дозу 900 мг (по 2 таблетки 300 мг утром и 1 таблетке 300 мг вечером с интервалом 12 часов), когорты 6 – суточную дозу 1200 мг (по 2 таблетки 300 мг два раза в сутки с интервалом 12 часов). Прием препарата осуществлялся в течение семи дней. Алгоритм перехода к добровольцам следующей когорты был аналогичен алгоритму на предыдущем этапе.

Клинический этап исследования

На первом этапе исследования добровольцам устанавливался кубитальный гепаринизированный катетер не более чем на 13 ч. После установки катетера за 5–10 мин до приема исследуемого препарата отбиралась исходная (0 ч) проба крови. Далее доброволец однократно принимал препарат в необходимой дозе утром натощак. Дальнейший отбор проб крови для изучения фармакокинетики проводился через 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 36; 48; 72 ч после приема исследуемого препарата.

На втором этапе исследования при многократном приеме препарата отбор проб осуществлялся в первый, третий, пятый и седьмой день приема. Добровольцам устанавливался кубитальный гепаринизированный катетер не более чем на 13 ч, при этом в первый и седьмой дни катетер устанавливали перед первым приемом препарата, а в третий и пятый дни – перед последним приемом препарата. Далее представлены временные точки отбора крови для изучения фармакокинетики при многократном применении:

- день 1: до приема препарата (0 ч) и через 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12; 24 ч после первого приема исследуемого препарата;

¹ Открытое нерандомизированное клиническое исследование по оценке безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров различных доз препарата Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), у здоровых добровольцев. Доступно по: <https://grlsbase.ru/clinicaltrials/clintrail/12849>. Ссылка активна на: 16.10.2024.

- день 3, день 5: до приема препарата (0 ч) и через 5; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 12; 24 ч после последнего приема исследуемого препарата;
- день 7: до приема препарата (0 ч) и через 0, 25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 36; 48; 72 ч после приема исследуемого препарата.

По 6 мл крови отбиралось в промаркированные пробирки с антикоагулянтом К₃ЭДТА. Не более чем через 0,5 ч после отбора пробы крови плазму отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Полученную плазму разделяли на две аликвоты (образцы для основного анализа и архивные образцы), перенося плазму в предварительно промаркированные пробирки типа «эппендорф». Все образцы замораживали в вертикальном положении и хранили в клиническом центре при температуре не выше –20 °С. Временной интервал между отбором проб и заморозкой не превышал 1 ч. Образцы транспортировались в лабораторию при температуре не выше –60 °С, хранились в лаборатории при температуре от –50 до –35 °С.

Аналитический этап исследования

Концентрация этмабена в плазме крови здоровых добровольцев определялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) на хроматографе Nexera XR с масс-селективным детектором LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония). В качестве внутреннего стандарта использовался прометазин. Пробоподготовка проводилась с помощью осаждения ацетонитрилом. Ионизация веществ осуществлялась с помощью электроспрея. Детектирование проводилось в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Детектировались следующие MRM-переходы: 249,90 → 92,15 m/z; 249,90 → 160,20 m/z (этмабен); 284,95 → 197,95 m/z (прометазин). Для разделения веществ использовалась хроматографическая колонка Luna C18 (100 Å, 50 × 2,00 мм, 5 мкм). Элюирование проводилось в градиентном режиме. В качестве элюентов использовались 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде и ацетонитриле.

Разработанная ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения этмабена в плазме крови человека была валидирована в соответствии с требованиями действующих на территории Евразийского экономического союза правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.)¹, а так-

же с учетом рекомендаций FDA² и EMA³. Валидация разработанной методики включала оценку следующих параметров: калибровочной кривой, нижнего предела количественного определения, правильности, прецизионности, селективности, пригодности стандартного образца, эффекта матрицы, степени извлечения, переноса пробы, стабильности. Методика прошла полную валидацию с аналитическим диапазоном 0,250–30,000 мкг/мл для этмабена в плазме крови человека. Однако в процессе исследования диапазон был скорректирован и методика была частично валидирована, подтвержденный диапазон составил 0,040–35,000 мкг/мл. Подробное описание методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС и результаты оценки валидационных параметров представлены в отдельной публикации [15].

Статистический этап исследования

На основании полученных в ходе аналитического этапа концентраций этмабена в плазме крови добровольцев после однократного и многократного перорального приема исследуемого препарата натошак были изучены фармакокинетические параметры препарата «Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг» (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России).

Индивидуальные профили изменения значений концентраций этмабена в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после однократного приема препарата «Этмабен», характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max}) и временем ее достижения (T_{max}), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t ($AUC_{(0-t)}$), площадью под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$). Дополнительно определяли следующие фармакокинетические параметры: $T_{1/2}$ – период полувыведения лекарственного вещества, k_{el} – константа скорости терминальной элиминации лекарственного вещества, MRT (Mean Residence Time) – среднее время удерживания лекарственного вещества в плазме, V_d – объем распределения, Cl – клиренс.

Индивидуальные профили изменения значений концентраций этмабена в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после приема препарата «Этмабен» при многократном приеме лекарственного препарата (день 1, день 7), характеризова-

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 12.04.2024) «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207405/ Ссылка активна на 13.10.2024

² Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/> Accessed: 13.10.2024.

³ Guideline 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: 13.10.2024.

лись $C_{\max}$, $T_{\max}$, $AUC_{(0-t)}$, $AUC_{(0-\infty)}$. Дополнительно определялись параметры $T_{1/2}$, k_{el} , MRT.

Индивидуальные профили изменения значений концентраций этмабена в плазме крови человека во времени, зарегистрированные после приема препарата «Этмабен» при многократном приеме лекарственного препарата (день 3, день 5), характеризовались $C_{\max}$ и $T_{\max}$, а также площадью под кривой «концентрация – время» в интервале дозирования ($AUC_{(0-t)}$).

Для каждого из вышеперечисленных показателей были рассчитаны значения описательной статистики, включающей среднее арифметическое значение (Mean), среднее геометрическое значение (Geom Mean), стандартное отклонение для среднего (SD), медиану (Median), максимальные (Max) и минимальные (Min) значения.

Описательную статистику проводили при помощи пакета Microsoft Excel. Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью пакета Microsoft Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа Boomer (Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA 92606, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакокинетические параметры исследуемого препарата «Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг» (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) для каждой дозы оценивались на одной когорте, состоящей из 8 добровольцев. Всего в анализ фармакокинетики были включены данные, полученные от 48 добровольцев, принявших исследуемый препарат и завершивших исследование.

Фармакокинетические параметры этмабена при однократном приеме дозы 600 мг исследуемого препарата (когорта 1)

Среднее значение максимальных концентраций ($C_{\max}$), определяемых в плазме крови добровольцев после приема исследуемого препарата, составляет $11,359 \pm 4,666$ мкг/мл (Mean $\pm$ SD). Значение медианы времени достижения максимальной концентрации этмабена в плазме крови ($T_{\max}$) составляет 0,5 ч. Среднее значение площади под кривой «концентрация – время» с момента приема исследуемого препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t ($AUC_{(0-t)}$) составляет $14,545 \pm 4,779$ мкг $\cdot$ ч/мл. Среднее значение площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) составляет $15,141 \pm 4,809$ мкг $\cdot$ ч/мл. Этмабен элиминируется из плазмы крови со средним значением периода полувыведения ($T_{1/2}$) $0,746 \pm 0,129$ ч. Объем распределения (V_d) соответствует значению

$46,221 \pm 15,818$ л. Среднее значение общего клиренса (Cl) составляет $42,602 \pm 10,954$ л/ч. Значение среднего времени удерживания этмабена в плазме крови добровольцев (MRT) – $1,527 \pm 0,272$ ч. Данные представлены в сводной таблице 1.

Фармакокинетические параметры этмабена при однократном приеме дозы 900 мг исследуемого препарата (когорта 2)

Средняя максимальная концентрация ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови составляет $16,020 \pm 6,899$ мкг/мл. Медианное время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) составляет 0,5 ч. Среднее значение площади под кривой «концентрация – время» до последней измеренной точки ($AUC_{(0-t)}$) составило $20,104 \pm 8,664$ мкг $\cdot$ ч/мл, а среднее значение площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) – $20,559 \pm 8,656$ мкг $\cdot$ ч/мл. Средний период полувыведения ($T_{1/2}$) этмабена равен $0,713 \pm 0,098$ ч, объем распределения (V_d) – $50,079 \pm 16,130$ л, а общий клиренс (Cl) – $50,113 \pm 18,217$ л/ч. Среднее время удержания препарата в плазме (MRT) составляет $1,365 \pm 0,198$ ч (см. таблица 1).

Фармакокинетические параметры этмабена при однократном приеме дозы 1200 мг исследуемого препарата (когорта 3)

Средняя максимальная концентрация ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови – $19,871 \pm 4,415$ мкг/мл (Mean $\pm$ SD). Медианное время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) составило 0,5 ч. Площадь под кривой «концентрация – время» до последней измеренной точки ($AUC_{(0-t)}$) – $23,469 \pm 6,809$ мкг $\cdot$ ч/мл, а среднее значения площади под кривой «концентрация – время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) – $24,168 \pm 6,789$ мкг $\cdot$ ч/мл. Средний период полувыведения ($T_{1/2}$) этмабена – $0,781 \pm 0,090$ ч. Объем распределения (V_d) – $59,214 \pm 15,531$ л, а общий клиренс (Cl) – $52,808 \pm 13,302$ л/ч. Среднее время удержания препарата в плазме (MRT) – $1,300 \pm 0,149$ ч (см. таблица 1).

Фармакокинетические параметры этмабена при многократном приеме дозы 600 мг исследуемого препарата (когорта 4) в день 1 и день 7

Средняя максимальная концентрация ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови – $10,930 \pm 2,602$ мкг/мл и $9,194 \pm 3,305$ мкг/мл соответственно. Медианное время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) – 0,5 ч. Площадь под кривой «концентрация – время» до последней измеренной точки ($AUC_{(0-t)}$) – $12,509 \pm 2,344$ мкг $\cdot$ ч/мл и $11,708 \pm 2,079$ мкг $\cdot$ ч/мл соответственно. Площадь под кривой «концентрация – время» до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) – $12,970 \pm 2,369$ мкг $\cdot$ ч/мл и $12,259 \pm 2,241$ мкг $\cdot$ ч/мл со-

Таблица 1. Сводная таблица фармакокинетических параметров этмабена после однократного приема натощак исследуемого препарата «Этмабен» в дозах 600 мг, 900 мг и 1200 мг

Table 1. Summary table of the pharmacokinetic parameters of etmaben after a single dose of the investigational drug Etmaben administered fasting at doses of 600 mg, 900 mg, and 1200 mg

Фармакокинетический параметр Pharmacokinetic parameter	Однократный прием Single dose		
	600 мг, когорта 1 600 mg, cohort 1	900 мг, когорта 2 900 mg, cohort 2	1200 мг, когорта 3 1200 mg, cohort 3
$C_{\max}$, мкг/мл $C_{\max}$, µg/mL	11,359 ± 4,666 [8]	16,020 ± 6,899 [8]	19,871 ± 4,415 [8]
$T_{\max}$, ч $T_{\max}$, h	0,5 (0,5–0,75) [8]	0,5 (0,5–1,5) [8]	0,5 (0,5–0,5) [8]
$AUC_{(0-t)}$, мкг·ч/л $AUC_{(0-t)}$, µg·h/L	14,545 ± 4,779 [8]	20,104 ± 8,664 [8]	23,469 ± 6,809 [8]
$AUC_{(0-\infty)}$, мкг·ч/л $AUC_{(0-\infty)}$, µg·h/L	15,141 ± 4,809 [8]	20,559 ± 8,656 [8]	24,168 ± 6,789 [8]
k_{el} , ч ⁻¹ k_{el} , h ⁻¹	0,952 ± 0,148 [8]	0,987 ± 0,125 [8]	0,898 ± 0,107 [8]
$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h	0,746 ± 0,129 [8]	0,713 ± 0,098 [8]	0,781 ± 0,090 [8]
MRT, ч MRT, h	1,527 ± 0,272 [8]	1,365 ± 0,198 [8]	1,300 ± 0,149 [8]
V_d , л V_d , L	46,221 ± 15,818 [8]	50,079 ± 16,130 [8]	59,214 ± 15,531 [8]
Cl, л/ч Cl, L/h	42,602 ± 10,954 [8]	50,113 ± 18,217 [8]	52,808 ± 13,302 [8]

Примечание. Для всех параметров, кроме $T_{\max}$, приведены значения Mean ± SD [n] (Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, n – размер выборки). Для параметра $T_{\max}$ приведены значения Median (Min – Max) [n] (Median – медиана, Max – максимальное значение, Min – минимальное значение, n – размер выборки).

Note. For all parameters, except for $T_{\max}$, the values Mean ± SD [n] are given (Mean is the arithmetic mean, SD is the standard deviation, n is the sample size). For the $T_{\max}$ parameter, the values Median (Min – Max) [n] are given (Median – median, Max – maximum value, Min – minimum value, n – sample size).

ответственно. Средний период полувыведения ($T_{1/2}$) этмабена – 0,730 ± 0,097 ч и 0,672 ± 0,111 ч соответственно. Среднее время удержания препарата в плазме (MRT) – 1,254 ± 0,169 ч и 1,330 ± 0,296 ч соответственно (таблица 2).

Фармакокинетические параметры этмабена при многократном приеме дозы 600 мг исследуемого препарата (когорта 4) в день 3 и день 5

Средняя максимальная концентрация ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови – 10,005 ± 3,439 мкг/мл и 9,818 ± 3,034 мкг/мл соответственно. Медианное время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) – 0,5 ч. Площадь под кривой «концентрация – время» в интервале дозирования ($AUC_{(0-t)}$) – 10,683 ± 1,674 мкг·ч/мл и 11,624 ± 2,444 мкг·ч/мл соответственно (см. таблица 2).

Фармакокинетические параметры этмабена при многократном приеме дозы 900 мг исследуемого препарата (когорта 5) в день 1 и день 7

Средняя максимальная концентрация ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови – 11,002 ± 3,109 мкг/мл и 10,406 ± 2,580 мкг/мл соответственно. Медианное время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) – 0,5 ч. Площадь под кривой «концентрация – время» до последней измеренной точки ($AUC_{(0-t)}$) – 14,483 ± 2,994 мкг·ч/мл и 12,787 ± 3,205 мкг·ч/мл соответственно. Площадь под кривой «концентрация – время» до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) – 14,940 ± 2,982 мкг·ч/мл и 13,159 ± 3,120 мкг·ч/мл соответственно. Средний период полувыведения ($T_{1/2}$) этмабена – 0,874 ± 0,236 ч и 0,698 ± 0,198 ч соответственно. Среднее время удержания препарата в плазме (MRT) – 1,474 ± 0,347 ч и 1,357 ± 0,282 ч соответственно (см. таблица 2).

Таблица 2. Сводная таблица фармакокинетических параметров этмабена после многократного приема натощак исследуемого препарата «Этмабен» в дозах 600 мг, 900 мг и 1200 мг в день 1, день 3, день 5 и день 7

Table 2. Summary table of the pharmacokinetic parameters of Etmaben after multiple doses of the investigational drug Etmaben administered fasting at doses of 600 mg, 900 mg, and 1200 mg on Day 1, Day 3, Day 5, and Day 7

Фармакокинетический параметр Pharmacokinetic parameter	Многократный прием Multiple dose											
	600 мг, когорта 4 600 mg, cohort 4				900 мг, когорта 5 900 mg, cohort 5				1200 мг, когорта 6 1200 mg, cohort 6			
	День 1 Day 1	День 3 Day 3	День 5 Day 5	День 7 Day 7	День 1 Day 1	День 3 Day 3	День 5 Day 5	День 7 Day 7	День 1 Day 1	День 3 Day 3	День 5 Day 5	День 7 Day 7
C_{max} , мкг/мл C_{max} , µg/mL	10,930 ± 2,602 [8]	10,005 ± 3,439 [8]	9,818 ± 3,034 [8]	9,194 ± 3,305 [8]	11,002 ± 3,109 [8]	2,708 ± 1,461 [8]	3,279 ± 1,498 [8]	10,406 ± 2,580 [8]	11,284 ± 2,609 [8]	4,572 ± 1,226 [8]	5,241 ± 1,061 [8]	10,247 ± 2,204 [8]
T_{max} , ч T_{max} , h	0,5 (0,25–1) [8]	0,5 (0,5–0,75) [8]	0,5 (0,25–0,75) [8]	0,5 (0,25–0,5) [8]	0,5 (0,5–0,75) [8]	1,5 (0,5–2,5) [8]	0,625 (0,5–3) [8]	0,5 (0,5–0,5) [8]	0,5 (0,5–0,75) [8]	0,875 (0,5–2,5) [8]	1 (0,5–2,5) [8]	0,5 (0,5–1,5) [8]
$AUC_{(0-4)}$, мкг·ч/л $AUC_{(0-4)}$, µg·h/L	12,509 ± 2,344 [8]	N/A	N/A	11,708 ± 2,079 [8]	14,483 ± 2,994 [8]	N/A	N/A	12,787 ± 3,205 [8]	14,011 ± 2,308 [8]	N/A	N/A	13,757 ± 3,130 [8]
$AUC_{(0-∞)}$, мкг·ч/л $AUC_{(0-∞)}$, µg·h/L	12,970 ± 2,369 [8]	N/A	N/A	12,259 ± 2,241 [8]	14,940 ± 2,982 [8]	N/A	N/A	13,159 ± 3,120 [8]	14,090 ± 2,336 [8]	N/A	N/A	13,911 ± 3,080 [8]
$AUC_{(0-4)}$, мкг·ч/мл $AUC_{(0-4)}$, µg·h/L	N/A	10,683 ± 1,674 [8]	11,624 ± 2,444 [8]	N/A	N/A	4,075 ± 0,765 [8]	4,854 ± 1,160 [8]	N/A	N/A	8,937 ± 1,913 [8]	9,247 ± 2,048 [8]	N/A
k_{el} , ч ⁻¹ k_{el} , h ⁻¹	0,964 ± 0,123 [8]	N/A	N/A	1,053 ± 0,149 [8]	0,832 ± 0,167 [8]	N/A	N/A	1,043 ± 0,209 [8]	0,964 ± 0,245 [8]	N/A	N/A	0,960 ± 0,093 [8]
$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h	0,730 ± 0,097 [8]	N/A	N/A	0,672 ± 0,111 [8]	0,874 ± 0,236 [8]	N/A	N/A	0,698 ± 0,198 [8]	0,748 ± 0,131 [8]	N/A	N/A	0,729 ± 0,074 [8]
MRT, ч MRT, h	1,254 ± 0,169 [8]	N/A	N/A	1,330 ± 0,296 [8]	1,474 ± 0,347 [8]	N/A	N/A	1,357 ± 0,282 [8]	1,393 ± 0,363 [8]	N/A	N/A	1,399 ± 0,255 [8]

Примечание. Для всех параметров, кроме T_{max} , приведены значения Mean ± SD [n] (Mean – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение, n – размер выборки). Для параметра T_{max} приведены значения Median (Min – Max) [n] (Median – медиана, Max – максимальное значение, Min – минимальное значение, n – размер выборки). N/A – неприменимо.

Note. For all parameters, except for T_{max} , the values Mean ± SD [n] are given (Mean is the arithmetic mean, SD is the standard deviation, n is the sample size). For the T_{max} parameter, the values Median (Min – Max) [n] are given (Median – median, Max – maximum value, Min – minimum value, n – sample size). N/A – not applicable.

Фармакокинетические параметры этмабена при многократном приеме дозы 900 мг исследуемого препарата (когорта 5) в день 3 и день 5

Средняя максимальная концентрация ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови – $2,708 \pm 1,461$ мкг/мл и $3,279 \pm 1,498$ мкг/мл соответственно. Медианное время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) – 1,5 и 0,625 ч соответственно. Площадь под кривой «концентрация – время» в интервале дозирования ($AUC_{(0-t)}$) – $4,075 \pm 0,765$ мкг·ч/мл и $4,854 \pm 1,160$ мкг·ч/мл соответственно (см. таблица 2).

Фармакокинетические параметры этмабена при многократном приеме дозы 1200 мг исследуемого препарата (когорта 6) в день 1 и день 7

Средняя максимальная концентрация ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови – $11,284 \pm 2,609$ мкг/мл и $10,247 \pm 2,204$ мкг/мл соответственно. Медианное время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) – 0,5 ч. Площадь под кривой «концентрация – время» до последней измеренной точки ($AUC_{(0-t)}$) – $14,011 \pm 2,308$ мкг·ч/мл и $13,757 \pm 3,130$ мкг·ч/мл соответственно. Площадь под кривой «концентрация – время» до бесконечности ($AUC_{(0-\infty)}$) – $14,090 \pm 2,336$ мкг·ч/мл и $13,911 \pm 3,080$ мкг·ч/мл соответственно. Средний период полувыведения ($T_{1/2}$) этмабена – $0,748 \pm 0,131$ ч и $0,729 \pm 0,074$ ч соответственно. Среднее время удержания препарата в плазме (MRT) – $1,393 \pm 0,363$ ч и $1,399 \pm 0,255$ ч соответственно (см. таблица 2).

Фармакокинетические параметры этмабена при многократном приеме дозы 1200 мг исследуемого препарата (когорта 6) в день 3 и день 5

Средняя максимальная концентрация ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови – $4,572 \pm 1,226$ мкг/мл и $5,241 \pm 1,061$ мкг/мл соответственно. Медианное время достижения $C_{\max}$ ($T_{\max}$) – 0,875 и 1,0 ч соответственно. Площадь под кривой «концентрация – время» в интервале дозирования ($AUC_{(0-t)}$) – $8,937 \pm 1,913$ мкг·ч/мл и $9,247 \pm 2,048$ мкг·ч/мл соответственно (см. таблица 2).

Ранее на этапе доклинических исследований было проведено исследование фармакокинетики этмабена при различных путях введения кроликам активной фармацевтической субстанции и таблеток этмабена (60 мг). Установлено, что биодоступность препарата при внутрижелудочном введении составляет 73 %, а значения общего клиренса для обоих путей введения были сопоставимы. При внутрижелудочном введении максимальная концентрация этмабена в плазме крови достигалась через $0,93 \pm 0,35$ ч, а период полувыведения составлял $2,65 \pm 0,65$ ч [5].

В исследовании на добровольцах не стояла задача проведения метаболомного анализа, однако на доклиническом этапе было проведено исследование

метаболитов. Метаболиты в биообразцах определялись методами газовой хромато-масс-спектрометрии и ВЭЖХ-МС/МС. В крови не было обнаружено метаболитов, в моче обнаружен продукт диэтилирования этмабена – 4-[(карбоксиацетил)амино]бензойная кислота, концентрация которого со временем возрастала [5].

В рамках данного исследования впервые изучались фармакокинетические параметры после приема препарата этмабена у человека. Исследуемые дозы были выбраны на основании данных, полученных в ходе доклинических исследований, включающих изучение общих и специфических видов токсичности, фармакологических эффектов и фармакокинетики этмабена на грызунах и негрызунах [4–6]. В связи с неизученной безопасностью препарата у человека для проведения клинической части исследования был выбран подход, заключающийся в постепенной эскалации доз исследуемого препарата [16].

В исследовании фармакокинетики этмабена у добровольцев при пероральном приеме таблеток этмабена натошак в дозах 600, 900 и 1200 мг было установлено, что при однократном режиме дозирования с эскалацией дозы препарата наблюдалось увеличение максимальной концентрации ($C_{\max}$) этмабена в плазме крови. Препарат быстро абсорбируется из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток: максимальная концентрация этмабена в плазме крови ($T_{\max}$) достигалась в течение 0,5 ч.

Как при однократном, так и при многократном режиме дозирования среднее значение периода полувыведения этмабена ($T_{1/2}$) составляло менее 1 ч, что указывает на высокую скорость выведения препарата из организма. Невысокие значения площадей под кривыми «концентрация – время» (AUC), немного превышающие $C_{\max}$, свидетельствуют о том, что общее количество доступного этмабена на протяжении времени ограничено.

При однократном применении среднее значение объема распределения (V_d) составило более 45 л, что свидетельствует о способности этмабена легко проникать в ткани. Однако высокий общий клиренс (Cl) подтверждает, что этмабен быстро удаляется из плазмы, что в сочетании с коротким периодом полувыведения также может указывать на небольшую продолжительность его действия.

Среднее время удерживания лекарственного вещества в плазме (MRT) является важным фармакокинетическим параметром, отражающим среднюю продолжительность времени, в течение которого вещество находится в организме до элиминации. MRT составило не более $1,527 \pm 0,272$ ч с учетом высокой скорости выведения, это также указывает на кратковременное действие препарата.

При многократном дозировании с эскалацией дозы в день 3 и день 5 наблюдалось снижение $C_{\max}$ и небольшое увеличение $T_{\max}$, что в сочетании с низкими значениями $AUC_{(0-t)}$ свидетельствует об отсутствии кумуляции этмабена. Эти результаты подтверж-

дают результаты доклинического исследования об отсутствии накопления этмабена в организме [5].

Усредненные фармакокинетические профили (в линейных и логлинейных координатах) значений концентраций этмабена при однократном применении препарата «Этмабен» в различных дозах при-

ведены на рисунках 1 и 2. Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах) значений концентраций этмабена при многократном применении препарата «Этмабен» в различных дозах в день 1, день 2, день 5 и день 7 приведены на рисунке 3.

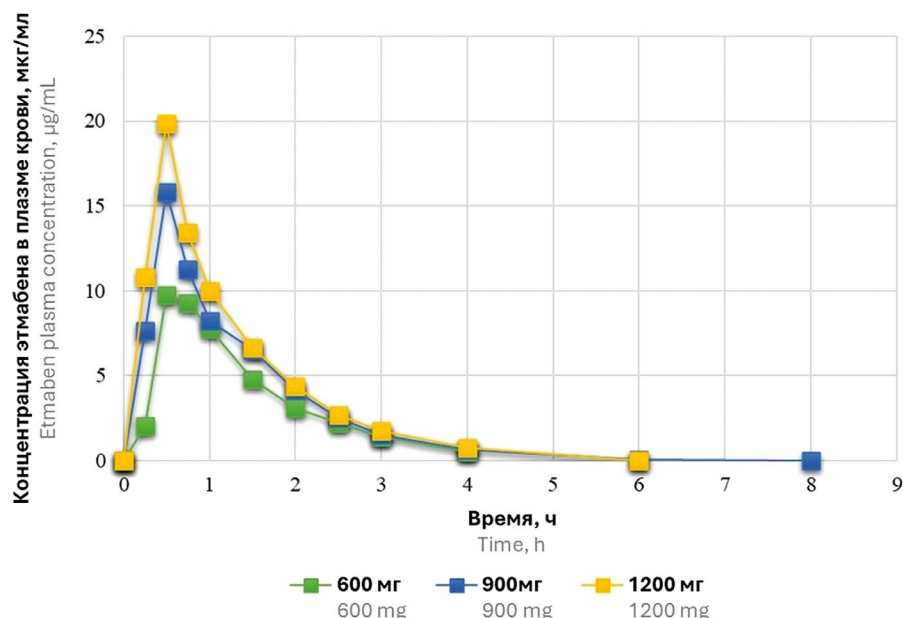


Рисунок 1. Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах) этмабена после однократного приема препарата «Этмабен»

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles (in linear scale) of etmaben after single administration of the drug Etmaben

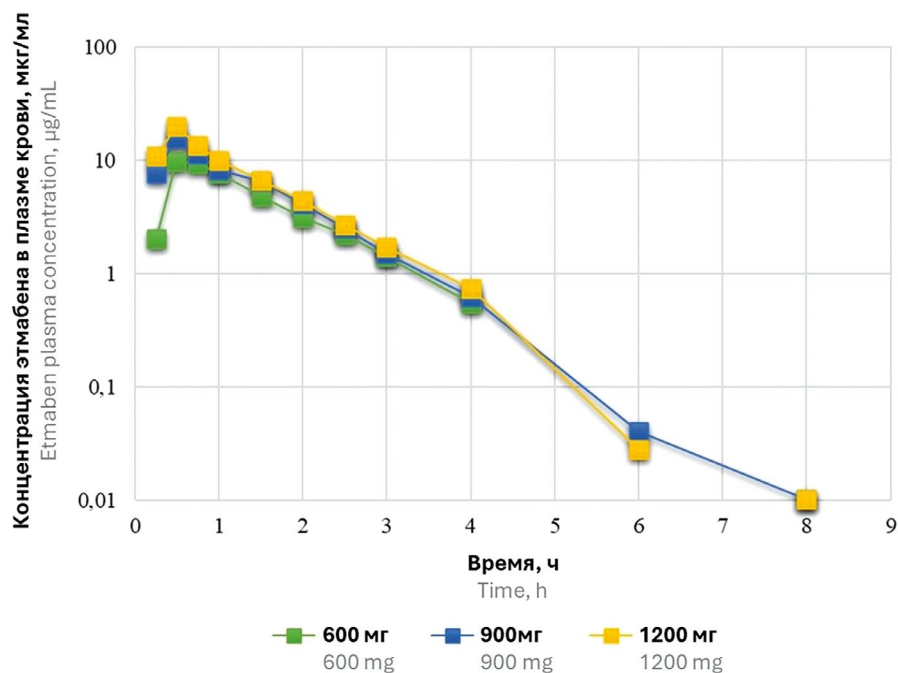


Рисунок 2. Усредненные фармакокинетические профили (в логлинейных координатах) этмабена после однократного приема препарата «Этмабен»

Figure 2. Average pharmacokinetic profiles (in log-linear scale) of etmaben after single administration of the drug Etmaben

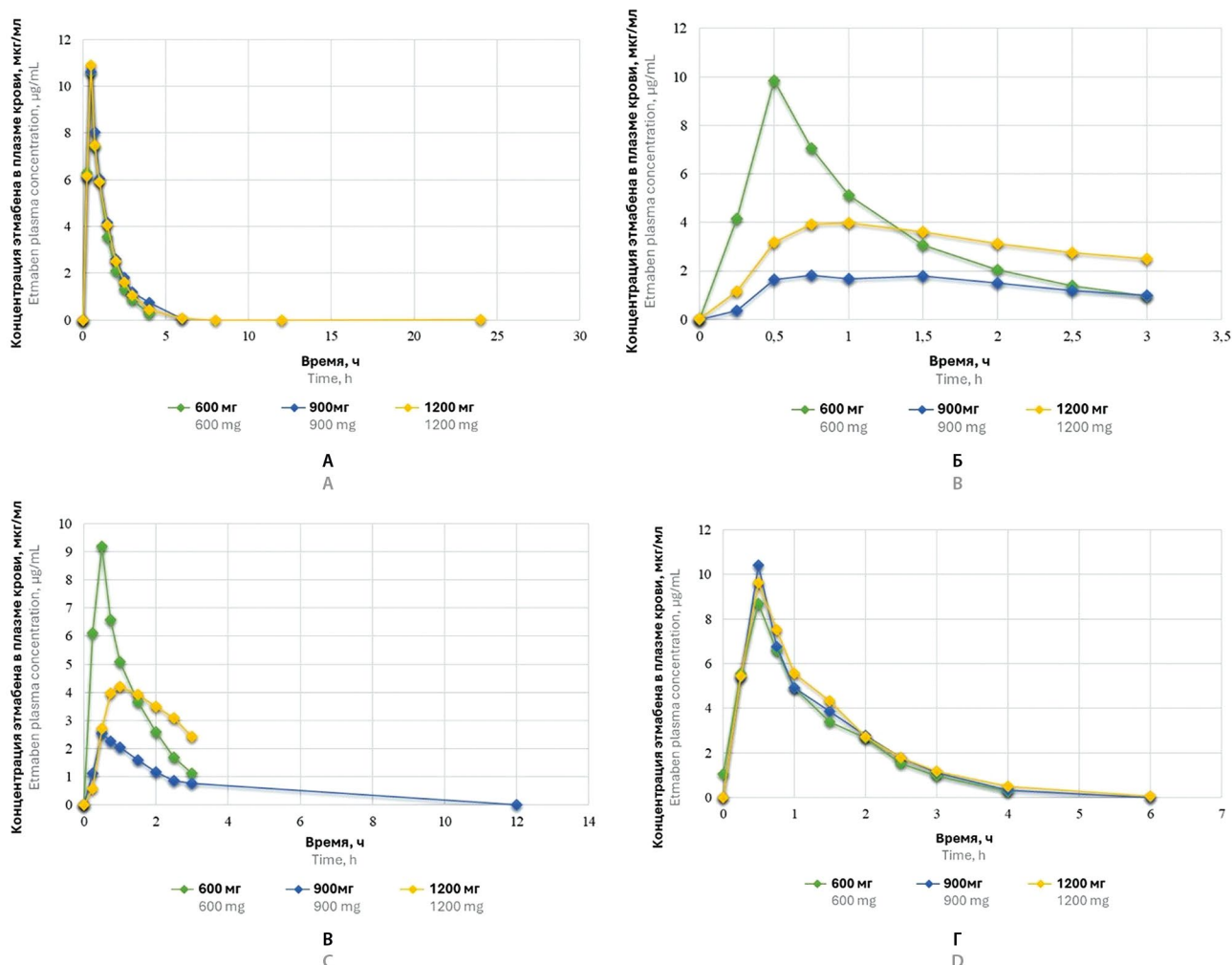


Рисунок 3. Усредненные фармакокинетические профили (в линейных координатах) этмабена после многократного приема препарата «Этмабен» в течение 7 дней

A – день 1; Б – день 3; В – день 5; Г – день 7

Figure 3. Average pharmacokinetic profiles (in linear scale) of etmaben after multiple administration of the drug Etmaben over 7 days

A – day 1; B – day 3; C – day 5; D – day 7

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена фармакокинетика препарата «Этмабен, таблетки, покрытые оболочкой, 300 мг» (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) у здоровых добровольцев при однократном приеме различных доз препарата «Этмабен», а также при многократном приеме различных доз препарата «Этмабен» в течение 7 дней натошак. По полученным в ходе аналитического этапа исследования концентрациям этмабена были рассчитаны фармакокинетические параметры, а также построены усредненные фармакокинетические профили (в линейных и логлинейных координатах) этмабена после однократного и многократного приема исследуемого препарата. Полученные результаты позволяют перейти к следующей фазе КИ препарата «Этмабен».

ЛИТЕРАТУРА

1. Юсковец В. Н., Яковлев И. П., Наркевич И. А. Способ получения 4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойной кислоты. Патент России № 2515245 С1 от 07.02.2013.
2. Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Зеленцова А. Б. Сквозная стандартизация оригинальных лекарственных средств при определении родственных примесей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):209–216. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573.
3. Ковансков В. Е., Кушнир В. И., Булатова С. А. Оценка влияния производных малоновой кислоты на выживаемость мышей в условиях гипоксии. Молодая фармация – потенциал будущего: Сборник материалов XII всероссийской научной конференции школьников, студентов и

- аспирантов с международным участием, Санкт-Петербург, 14 марта – 22 апреля 2022 года. Санкт-Петербург: Изд-во СПбХФУ; 2022. С. 342–345.
4. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Драчева А. В., Питухина Н. Н., Ивкина А. С., Бурякина А. В., Теслев А. А. Влияние производного бензойной кислоты на формирование экспериментальной хронической сердечной недостаточности. *Фармация*. 2016;63(4):49–52
 5. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А. Экспериментальная оценка эффективности и безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2022;18(3):109–112. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-109-112.
 6. Ивкин Д. Ю., Карпов А. А., Ковансков В. Е., Титович И. А. Экспериментальная оценка фармакологической безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2023;19(3E):95–98. DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-95-98.
 7. Bae J., Salamon R. J., Brandt E. B., Paltzer W. G., Zhang Z., Britt E. C., Hacker T. A., Fan J., Mahmoud A. I. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Circulation*. 2021;143(20):1973–1986. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049952.
 8. Wang S., Liu Y., Liu J., Tian W., Zhang X., Cai H., Fang S., Yu B. Mitochondria-derived methylmalonic acid, a surrogate biomarker of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, predicts all-cause and cardiovascular mortality in the general population. *Redox Biology*. 2020;37:101741. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101741.
 9. Prag H. A., Pala L., Kula-Alwar D., Mulvey J. F., Luping D., Beach T. E., Booty L. M., Hall A. R., Logan A., Sauchanka V., Caldwell S. T., Robb E. L., James A. M., Xu Z., Saeb-Parasy K., Hartley R. C., Murphy M. P., Krieg T. Ester prodrugs of malonate with enhanced intracellular delivery protect against cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2022;36:1–13. DOI: 10.1007/s10557-020-07033-6.
 10. Prag H. A., Aksentijevic D., Dannhorn A., Giles A. V., Mulvey J. F., Sauchanka O., Du L., Bates G., Reinhold J., Kula-Alwar D., Xu Z., Pellerin L., Goodwin R. J. A., Murphy M. P., Krieg T. Ischemia-selective cardioprotection by malonate for ischemia/reperfusion injury. *Circulation Research*. 2022;131(6):528–541. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.320717.
 11. Abe J., Vujic A., Prag H. A., Murphy M. P., Krieg T. Malonate given at reperfusion prevents post-myocardial infarction heart failure by decreasing ischemia/reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119:691–697. DOI: 10.1007/s00395-024-01063-z.
 12. Pantaleão S. Q., Fernandes P. O., Gonçalves J. E., Maltarollo V. G., Honorio K. M. Recent advances in the prediction of pharmacokinetics properties in drug design studies: a review. *ChemMedChem*. 2022;17(1):e202100542. DOI: 10.1002/cmdc.202100542.
 13. Foster D. M., Vicini P. Noncompartmental and compartmental approaches to pharmacokinetic data analysis. *Atkinson's Principles of Clinical Pharmacology*. 2022;113–135. DOI: 10.1016/B978-0-12-819869-8.00035-5.
 14. Stielow M., Witczyńska A., Kubryń N., Fijałkowski Ł., Nowaczyk J., Nowaczyk A. The Bioavailability of Drugs—The Current State of Knowledge. *Molecules*. 2023;28(24):8038. DOI: 10.3390/molecules28248038.
 15. Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Ивкин Д. Ю., Ветрова Е. С., Тернинко И. И., Шохин И. Е., Наркевич И. А. Разработка и валидация методики количественного определения этмабена в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(1):257–271. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752.
 16. Günhan B. K., Weber S., Friede T. A Bayesian time-to-event pharmacokinetic model for phase I dose-escalation trials with multiple schedules. *Statistics in Medicine*. 2020;39(27):3986–4000. DOI: 10.1002/sim.8703.

REFERENCES

1. Yuskovets V. N., Yakovlev I. P., Narkevich I. A. Method for producing 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino]benzoic acid. Patent RUS No. 2515245 C1 dated 07.02.2013. (In Russ.)
2. Generalova Yu. E., Terninko I. I., Zelentsova A. B. End-to-end Standardization of Original Medicines when Determining Related Impurities. *Drug development & registration*. 2023;12(4): 209–216. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573.
3. Kovanskov V. E., Kushnir V. I., Bulatova S. A. Researching of the effect of malonic acid derivatives on the survival of mice in hypoxia. In Young pharmacy – the potential of the future: A collection of materials of the XII All-Russian Scientific Conference of students and postgraduates with international participation, St. Petersburg, March 14–18, 2022. Saint Petersburg: SPCPU; 2022. P. 342–345. (In Russ.)
4. Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Dracheva A. V., Pituhina N. N., Ivkina A. S., Burjakina A. V., Teslev A. A. Effect of a benzoic acid derivative on the development of experimental chronic heart failure. *Pharmacy*. 2016;63(4):49–52. (In Russ.)
5. Ivkin D. Yu., Karpov A. A. Experimental evaluation of the effectiveness and safety of a new propandic acid derivative exhibiting cardiotropic action. *Journal Biomed*. 2022;18(3): 109–112. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-109-112.
6. Ivkin D. Yu., Karpov A. A., Kovanskov V. E., Titovich I. A. Experimental evaluation of the pharmacological safety of a new propagandic acid derivative with a cardiotropic action. *Journal Biomed*. 2023;19(3E):95–98. (In Russ.) DOI: 10.33647/2713-0428-19-3E-95-98.
7. Bae J., Salamon R. J., Brandt E. B., Paltzer W. G., Zhang Z., Britt E. C., Hacker T. A., Fan J., Mahmoud A. I. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Circulation*. 2021;143(20):1973–1986. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049952.
8. Wang S., Liu Y., Liu J., Tian W., Zhang X., Cai H., Fang S., Yu B. Mitochondria-derived methylmalonic acid, a surrogate biomarker of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, predicts all-cause and cardiovascular mortality in the general population. *Redox Biology*. 2020;37:101741. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101741.
9. Prag H. A., Pala L., Kula-Alwar D., Mulvey J. F., Luping D., Beach T. E., Booty L. M., Hall A. R., Logan A., Sauchanka V., Caldwell S. T., Robb E. L., James A. M., Xu Z., Saeb-Par-

- sy K., Hartley R. C., Murphy M. P., Krieg T. Ester prodrugs of malonate with enhanced intracellular delivery protect against cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2022;36:1–13. DOI: 10.1007/s10557-020-07033-6.
10. Prag H. A., Aksentijevic D., Dannhorn A., Giles A. V., Mulvey J. F., Sauchanka O., Du L., Bates G., Reinhold J., Kula-Alwar D., Xu Z., Pellerin L., Goodwin R. J. A., Murphy M. P., Krieg T. Ischemia-selective cardioprotection by malonate for ischemia/reperfusion injury. *Circulation Research*. 2022;131(6):528–541. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.320717.
11. Abe J., Vujic A., Prag H. A., Murphy M. P., Krieg T. Malonate given at reperfusion prevents post-myocardial infarction heart failure by decreasing ischemia/reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*. 2024;119:691–697. DOI: 10.1007/s00395-024-01063-z.
12. Pantaleão S. Q., Fernandes P. O., Gonçalves J. E., Maltarollo V. G., Honorio K. M. Recent advances in the prediction of pharmacokinetics properties in drug design studies: a review. *ChemMedChem*. 2022;17(1):e202100542. DOI: 10.1002/cmdc.202100542.
13. Foster D. M., Vicini P. Noncompartmental and compartmental approaches to pharmacokinetic data analysis. *Atkinson's Principles of Clinical Pharmacology*. 2022;113–135. DOI: 10.1016/B978-0-12-819869-8.00035-5.
14. Stielow M., Witczyńska A., Kubryń N., Fijałkowski Ł., Nowaczyk J., Nowaczyk A. The Bioavailability of Drugs—The Current State of Knowledge. *Molecules*. 2023;28(24):8038. DOI: 10.3390/molecules28248038.
15. Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Ivkin D. Yu., Vetrova E. S., Terninko I. I., Shohin I. E., Narkevich I. A. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of etmaben in human blood plasma. *Drug development & registration*. 2024;13(1):257–271. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-1-1752.
16. Günhan B. K., Weber S., Friede T. A Bayesian time-to-event pharmacokinetic model for phase I dose-escalation trials with multiple schedules. *Statistics in Medicine*. 2020;39(27):3986–4000. DOI: 10.1002/sim.8703.



Перспективы оптимизации лекарственного обеспечения педиатрических пациентов на основе развития фармацевтического рынка в сегменте лекарственных препаратов для детей

О. Д. Немятых, Е. А. Ковалёва✉, И. А. Наркевич

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, литера А

✉ Контактное лицо: Ковалёва Ева Александровна. E-mail: eva.kovaleva@spcpcu.ru

ORCID: О. Д. Немятых – <https://orcid.org/0000-0001-5933-2120>;
Е. А. Ковалёва – <https://orcid.org/0009-0003-0866-4864>;
И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Статья поступила: 29.05.2024

Статья принята в печать: 17.10.2024

Статья опубликована: 18.10.2024

Резюме

Введение. Стратегия лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года в спектре приоритетных задач выделяет необходимость обеспечения рационального использования, безопасности и качества лекарственных препаратов. При этом применение эффективных медицинских технологий у педиатрических пациентов лимитировано как ассортиментом разрешенных к применению в детской популяции лекарственных препаратов, так и требованиями в части соответствия фармацевтического дизайна препарата назначению в целевой возрастной группе. Российский фармацевтический рынок характеризуется монотонной и стойкой тенденцией к расширению ассортиментной матрицы и увеличению показателей реальной и потенциальной емкости, в том числе в сегменте лекарственных препаратов для педиатрии. Однако, несмотря на ввод в гражданский оборот новых рыночных позиций для детей, постепенное накопление данных о безопасности, клинической и клинико-экономической эффективности препаратов в детской популяции, расширение панели возможностей производственных аптек, изменение правового статуса зарегистрированных препаратов, назначаемых off-label, на основании доказательного опыта применения по новому назначению, вопросы обоснованности врачебных назначений с приемлемым профилем убедительности доказательств в отношении педиатрических пациентов в условиях возникновения и развития ряда патологий остаются открытыми.

Цель. Определить перспективы оптимизации лекарственного обеспечения педиатрических пациентов на основе развития фармацевтического рынка в сегменте лекарственных препаратов для детей.

Материалы и методы. Информационную базу исследования составили данные Минздрава России за 2010–2022 гг., ГРЛС по состоянию на 01.01.2023 г., а также инструкции по медицинскому применению лекарственных препаратов. Границы рынка определяли целевой возрастной группой пациентов в соответствии с рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии. Метод контент-анализа использован для поиска научной литературы в электронных базах данных PubMed и eLibrary, анализа информации из инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов (ЛП), ограничительных перечней, ГРЛС, государственного реестра цен на ЖНВЛП. С помощью статистического метода анализа проведен анализ данных заболеваемости. Группировку, ранжирование и систематизацию применяли в рамках структурного анализа заболеваемости, а также анализа ассортиментной матрицы препаратов для педиатрии в рамках сформированных границ рынка. Графический анализ был использован для визуализации данных. Обработка данных осуществлялась с использованием MS Excel 2021.

Результаты и обсуждение. Установлено, что в период с 2010 по 2022 гг. на фоне прироста численности детского населения на 11,22 % отмечается увеличение первичной заболеваемости в целом на 13,41 %. В структуре первичной заболеваемости детей преобладают болезни органов дыхания, составляя 62,61 %. Анализ ассортиментной матрицы национального педиатрического формуляра, охватывающего 554 МНН, демонстрирует, что в рамках фармакотерапевтических групп с кодами J, L, N и P регистрируется снижение показателей ВОЗ на 16–57 %. Оценка предложения на национальном рынке позволяет заключить, что 19,55 % препаратов, разрешенных к применению в педиатрической практике, противопоказаны пациентам до 12 лет. В результате ранжирования ассортимента по пути введения установлено преобладание пероральных форм, охватывающих 39,88 % ассортиментной матрицы.

Заключение. Оценка динамики заболеваемости в контексте анализа структуры рынка препаратов для педиатрии позволяет выделить приоритетные ниши для фарминдустрии в сегментах лекарственных средств для фармакологической коррекции респираторных заболеваний, а также препаратов для лечения онкологических патологий, аутоиммунных расстройств, ожирения, сахарного диабета и неврологических расстройств. Представленный на сегодняшний день ассортимент лекарственных препаратов с учетом форм выпуска и возрастных ограничений для терапии педиатрических пациентов демонстрирует недостаточное заполнение рынка препаратами в специальных детских лекарственных формах, обеспечивающих приемлемость современных концепций терапии в педиатрии и точное дозирование действующих веществ в соответствии с возрастом ребенка, что, в свою очередь, раскрывает перспективы фармацевтической разработки лекарственных препаратов с дизайном, соответствующим назначению в целевой возрастной группе.

Ключевые слова: педиатрия, лекарственные препараты, фармацевтический рынок

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

Вклад авторов. О. Д. Немятых – концепция и дизайн исследования, написание текста. Е. А. Ковалёва – сбор и обработка материалов, статистическая обработка данных. И. А. Наркевич – редактирование.

Для цитирования: Немятых О. Д., Ковалёва Е. А., Наркевич И. А. Перспективы оптимизации лекарственного обеспечения педиатрических пациентов на основе развития фармацевтического рынка в сегменте лекарственных препаратов для детей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(4):272–283. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1839>

Prospects for optimizing the provision of medicines to pediatric patients based on the development of the pharmaceutical market in the segment of medicines for children

Oksana D. Nemyatykh, Eva A. Kovaleva✉, Igor A. Narkevich

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

✉ **Corresponding author:** Eva A. Kovaleva. **E-mail:** eva.kovaleva@spcpcu.ru

ORCID: Oksana D. Nemyatykh – <https://orcid.org/0000-0001-5933-2120>;

Eva A. Kovaleva – <https://orcid.org/0009-0003-0866-4864>;

Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>.

Received: 29.05.2024

Accepted: 17.10.2024

Published: 18.10.2024

Abstract

Introduction. The strategy of drug supply to the population of the Russian Federation for the period up to 2025 highlights the need to ensure the rational use, safety and quality of medicines in the range of priority tasks. At the same time, the use of effective medical technologies in pediatric patients is limited both by the range of medicines approved for use in the pediatric population and by the requirements regarding compliance of the pharmaceutical design of the drug with the intended purpose in the target age group. The Russian pharmaceutical market is characterized by a monotonous and persistent tendency to expand the assortment matrix and increase the indicators of real and potential capacity, including in the segment of medicines for pediatrics. However, despite the introduction of new market positions for children into civil circulation, the gradual accumulation of data on the safety, clinical and clinical-economic effectiveness of drugs in the pediatric population, the expansion of the panel of possibilities of production pharmacies, the change in the legal status of registered drugs prescribed by off-label, based on evidence-based experience of use for a new purpose, the issues of the validity of medical prescriptions with an acceptable profile of convincing evidence in relation to pediatric patients in the context of the occurrence and development of a number of pathologies remain open.

Aim. The aim of the work was to determine the prospects for optimizing the provision of medicines to pediatric patients based on the development of the pharmaceutical market in the segment of medicines for children.

Materials and methods. The information base of the study was made up of data from the Ministry of Health of the Russian Federation for 2010–2022, GRLS as of 01.01.2023, as well as instructions for the medical use of medicines. The target age group of patients was determined in accordance with the Recommendation of the Board of the Eurasian Economic Commission. The content analysis method is used to search scientific literature in the PubMed and eLibrary electronic databases, analyze information from instructions for the medical use of medicines (LP), restrictive lists, GRLS, and the state register of prices for VED. The analysis of morbidity data was carried out using the statistical analysis method. Grouping, ranking and systematization were used in the framework of a structural analysis of morbidity, as well as an analysis of the assortment matrix of drugs for pediatrics within the established market boundaries. Graphical analysis was used to visualize the data. Data processing was carried out using MS Excel 2021.

Results and discussion. It was found that in the period from 2010 to 2022, against the background of an increase in the number of children by 11.22 %, there was an increase in primary morbidity by 13.41 % in general. Respiratory diseases prevail in the structure of primary morbidity of children, amounting to 62.61 %. Having analyzed the matrices of the national pediatric code formulary, covering 554 INN, it turned out that within the pharmacotherapeutic groups J, L, N and P themselves, a decrease

in WHO indicators of 16–57 % was recorded. An assessment of the supply on the national market allows us to conclude that 19.55 % of drugs approved for use in pediatric practice are contraindicated in patients under 12 years of age. As a result of the assortment ranking along the route of administration, the predominance of oral forms was established, covering 39.88 % of the assortment matrix.

Conclusion. Assessing the dynamics of morbidity in the context of analyzing the structure of the market of drugs for pediatrics allows us to identify priority niches for the pharmaceutical industry in the segments of medicines for the pharmacological correction of respiratory diseases, as well as drugs for the treatment of oncological pathologies, autoimmune disorders, obesity, diabetes mellitus and neurological disorders. The range of medicines presented today, taking into account the forms of release and age restrictions for the treatment of pediatric patients, demonstrates insufficient filling of the market with drugs in special children's dosage forms that ensure acceptability to modern concepts of therapy in pediatrics and accurate dosing of active substances in accordance with the age of the child, which, in turn, reveals the prospects for the pharmaceutical development of medicines with a design that corresponds to the purpose in the target age group.

Keywords: pediatrics, medicines, pharmaceutical market

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. Oksana D. Nemyatykh – concept and design of the study, writing the text. Eva A. Kovaleva – collection and processing of materials, statistical data processing. Igor A. Narkevich – editing.

For citation: Nemyatykh O. D., Kovaleva E. A., Narkevich I. A. Prospects for optimizing the provision of medicines to pediatric patients based on the development of the pharmaceutical market in the segment of medicines for children. *Drug development & registration*. 2024;13(4):272–283. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-4-1839>

ВВЕДЕНИЕ

Современный уровень развития педиатрии предполагает выбор рациональной и всесторонне обоснованной в отношении ребенка медицинской технологии в соответствии с принципами доказательной медицины, что в полной мере соответствует приоритетам Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года, Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года и составляет основу современной парадигмы разработки фармацевтических препаратов для детей^{1,2}.

¹ Приказ Минздрава России от 13.02.2013 № 66 (ред. от 13.07.2021) «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_142725/33ba2d013728eb648d9b0aa6d0783af613f2a4e0/ Ссылка активна на 11.05.2024.

² Распоряжение Правительства РФ от 07.06.2023 № 1495-р «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_449976/ Ссылка активна на 19.05.2024.

Медицинские потребности педиатрических пациентов сегодня формируют отдельный рыночный сегмент, ориентированный на производство лекарственных препаратов, удовлетворяющих дополнительным требованиям в части простоты применения, низкой вероятности потенциальной травматичности при использовании, а также способности обеспечить возрастное дозирование лекарственного препарата и комплаентность больного. Реактивность развивающегося организма лимитирует номенклатуру рекомендуемых ингредиентов, вариабельность рецептур и определяет высокую социальную ответственность фарминдустрии в области фармацевтической разработки препаратов для детей, что в конечном итоге ограничивает риски развития нежелательных реакций [1, 2].

Российский фармацевтический рынок характеризуется монотонной и стойкой тенденцией к расширению ассортиментной матрицы и увеличению показателей реальной и потенциальной емкости, в том числе в сегменте лекарственных препаратов для педиатрии, что предоставляет медицинскому работнику возможность выбора лекарственных препаратов с учетом положений клинических рекомендаций в рамках отдельной нозологии, индивидуальных особенностей течения заболевания, а

также потребительских предпочтений конкретного больного^{1, 2, 3}.

Однако, несмотря на ввод в гражданский оборот новых рыночных позиций для детей, постепенное накопление данных о безопасности, клинической и клинико-экономической эффективности препаратов в детской популяции, расширение панели возможностей производственных аптек, изменение правового статуса зарегистрированных препаратов, назначения off-label, на основании доказательного опыта применения по новому назначению, вопросы обоснованности врачебных назначений с приемлемым профилем убедительности доказательств в отношении педиатрических пациентов в условиях возникновения и развития ряда патологий остаются открытыми. Важно подчеркнуть, что проблема применения лекарственных препаратов в педиатрии в рамках терапии «вне инструкции» усугубляется отсутствием детских лекарственных форм^{4, 5, 6} [3–5].

Целью работы было определить перспективы оптимизации лекарственного обеспечения педиатрических пациентов на основе развития фармацевтического рынка в сегменте лекарственных препаратов для детей.

¹ Фармацевтический рынок России. Доступно по: <https://dsm.ru/docs/analytics/Декабрь%202022%20Итог.pdf>. Ссылка активна на 20.05.2024.

² Pediatric Drugs Market Size, Share, and Trends 2024 to 2034. Available at: <https://www.precedenceresearch.com/table-of-content/3414>. Accessed: 11.05.2024.

³ Анализ размера и доли рынка педиатрических препаратов – тенденции роста и прогнозы (2024–2029 гг.). Доступно по: <https://www.mordorintelligence.com/ru/industry-reports/pediatric-drugs-market>. Ссылка активна на 11.05.2024.

⁴ Постановление Правительства РФ от 27.10.2023 № 1799 «Об утверждении требований к зарегистрированному на территории Российской Федерации лекарственному препарату, применяемому в соответствии с показателями (характеристиками) лекарственного препарата, не указанными в инструкции по его применению, включение которого допускается в стандарты медицинской помощи детям и клинические рекомендации». Доступно по: <https://www.consultant.ru/law/hotdocs/82327.html>. Ссылка активна на 26.04.2024.

⁵ Распоряжение Правительства РФ от 16.05.2022 № 1180-р (ред. от 01.08.2023) «Об утверждении перечня заболеваний или состояний (групп заболеваний или состояний), при которых допускается применение лекарственного препарата в соответствии с показателями (характеристиками) лекарственного препарата, не указанными в инструкции по его применению». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_417014/ Ссылка активна на 26.04.2024.

⁶ Федеральный закон от 05.12.2022 № 502-ФЗ «О внесении изменений в статью 56 Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_433279/ Ссылка активна на 11.06.2024.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Информационную базу исследования составили данные Минздрава России за 2010–2022 гг., ГРЛС по состоянию на 01.01.2023 г., а также инструкции по медицинскому применению лекарственных препаратов⁷ [6]. Границы рынка определяли целевой возрастной группой пациентов в соответствии с рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии⁸. Метод контент-анализа использован для поиска научной литературы в электронных базах данных PubMed и eLibrary, анализа информации из инструкций по медицинскому применению ЛП, ограничительных перечней, ГРЛС, государственного реестра цен на жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты (ЖНВЛП). С помощью статистического метода анализа проведен анализ данных заболеваемости. Группировку, ранжирование и систематизацию применяли в рамках структурного анализа заболеваемости, а также анализа ассортиментной матрицы препаратов для педиатрии в рамках сформированных границ рынка. Графический анализ был использован для визуализации данных. Обработка данных осуществлялась с использованием MS Excel 2021.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка заболеваемости как интегрального показателя выявляемости патологий, доступности медицинской помощи и эффективности системы лекарственного обеспечения свидетельствует, что в Российской Федерации в период с 2010 по 2022 гг. на фоне прироста численности детского населения на 11,22 % отмечается увеличение первичной заболеваемости в целом на 13,41 %. При этом на протяжении исследуемого периода в структуре первичной заболеваемости детей преобладают болезни органов дыхания, составляя к заключительной отметке наблюдения 62,61 %. Обращает на себя внимание тот факт, что среди пациентов первого года жизни по количеству впервые выявленных случаев также выделяются врожденные аномалии и патологии нервной системы. У детей возрастного периода от 0 до 14 лет достаточно часто регистрируются травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин, некоторые инфекцион-

⁷ Безопасность лекарственных препаратов. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>. Ссылка активна на 19.05.2024.

⁸ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21.12.2021 № 30 «О Руководстве по фармацевтической разработке лекарственных средств для применения в педиатрической практике». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_404523/ Ссылка активна на 11.07.2024.

ные и паразитарные заболевания, а также болезни кожи и подкожной клетчатки. Среди пациентов в возрасте 15–17 лет структуру «лидирующих» классов болезней формируют травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин, болезни кожи и подкожной клетчатки, болезни глаза и его придаточного аппарата, а также болезни органов пищеварения [6] (рисунок 1).

Стоит отметить, что в последние годы в педиатрической популяции в целом регистрируются темпы прироста заболеваемости по группам C00-D48 – Новообразования, J00-J99 – Болезни органов дыхания, S00-T98 – Травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин. Примечательно, что у пациентов первого года жизни положительная динамика заболеваемости обу-

словлена воздействием внешних причин, в среднем возрастном сегменте показатель прироста формируется преимущественно за счет онкологических патологий, болезней органов дыхания, а также травм, отравлений и иных внешних воздействий, у пациентов в возрасте 15–17 лет высокие величины темпов роста и прироста фиксируются в рамках круга болезней эндокринной системы, расстройств питания и нарушения обмена веществ, а также патологий дыхательной системы [6]. При этом в структуре болезней эндокринной системы, расстройств питания и нарушения обмена веществ выделяются сахарный диабет и ожирение, демонстрируя резкое увеличение параметров заболеваемости в группах пациентов 0–14 и 15–17 лет в 2,2 и 1,6 раза, а также 2,0 и 1,9 раза соответственно (таблица 1).

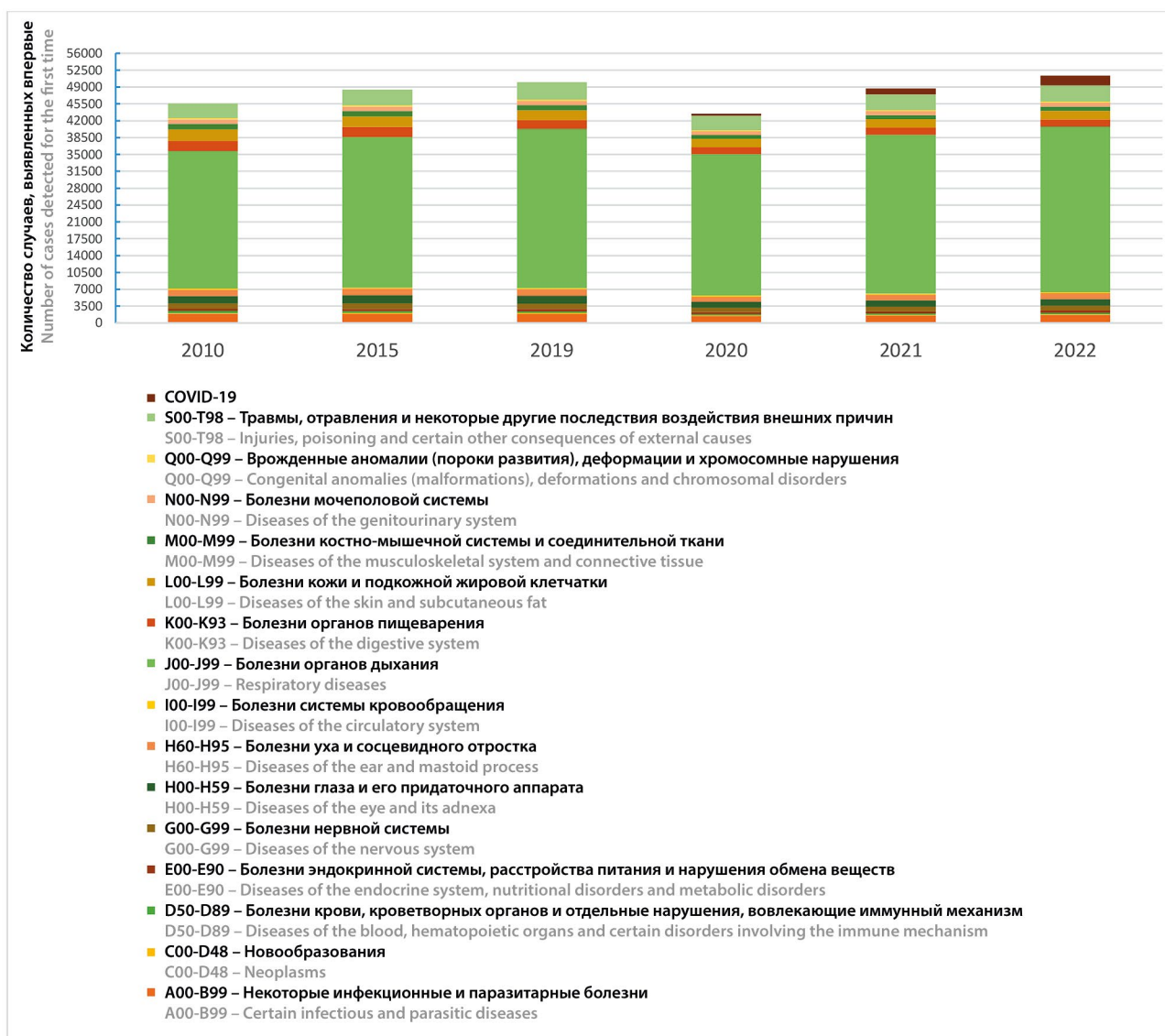


Рисунок 1. Динамика заболеваемости в педиатрии по классам болезней [6]

Figure 1. Dynamics of morbidity in pediatrics by disease classes [6]

Таблица 1. Анализ заболеваемости в педиатрии по классам болезней
Table 1. Analysis of morbidity in pediatrics by disease classes

Код МКБ-10 ICD-10 code	Возрастной период Age period	Темп роста базисный, 2010/2022, % Base growth rate, 2010/2022, %	Темп прироста базисный, 2010/2022, % Base growth rate, 2010/2022, %
Зарегистрировано заболеваний – всего . Из них: Diseases registered – total . Of these:	Первый год жизни First year of life	69,1	–30,9
	0–14 лет 0–14 years	110,49	+10,49
	15–17 лет 15–17 years	107	+7
A00-B99 – Некоторые инфекционные и паразитарные болезни A00-B99 – Certain infectious and parasitic diseases	Первый год жизни First year of life	52,5	–47,5
	0–14 лет 0–14 years	88	–12
	15–17 лет 15–17 years	74	–26
C00-D48 – Новообразования C00-D48 – Neoplasms	0–14 лет 0–14 years	124,8	+24,8
	15–17 лет 15–17 years	137,1	+37,1
D50-D89 – Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм D50-D89 – Diseases of the blood, hematopoietic organs and certain disorders involving the immune mechanism	Первый год жизни First year of life	43,88	–56,12
	0–14 лет 0–14 years	60,58	–39,42
	15–17 лет 15–17 years	101,81	+1,81
E00-E90 – Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ E00-E90 – Diseases of the endocrine system, nutritional disorders and metabolic disorders	Первый год жизни First year of life	39,18	–60,82
	0–14 лет 0–14 years	105,54	+5,54
	15–17 лет 15–17 years	115,66	+15,66
G00-G99 – Болезни нервной системы G00-G99 – Diseases of the nervous system	Первый год жизни First year of life	84,99	–15,01
	0–14 лет 0–14 years	82,83	–17,17
	15–17 лет 15–17 years	95,82	–4,18
H00-H59 – Болезни глаза и его придаточного аппарата G00-G99 – Diseases of the nervus systems	Первый год жизни First year of life	73,52	–26,48
	0–14 лет 0–14 years	86,64	–13,36
	15–17 лет 15–17 years	96,43	–3,57
H60-H95 – Болезни уха и сосцевидного отростка H60-H95 – Diseases of the ear and mastoid process	Первый год жизни First year of life	56,34	–43,66
	0–14 лет 0–14 years	91,7	–8,3
	15–17 лет 15–17 years	96,43	–3,57
I00-I99 – Болезни системы кровообращения I00-I99 – Diseases of the circulatory system	0–14 лет 0–14 years	74,27	–25,73
	15–17 лет 15–17 years	82,86	–17,14

Код МКБ-10 ICD-10 code	Возрастной период Age period	Темп роста базисный, 2010/2022, % Base growth rate, 2010/2022, %	Темп прироста базисный, 2010/2022, % Base growth rate, 2010/2022, %
J00-J99 – Болезни органов дыхания J00-J99 – Respiratory diseases	Первый год жизни First year of life	72,76	–27,24
	0–14 лет 0–14 years	120,92	+20,92
	15–17 лет 15–17 years	117,9	+17,9
K00-K93 – Болезни органов пищеварения K00-K93 – Diseases of the digestive system	Первый год жизни First year of life	58,2	–41,8
	0–14 лет 0–14 years	67,18	–32,82
	15–17 лет 15–17 years	76,46	–23,54
L00-L99 – Болезни кожи и подкожной жировой клетчатки L00-L99 – Diseases of the skin and subcutaneous fat	0–14 лет 0–14 years	74,3	–25,7
	15–17 лет 15–17 years	74	–26
M00-M99 – Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани M00-M99 – Diseases of the musculoskeletal system and connective tissue	0–14 лет 0–14 years	79,93	–20,07
	15–17 лет 15–17 years	84	–16
N00-N99 – Болезни мочеполовой системы N00-N99 – Diseases of the genitourinary system	Первый год жизни First year of life	65,24	–34,76
	0–14 лет 0–14 years	88,23	–11,77
	15–17 лет 15–17 years	81,27	–18,73
Q00-Q99 – Врожденные аномалии (пороки развития), деформации и хромосомные нарушения Q00-Q99 – Congenital anomalies (malformations), deformations and chromosomal disorders	Первый год жизни First year of life	101,68	+1,68
	0–14 лет 0–14 years	91,78	–8,22
	15–17 лет 15–17 years	64,29	–35,71
S00-T98 – Травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин S00-T98 – Injuries, poisoning and certain other consequences of external causes	Первый год жизни First year of life	114,34	+14,34
	0–14 лет 0–14 years	116,95	+16,95
	15–17 лет 15–17 years	96,44	–3,56

Общие тенденции состояния здоровья детского населения подтверждают необходимость повышения качества медицинской помощи детям, включая совершенствование лекарственного обеспечения педиатрических пациентов.

Оценка перечня основных лекарственных средств для детей ВОЗ, как стандарта минимальных потребностей в лекарственных препаратах базовой системы здравоохранения, свидетельствует, что документ включает 364 позиции с приемлемыми профилями терапевтической, фармакоэкономической эффектив-

ности и безопасности, предназначенные для применения при приоритетных патологических состояниях. При этом обращает на себя внимание существенное (35,54 %) превалирование по числу международных непатентованных наименований категории противомикробных препаратов для системного использования (таблица 2)¹.

¹ Безопасность лекарственных препаратов. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>. Ссылка активна на 19.05.2024.

Таблица 2. Структуризация ассортимента препаратов для педиатрии по наличию в перечнях**Table 2. Structuring of the range of drugs for pediatrics by availability in the lists**

КОД АТХ ATX CODE	Количество МНН Number of INN's			
	Перечень ВОЗ WHO list	Национальный педиатрический формуляр National pediatric formulary	Перечень ЖНВЛП List of Vital and Essential Drugs	Национальный портфель ЛП для педиатрии National portfolio of drugs for pediatrics
A	32	117	67	287
B	26	32	40	80
C	8	н/д	17	60
D	23	46	25	151
G	н/д	58	7	36
H	6	н/д	13	19
J	133	109	169	344
L	51	43	56	101
M	3	23	16	67
N	35	26	55	183
P	30	13	4	11
R	18	89	25	173
S	11	52	18	63
V	25	48	26	76
Итого Total	364	554	506	1428

Примечание. н/д – данные отсутствуют; А – Препараты, влияющие на пищеварительный тракт и обмен веществ; В – Препараты, влияющие на кроветворение и кровь; С – Препараты для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы; D – Препараты для лечения заболеваний кожи; G – Препараты для лечения заболеваний урогенитальных органов и половые гормоны; H – Гормональные препараты для системного использования (исключая половые гормоны); J – Противомикробные препараты для системного использования; L – Противоопухолевые препараты и иммуномодуляторы; M – Препараты для лечения заболеваний костно-мышечной системы; N – Препараты для лечения заболеваний нервной системы; P – Противопаразитарные препараты, инсектициды и репелленты; R – Препараты для лечения заболеваний респираторной системы; S – Препараты для лечения заболеваний органов чувств; V – Прочие лекарственные препараты.

Note. n/a – no data available; A – Drugs affecting the digestive tract and metabolism; B – Drugs affecting hematopoiesis and blood; C – Drugs for the treatment of diseases of the cardiovascular system; D – Preparations for the treatment of skin diseases; G – Drugs for the treatment of diseases of the urogenital organs and sex hormones; H – Hormonal drugs for systemic use (excluding sex hormones); J – Antimicrobials for systemic use; L – Antitumor drugs and immunomodulators; M – Drugs for the treatment of diseases of the musculoskeletal system; N – Drugs for the treatment of diseases of the nervous system; P – Antiparasitic drugs, insecticides and repellents; R – Drugs for the treatment of diseases of the respiratory system; S – Preparations for the treatment of diseases of the sensory organs; V – Other drugs.

Анализ ассортиментной матрицы национального педиатрического формуляра, охватывающего 554 МНН, демонстрирует, что в рамках фармакотерапевтических групп с кодами J, L, N и P регистрируется снижение минимальной пороговой величины на 16–57 %, что, в свою очередь, указывает на формирование в рамках российской педиатрии ограниченного портфеля лекарственных препаратов, которые могут быть рекомендованы для лечения обозначенных заболеваний у детей.

Стоит отметить, что правовую, физическую, ценовую и экономическую доступность препаратов для педиатрического пациента в целом обеспечивает сбалансированность по количеству наименований перечня ЖНВЛП с перечнями ВОЗ и Российским национальным педиатрическим формуляром^{1,2} [7].

Результаты ассортиментного анализа национального предложения, суммарно охватывающего 1428 международных непатентованных наименований, демонстрируют наличие в рамках анализируемого сегмента национального рынка всех групп лекарственных препаратов с потенциальной вариативностью товарных единиц. При этом важно отметить, что наполнение международными непатентованными наименованиями рынка в рамках исследуемого сегмента в целом соответствует структуре заболеваемости детей, согласно которой за период 2010–2022 гг. по частоте возникновения выделяются болезни органов дыхания, инфекционные и паразитарные заболевания, а также патологии органов пищеварения, нервной системы, кожи и подкожной жировой клетчатки.

Результаты оценки национального портфеля лекарственных препаратов для педиатрии, представленного 9871 торговым наименованием, демонстрируют, что из лекарственных препаратов, разрешенных к применению у пациентов до 18 лет, 45,87 % включены в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. При этом ценовая сегментация перечня ЖНВЛП, определяемая по уровню предельных отпускных цен производителя, в рамках детской практики свидетельствует о сравнительно равномерном распределении позиций по трем стоимостным категориям, а именно: в сегменте до 100 руб. – 37,98 % SKU, 100–500 руб. – 28,42 % SKU, свыше 500 руб. – 33,60 % SKU.

¹ WHO Model List of Essential Medicines for Children – 9th List, 2023. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2023.03>. Accessed: 11.05.2024.

² Распоряжение Правительства РФ от 12.10.2019 № 2406-р (ред. от 09.06.2024) «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/ Ссылка активна на 11.05.2024.

Стоит подчеркнуть, что возможность применения препарата в детской практике в значительной степени определяется возрастом пациентов (рисунок 2). Обращает на себя внимание ограничение числа позиций для применения на ранних периодах развития организма. Так, 19,55 % препаратов от общего числа позиций, разрешенных к применению в педиатрической практике, противопоказаны пациентам до 12 лет, 12,71 % – до 3 лет, 7 % – до 6 лет, 5,1 % – до 2 лет, 4,52 % – до 1 года, 1,49 % – до 1 месяца. Примечательно, что структура возрастных ограничений в разрезе фармакотерапевтических направлений в целом соответствует структуре ассортиментной матрицы, согласно которой за период 2010–2022 гг. по количеству позиций преобладают препараты следующих категорий: А – Препараты, влияющие на пищеварительный тракт и обмен веществ; D – Препараты для лечения заболеваний кожи; J – Противомикробные препараты для

системного использования; R – Препараты для лечения заболеваний респираторной системы. При этом позиции для лечения заболеваний нервной системы максимально лимитированы в части применения у пациентов первого года жизни.

В результате ранжирования ассортимента ЛП по пути введения установлено преобладание пероральных форм, которые охватывают 39,88 % ассортиментной матрицы. Удельный вес инъекционных лекарственных форм составляет 23,11 %, лекарственных форм для наружного применения – 11,45 %, для местного применения – 10,27 %, ингаляционных – 1,35 % (рисунок 3).

Сравнительная оценка вклада отдельных форм выпуска в структуру ассортимента указывает на тот факт, что наибольший удельный вес среди препаратов для наружного применения с максимальной репрезентативностью категории «D – Препараты для

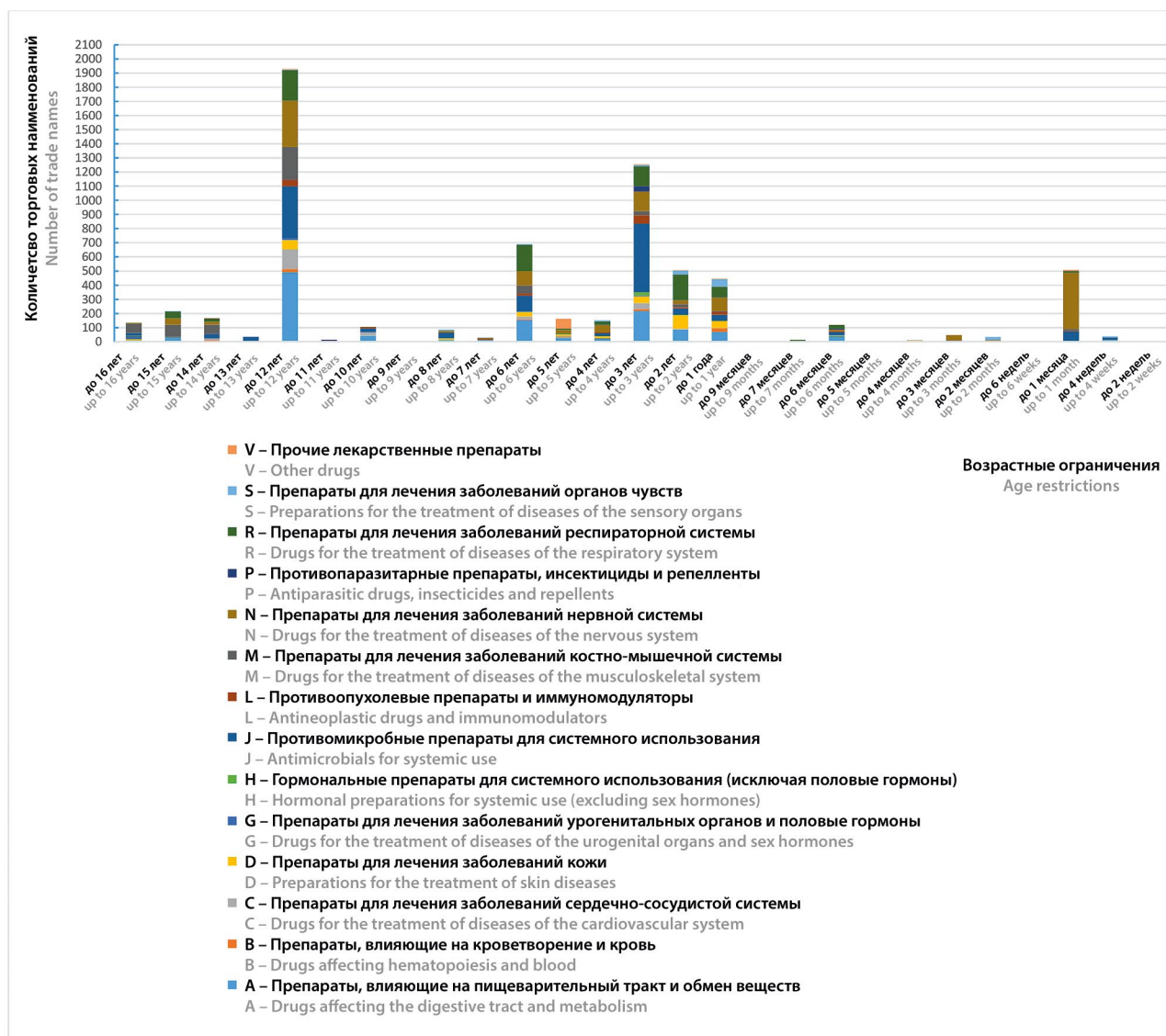


Рисунок 2. Структуризация ассортимента препаратов по особенностям применения в педиатрии

Figure 2. Structuring of the range of drugs according to the specifics of their use in pediatrics

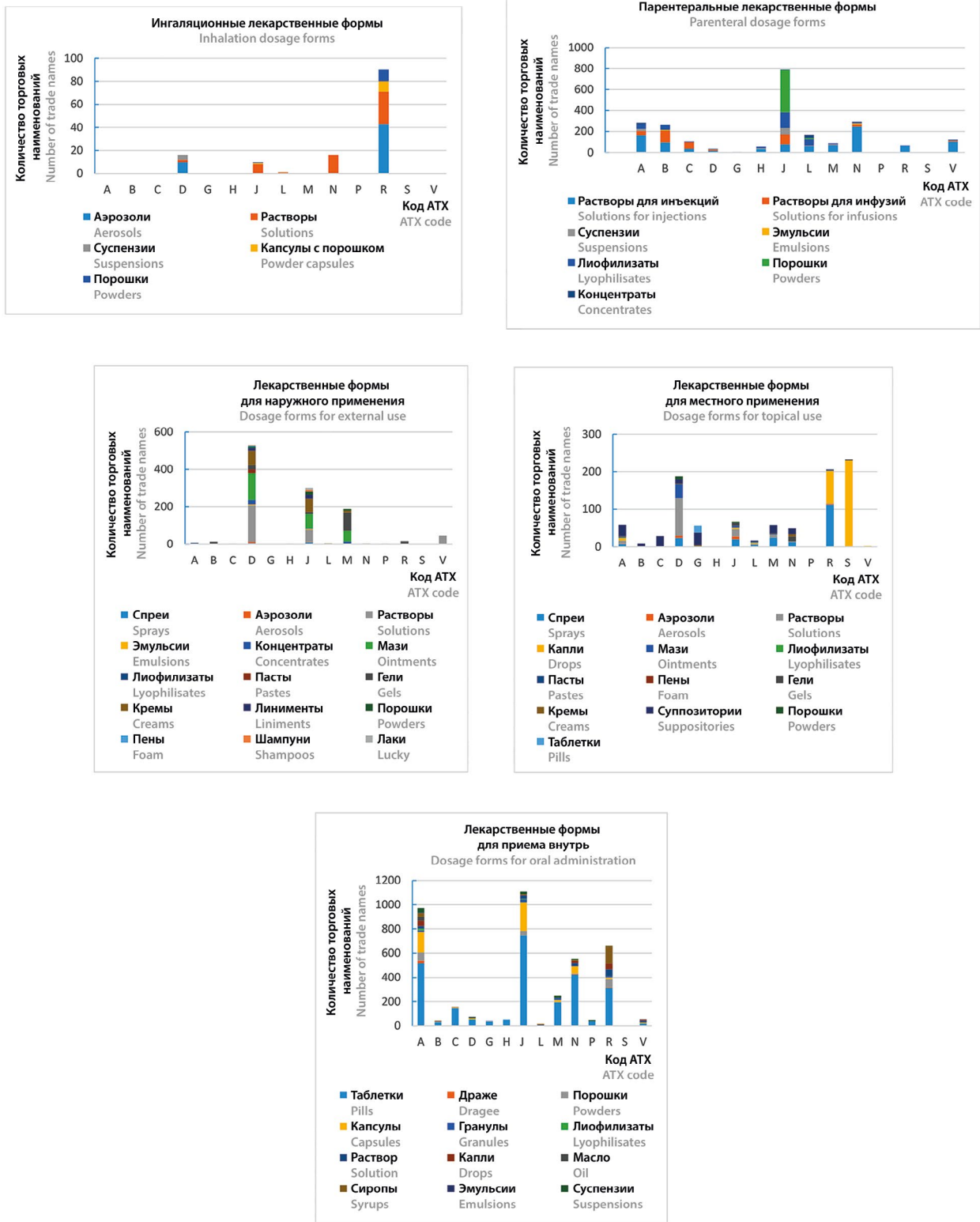


Рисунок 3. Структуризация ассортимента препаратов по формам выпуска

Figure 3. Structuring of the range of drugs by release forms

лечения заболеваний кожи» имеют растворы (22,21 %), мази (16,12 %) и кремы (8,34 %). Таблетки и капсулы лидируют среди лекарственных форм для приема внутрь, суммарно охватывая 76,86 % сегментирован-

ной матрицы. При этом позиции преимущественно представлены в категориях: А – Препараты, влияющие на пищеварительный тракт и обмен веществ; J – Противомикробные препараты для системного ис-

пользования; R – Препараты для лечения заболеваний респираторной системы. Рыночными индикаторами ингаляционных форм являются аэрозоли (39,85 %) и растворы (41,35 %) группы «R – Препараты для лечения заболеваний респираторной системы». Среди парентеральных форм стоит отметить порошки и лиофилизаты для приготовления растворов категории «J – Противомикробные препараты для системного использования».

В целом распределение видов лекарственных форм по категориям АТХ-классификации препаратов отражает рациональный подход к воздействию на клиническое течение групп патологий в рамках отдельных систем растущего и развивающегося организма. Однако специальные детские формы, представленные скорректированными позициями для приема внутрь (суспензии, шипучие таблетки, таблетки для рассасывания, жевательные таблетки, сиропы и порошки), охватывают только 21 единицу ассортиментной матрицы, что составляет 0,52 % зарегистрированных в ГРЛС препаратов для педиатрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на успехи, достигнутые фармацевтической отраслью в последние десятилетия, лекарственные препараты промышленного производства не могут в полной мере удовлетворить индивидуальные потребности педиатрических пациентов, что, в свою очередь, определяет необходимость изыскания эффективных механизмов совершенствования лекарственного обеспечения детей с учетом тенденций развития рынка и факторов, определяющих структуру и динамику заболеваемости [1, 2].

По международным оценкам, с 2023 по 2032 гг. среднегодовой темп роста глобального рынка препаратов для педиатрии составит в среднем 8,2 %^{1,2} [2]. Примечательно, что прогнозные исследования базируются не только на традиционных подходах, учитывая динамику заболеваемости, численность детской популяции, но и на расширении масштаба клинических испытаний, увеличении инвестиций в разработку препаратов для целевой группы потребителей, развитии фармацевтических наук и спектра национальных инструментов государственного стимулирования отрасли. При этом наиболее интенсивные параметры динамики предполагаются в сегменте противоопухолевых препаратов и препаратов для лечения аутоиммунных расстройств, что связано с ростом числа генетических нарушений, онкологических и аутоиммунных заболеваний, а также выведением на

рынок ряда оригинальных орфанных препаратов для детей. Важно отметить, что исследователи прогнозируют сохранение в структуре рынка препаратов для педиатрии максимальной доли лекарственных средств для фармакологической коррекции респираторных заболеваний. Доминирование сегмента на протяжении прогнозного периода обусловлено глобальным снижением иммунитета, загрязнением окружающей среды и воздействием аллергенов. Растущая распространенность детского ожирения, диабета и неврологических расстройств также определяет развивающийся спрос на целевые лекарственные препараты и обосновывает расширение границ соответствующих фармакотерапевтических направлений в структуре рынка [4, 5].

Оценка динамики заболеваемости, а также структуры и динамики российского сегмента препаратов для педиатрии демонстрирует идентичность параметров в сравнении с глобальными тенденциями, что, в свою очередь, позволяет прогнозировать воспроизводимый в рамках национальной системы здравоохранения сценарий развития фармацевтического рынка с идентификацией приоритетных ниш для фарминдустрии. Важно подчеркнуть, что представленный на сегодняшний день ассортимент лекарственных препаратов с учетом форм выпуска и возрастных ограничений для терапии педиатрических пациентов демонстрирует недостаточное заполнение рынка препаратами в специальных детских лекарственных формах, обеспечивающих приемлемость современных концепций терапии в педиатрии и точное дозирование действующих веществ в соответствии с возрастом ребенка, что, в свою очередь, раскрывает перспективы фармацевтической разработки лекарственных препаратов с дизайном, соответствующим назначению в целевой возрастной группе. Решение проблемы разработки и ввода в гражданский оборот высокоэффективных и безопасных лекарственных форм для детей невозможно без учета медицинских, организационно-фармацевтических и правовых аспектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Наркевич И. А., Немятых О. Д., Басакина И. И., Сиукаева Д. Д. Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов для педиатрической практики: фундаментальные основы и специфические особенности. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(3):194–201.
2. Domingues C., Jarak I., Veiga F., Dourado M., Figueiras A. Pediatric Drug Development: Reviewing Challenges and Opportunities by Tracking Innovative Therapies. *Pharmaceutics*. 2023;15(10):2431. DOI: 10.3390/pharmaceutics15102431.
3. Наркевич И. А., Немятых О. Д., Медведева Д. М., Сметихова И. Е., Ладутько Ю. М., Стрелков С. В. Организационно-фармацевтические аспекты совершенствования лекарственного обеспечения детей (на примере

¹ Pediatric Drugs Market Size, Share, and Trends 2024 to 2034. Available at: <https://www.precedenceresearch.com/table-of-content/3414>. Accessed: 11.05.2024.

² Анализ размера и доли рынка педиатрических препаратов – тенденции роста и прогнозы (2024–2029 гг.). Доступно по: <https://www.mordorintelligence.com/ru/industry-reports/pediatric-drugs-market>. Ссылка активна на 11.05.2024.

- Санкт-Петербурга). *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020;(1):31–43. DOI: 10.31549/2542-1174-2020-1-31-43.
4. Toni I., Hupfer J., Neubert A. 33 Off-label use of drugs in paediatric (specialised) outpatient clinics – what has changed between 2009 and 2019? *Archives of Disease in Childhood*. 2023;108(6):A11. DOI: 10.1136/archdischild-2023-esdppp.33.
 5. Yackey K., Stukus K., Cohen D., Kline D., Zhao S., Stanley R. Off-label Medication Prescribing Patterns in Pediatrics: An Update. *Hospital Pediatrics*. 2019;9(3):186–193. DOI: 10.1542/hpeds.2018-0168.
 6. Окладников С. М., Никитина С. Ю., Александрова Г. А., Ахметзянова Р. Р., Голубев Н. А., Кириллова Г. Н., Огрызко Е. В., Оськов Ю. И., Романенко О. И., Харьковская Т. Л., Чумарина В. Ж., ред. Здравоохранение в России. 2023. М.: Федеральная служба государственной статистики; 2023. 180 с.
 7. Баранов А. А., Таточенко В. К., Намазова Л. С., Самсыгина Г. А., Сайткулов К. И. Российский национальный педиатрический формуляр и источники информации о лекарственных средствах. *Педиатрическая фармакология*. 2006;3(3):6–9.
 2. Domingues C., Jarak I., Veiga F., Dourado M., Figueiras A. Pediatric Drug Development: Reviewing Challenges and Opportunities by Tracking Innovative Therapies. *Pharmaceutics*. 2023;15(10):2431. DOI: 10.3390/pharmaceutics15102431.
 3. Narkevich I. A., Nemyatykh O. D., Medvedeva D. M., Smekhova I. E., Ladutko Yu. M., Strelkov S. V. Organizational and pharmaceutical aspects of improving medicinal provision of children (on the example of St. Petersburg). *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2020;(1):31–43. (In Russ.) DOI: 10.31549/2542-1174-2020-1-31-43.
 4. Toni I., Hupfer J., Neubert A. 33 Off-label use of drugs in paediatric (specialised) outpatient clinics – what has changed between 2009 and 2019? *Archives of Disease in Childhood*. 2023;108(6):A11. DOI: 10.1136/archdischild-2023-esdppp.33.
 5. Yackey K., Stukus K., Cohen D., Kline D., Zhao S., Stanley R. Off-label Medication Prescribing Patterns in Pediatrics: An Update. *Hospital Pediatrics*. 2019;9(3):186–193. DOI: 10.1542/hpeds.2018-0168.
 6. Okladnikov S. M., Nikitina S. Yu., Aleksandrova G. A., Akhmetzyanova R. R., Golubev N. A., Kirillova G. N., Ogryzko E. V., Oskov Yu. I., Romanenko O. I., Kharkova T. L., Chumarina V. Zh., editors. Healthcare in Russia. 2023. Moscow: Federal State Statistics Service; 2023. 180 p. (In Russ.)
 7. Baranov A. A., Tatochenko V. K., Namazova L. S., Samsygi-na G. A., Saitkulov K. I. Russian Russian national pediatric medication guidelines (formulation) and medication informational resources. *Pediatric pharmacology*. 2006;3(3):6–9. (In Russ.)

REFERENCES

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науке:

- 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.

2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.

3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – <http://www.consort-statement.org>

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате A4 Microsoft Word (*.doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – <http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=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: Синдронол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов необходимо приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кангю Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, страну происхождения [пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете, в прослеживаемом формате, с четкими, разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т. д.). Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия.

Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например: M – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n . Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т. п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написание рукописи и т. д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по ал-

фавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (In Russ.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.

5. В конце описания в круглых скобках указывается (In Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznakov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychopharmacogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117 DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008;7(1):58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008-0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Недопустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005. 194 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014;13(3):53–57.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.).

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatr Scand*. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

Варианты библиографического описания патентов: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.citethisforme.com>.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления предоставляемых 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 подписью на русском и английском языках. В подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуточные 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 подписей рисунков 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.



*№ 18906 в реестре Российского ПО

ФАРМРЕГИСТРАЦИЯ

Незаменимо удобный помощник
в подготовке электронного
XML досье соответствующего
стандарта для загрузки на
сайт Минздрава

фармрегистрация.рф



Продолжайте работу с досье без прерываний

Вы можете легко импортировать и
продолжать вести досье из других
систем. Переносите данные без потерь
и сосредоточьтесь на разработке новых
препаратов



Удобство и эффективность

Поддержка различных вариантов экспорта и импорта
в XML-файлы позволяет гибко работать с данными.
Автоматическая проверка досье перед загрузкой в
Минздрав обеспечивает точность и соответствие
требованиям. Для работы с программой не требуется
1С, а также подключение к интернету, что делает её
доступной и автономной

Лучшая цена
на рынке!



Журнал является Open Access изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.

Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений.

Основные пять тематических разделов журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», соответствует отраслям науки:

- ✓ 3.2.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).
- ✓ 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки).
- ✓ 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Журнал индексируется в ведущих научных базах:

- ✓ Scopus (Q3).
- ✓ Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).
- ✓ Высшая аттестационная комиссия (ВАК).
- ✓ А также ВИНТИ, Академия Google (Google Scholar), СОЦИОНЕТ, Base, РГБ, Lens.

Издательские услуги:

Английский перевод статей

- Услуга комплексного перевода.
- Производство англоязычной статьи, включающее верстку и научный перевод.

Специальный выпуск журнала

- При заключении договора сотрудничества возможна публикации специального выпуска журнала.
Специальный выпуск, посвященный 10-летию ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России», был выпущен номером Том 10, № 4 (2021).

Журнал является **Open Access** изданием со свободным бесплатным доступом к научным трудам ученых, с которыми читатель может ознакомиться в интернете.



Основатель журнала и главный редактор – д. фарм. н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» **Шохин Игорь Евгеньевич**

По вопросам сотрудничества просьба обращаться на почту: **info@cpha.ru**



Электронный журнал

Печатный журнал

Информационный ресурс

Фармацевтический журнал «Разработка и регистрация 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.

Аудитория **10 000+**
Нас читают **Россия, СНГ**

Периодичность выхода
журнала **4 раза в год**

Партнер ключевых
мероприятий отрасли

Распространяется
бесплатно

Мы в Telegram



По вопросам сотрудничества
info@pharmjournal.ru
info@chpa.ru